

**CONJUNTOS DE REATIVOS LIOFILIZADOS DE COMPOSTOS
DIAMINODITIÓLICOS PARA MARCAÇÃO COM
TECNÉCIO-99m. ESTUDO FARMACOCINÉTICO E
ELABORAÇÃO DE MODELOS COMPARTIMENTALIZADOS
DOS RESPECTIVOS COMPLEXOS**

ELAINE BORTOLETI DE ARAÚJO

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear.**

**Orientador:
Dra. Maria Aparecida T. M. de Almeida**

**São Paulo
1995**

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**“CONJUNTOS DE REATIVOS LIOFILIZADOS DE COMPOSTOS
DIAMINODITIÓLICOS PARA MARCAÇÃO COM TECNÉCIO-99m.
ESTUDO FARMACOCINÉTICO E ELABORAÇÃO DE MODELOS
COMPARTIMENTALIZADOS DOS RESPECTIVOS COMPLEXOS”**

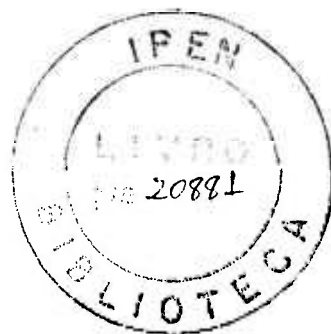
ELAINE BORTOLETI DE ARAÚJO

TESE APRESENTADA COMO PARTE DOS
REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO GRAU
DE DOUTOR EM CIÊNCIAS NA ÁREA
DE TECNOLOGIA NUCLEAR

ORIENTADORA: Dra. MARIA APPARECIDA T. M. DE ALMEIDA

SÃO PAULO

1995



Ao meu pai

*Que sempre soube valorizar a importância
de minha formação profissional e nunca
poupou esforços para tanto*

Em memória e com saudades

A minha mãe

Ao Rivaldo

Aos meus irmãos

Pelo incentivo constante

AGRADECIMENTOS

- . Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) , pela bolsa concedida

- . Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, na pessoa de seu Superintendente Dr. Claudio Rogrigues

- . À Dra. Constância Pagano Gonçalves da Silva, chefe da Coordenadoria de Processamento de Material Radioativo, pela oportunidade concedida

- . À Jair Mengatti, chefe de Supervisão de Produção de Radioisótopos, Dra. Nilda P. S. de Pereira, chefe de Supervisão de Controle de Qualidade de Radiofármacos e Marycel B. Figols, chefe de Supervisão de Radiofarmácia pela colaboração e facilidades oferecidas

- . À Dra. Maria Aparecida T. M. de Almeida, pela orientação, dedicação e apoio recebidos durante a realização deste trabalho

- . Às Dras. Olga Gonçalves de Carvalho e Emiko Muramoto pelas sugestões e inestimável colaboração

- . Aos pesquisadores, técnicos e secretárias da Divisão de Radiofarmácia que colaboraram com a elaboração deste trabalho

- . Ao Dr. Carlos Henrique Mesquita, pelo inestimável apoio durante a elaboração dos modelos farmacocinéticos

. Ao Dr. Leoberto Tavares da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pelos sábios conselhos e disposição sempre dispensada

. Ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo, pela execução das análises físico-químicas dos produtos sintetizados

. À Divisão Experimental do Instituto do Coração (INCOR), pela colaboração prestada na realização das imagens cintilográficas

ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMO	01
ABSTRACT	04
INTRODUÇÃO	06
1. Desenvolvimento de radiofármacos de tecnécio-99m	06
1.1. Importância das propriedades físico-químicas no desenvolvimento de radiofármacos de tecnécio-99m	08
1.2. Estudos farmacocinéticos no desenvolvimento de radiofármacos de tecnécio-99m	15
2. Utilização de ligantes aminotiólicos na produção de radiofármacos de tecnécio-99m: desenvolvimento de radiofármacos renais e cerebrais	19
II - OBJETIVO	35
III - MATERIAIS E MÉTODOS	37
1. Materiais	37
1.1. Reagentes e soluções	37
1.2. Equipamentos	38
1.3. Outros	39
1.4. Animais	39
2. Métodos	40
2.1. Preparação de L,L-Etilenodicisteína (L,L-EC) e L,L-Etilenodicisteína dietil éster (L,L-ECD)	40
2.2. Análises físico-químicas	43
2.3. Estudo das condições de marcação com ^{99m} Tc.....	44
2.3.1. Marcação de L,L-EC com ^{99m} Tc	44
Avaliação da pureza radioquímica	46

2.3.2. Marcação de L,L-ECD com ^{99m}Tc	47
Avaliação da pureza radioquímica	49
2.4. Hidrólise alcalina do complexo L,L-ECD- ^{99m}Tc	50
2.5. Elaboração de conjuntos de reativos liofilizados para marcação com ^{99m}Tc	50
2.5.1. Conjuntos de reativos liofilizados de L,L-EC	51
2.5.2. Conjuntos de reativos liofilizados de L,L-ECD	52
2.6. Estudos biológicos dos complexos L,L-EC- ^{99m}Tc e L,L-ECD- ^{99m}Tc	53
2.6.1. Estudos biológicos em camundongos	53
Estudos de distribuição biológica	53
Estudos de retenção de corpo inteiro	55
Estudos de eliminação	55
Determinação da porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas	56
Avaliação cromatográfica de fluidos biológicos	56
2.6.2. Elaboração de modelos compartimentalizados de distribuição farmacocinética	58
IV - RESULTADOS	63
1. Preparação e análises físico-químicas dos compostos L,L-EC e L,L-ECD	63
2. Estudo das condições de marcação com ^{99m}Tc	65
2.1. Marcação de L,L-EC com ^{99m}Tc	65
2.2. Marcação de L,L-ECD com ^{99m}Tc	67
3. Hidrólise alcalina do complexo L,L-ECD- ^{99m}Tc	69
4. Elaboração de conjuntos de reativos liofilizados para marcação com ^{99m}Tc	69
4.1. Conjuntos de reativos de L,L-EC	69
4.2. Conjuntos de reativos de L,L-ECD	70
5. Estudos biológicos dos complexos L,L-EC- ^{99m}Tc e L,L-ECD- ^{99m}Tc	71
5.1. Estudos biológicos em camundongos	71
Estudos de distribuição biológica	71
Estudos de retenção de corpo inteiro	77
Estudos de eliminação	78
Determinação da porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas	80
Avaliação cromatográfica de fluidos biológicos	81
5.2. Estudos biológicos em animais de médio porte	82
6. Análise compartimental dos complexos L,L-EC- ^{99m}Tc e L,L-ECD- ^{99m}Tc	82

Figuras 14 a 26	88
V. DISCUSSÃO	101
VI. CONCLUSÕES	124
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127

“CONJUNTOS DE REATIVOS LIOFILIZADOS DE COMPOSTOS DIAMINODITIÓLICOS PARA MARCAÇÃO COM TECNÉCIO-99m. ESTUDO FARMACOCINÉTICO E ELABORAÇÃO DE MODELOS COMPARTIMENTALIZADOS DOS RESPECTIVOS COMPLEXOS”

Elaine Bortoleti de Araújo

RESUMO

O presente trabalho foi motivado pelo interesse clínico por compostos diaminoditiólicos para marcação com tecnécio-99m. Os compostos de escolha, L,L-Etilenoditicisteína (L,L-EC) e L,L-Etilenoditicisteína dietil éster (L,L-ECD), foram obtidos com rendimentos satisfatórios e caracterizados por IV e RNM-¹H.

No estudo das condições de marcação dos compostos com tecnécio-99m, verificou-se a importância do tipo e massa do agente redutor bem como do pH da marcação para obtenção dos complexos com características de distribuição biológicas pertinentes. A pureza radioquímica das marcações foi determinada por meio de cromatografia em camada delgada (CCD) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Foram produzidos conjuntos de reativos liofilizados dos compostos L,L-EC e L,L-ECD para pronta marcação com ^{99m}Tc, com estabilidade superior a 120 dias, quando armazenados sob refrigeração, viabilizando a comercialização dos produtos. A formulação ideal para cada caso, bem como a utilização de processo de congelamento instantâneo com nitrogênio líquido, foram os fatores determinantes do sucesso da liofilização.

Efetou-se, paralelamente, estudo da distribuição biológica em camundongos de ambos os complexos formados com tecnécio por meio de técnica invasiva bem como em animais de médio porte para avaliação cintilográfica dos mesmos.

O estudo de distribuição biológica do complexo L,L-EC-^{99m}Tc evidenciou uma depuração sanguínea rápida, com aproximadamente 90% da dose administrada sendo eliminada após 60 minutos, quase que exclusivamente por via urinária. Os resultados dos estudos de distribuição biológica foram ajustados a um modelo farmacocinético compartimentalizado, composto por três compartimentos, conforme esperado para um radiofármaco destinado ao estudo renal dinâmico, com eliminação tubular renal. A interação do composto com os receptores tubulares renais, mediadores de tal processo de eliminação, está diretamente relacionada às características estruturais do composto, mais especificamente, à presença e posicionamento de grupamentos polares.

Os estudos de distribuição biológica do complexo L,L-ECD-^{99m}Tc determinaram uma distribuição biológica distinta do complexo L,L-EC-^{99m}Tc, apesar das similaridades estruturais apresentadas. A presença dos grupamentos etila confere ao complexo neutralidade e aumento da lipofilicidade. O complexo atravessa a barreira hematoencefálica intacta e é retido no cérebro por um período de tempo condizente com a aquisição de imagens cintilográficas cerebrais.

O aprisionamento do composto no cérebro bem como sua eliminação relativamente rápida do organismo estão relacionados à metabolização do composto a espécies mais polares, identificadas nos espectros de CLAE de amostras de urina e bile. A lipofilicidade do complexo L,L-ECD-^{99m}Tc é a responsável pela captação hepática elevada bem como pela significativa fração de eliminação intestinal do composto.

A distribuição biológica do complexo L,L-ECD-^{99m}Tc foi ajustada a um modelo de sete compartimentos, caracterizado por um clareamento sanguíneo relativamente

rápido, uma via de depuração renal unidirecional e uma de eliminação intestinal, determinada por intenso trânsito hepato-biliar.

“LYOPHILIZED KITS OF DIAMINODITHIOL COMPOUNDS FOR LABELLING WITH 99m -TECHNETIUM. PHARMACOKINETICS STUDIES AND DISTRIBUTION COMPARTIMENTAL MODELS OF THE RELATED COMPLEXES”

Elaine Bortoleti de Araújo

ABSTRACT

The present work reflects the clinical interest for labelling diaminodithiol compounds with technetium-99m.

Both choosed compounds, L,L-Ethylenedicysteine (L,L-EC) and L,L-Ethylenedicysteina diethyl ester (L,L-ECD) were obtained with relative good yield and characterized by IR and NMR.

The study of labelling condictiones with technetium-99m showed the influence of the type and mass of reducing agent as well as the pH on the formation of complexes with desired biological characteristics. Radiochemical purity was determined by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC).

Lyophilised kits of L,L-EC and L,L-ECD for labelling with ^{99m}Tc were obtained, with stability superior to 120 days, when stored under refrigeration, enabling the kits marketing. The ideal formulation of the kits as well as the use of liquid nitrogen in the freezing process, determined the lyophilisation sucess.

Distribution biological studies of the ^{99m}Tc complexes were performed on mice by invasive method and on bigger animals by cintilographic avaliation.

Biological distribution studies of the complex $^{99m}\text{Tc-L,L-EC}$ showed fast blood clearance, with the elimination of about 90% of the administered dose after 60 minutes, almost exclusively by the urinary system. The biological distribution results were adjusted to a three compartmental distribution model, as expected for a radiopharmaceutical designed to renal dynamic studies, with tubular elimination. The complex interaction with renal tubular receptors is related with structural characteristics of the compound, more specifically with the presence and location of polar groups.

In comparison with $^{99m}\text{Tc-L,L-EC}$, biological studies of the complex $^{99m}\text{Tc-L,L-ECD}$ showed different distribution aspects, despite some structural similarities. The presence of ethyl groups confers to the complex neutrality and lipophilicity. It crosses the intact blood brain barrier and is retained in the brain for enough period, permitting the acquisition of scintilographic cerebral images.

The cerebral retention of the complex, and also its relative fast elimination are related to the metabolization of the compound to more polar species, identified in the urine and bile HPLC. The lipophilicity of the complex determines high liver uptake and intestinal elimination of the compound.

Biological distribution of the complex $^{99m}\text{Tc-L,L-ECD}$ was adjusted to a compartmental distribution model composed by seven compartments, characterized by a fast blood clearance, an unidirectional renal depuration and intestinal elimination, determined by intense hepato-biliar transit.

I- INTRODUÇÃO

1 - DESENVOLVIMENTO DE RADIOFÁRMACOS DE TECNÉCIO-99m

As propriedades radiofísicas do nuclídeo tecnécio-99m (^{99m}Tc), descoberto por Segré em 1938, tornaram-no apropriado e o mais utilizado para o emprego clínico cintilográfico em Medicina Nuclear ⁽⁷⁹⁾.

Com relação a outros nuclídeos gama emissores, o ^{99m}Tc apresenta as seguintes vantagens: [1] tempo de meia-vida físico curto (6,02 hs) ; [2] ausência de radiação particulada ou de alta energia, o que minimiza a dose de radiação absorvida pelo paciente: [3] decai para um isótopo filho (^{99}Tc) que representa uma dose de radiação negligenciável e [4] mono-emissão gama de energia 140 keV, compatível com os sistemas de aquisição de imagens. Com o advento do gerador de ^{99m}Tc no final dos anos 60, tornou-se possível obter este radionuclídeo convenientemente numa forma pura ^(30,78).

Nos geradores ^{99}Mo - ^{99m}Tc do tipo coluna cromatográfica, o ^{99m}Tc é obtido na forma de solução de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$), encontrando-se o elemento ^{99m}Tc no estado de valência +7, preferencialmente estável em solução aquosa ⁽⁹⁵⁾. Apesar de tal solução poder ser utilizada para fins diagnósticos, na maioria das aplicações médicas, contudo, o ^{99m}Tc (VII) é reduzido a estados de oxidação inferiores de modo a formar um complexo com um ligante específico, cuja biodistribuição é definida por sua própria natureza, constituindo os chamados radiofármacos essenciais ⁽⁵⁴⁾.

Os ligantes unem-se ao tecnécio por ligações covalente-coordenadas formando-se os complexos ou compostos de coordenação que adquirem geometrias diferentes, como octaedro, pirâmide quadrada, bipirâmide pentagonal, etc. ⁽⁷⁹⁾.

Vários fatores devem ser levados em conta no processo de marcação com ^{99m}Tc, tais como a natureza do ligante, o potencial de oxido-redução, a estequiometria da reação, a ordem de adição dos diferentes reagentes e ainda o pH da reação. O grau de estabilidade do complexo que se forma dependerá, sobretudo, do tempo e da temperatura de reação ⁽⁷⁹⁾.

Os complexos de tecnécio têm sido classificados sob diversos pontos de vista, tais como, pelo número de oxidação do ^{99m}Tc (+1 a +7, -1, -3), pelo átomo doador de elétrons (O, N, S, P) no ligante, pelo número de coordenação do complexo (4 a 9) e ainda outros fatores como geometria do complexo, características de distribuição biológica do radiofármaco ou mesmo sua utilidade clínica ^(79,95). Tais classificações, entretanto, são arbitrárias e têm sido empregadas atendendo a interesses próprios de cada época e expressando, de certo modo, os diferentes estágios de desenvolvimento científico e tecnológico ⁽⁷⁹⁾.

Uma classificação bastante utilizada atualmente agrupa os radiofármacos de ^{99m}Tc em aniônicos, catiônicos e neutros, tendo em conta a propriedade eletrônica dos complexos, diretamente relacionada às características de distribuição biológica dos mesmos ⁽⁷⁹⁾.

De fato, os estudos mais recentes da química do tecnécio têm sido direcionados no sentido de se elaborar e preparar novos complexos cujas propriedades lipofílicas, eletrônicas e estéricas possam ser alteradas por uma simples substituição na estrutura molecular básica de um ligante de modo a otimizar sua biodistribuição e a afinidade por órgãos específicos ⁽³⁹⁾. Em outras palavras, reconhece-se, atualmente, a importância destas

propriedades físico-químicas no estabelecimento da atividade biológica dos compostos químicos, direcionando-se as pesquisas de novos radiofármacos para o estabelecimento de relações entre estrutura química e atividade biológica.

Estudos paralelos envolvem a caracterização dos complexos formados (utilizando-se métodos físicos e químicos que incluem análise elementar, espectroscopia de infra-vermelho, ressonância nuclear magnética, espectrometria de massa e cristalografia), bem como a aplicação de conhecimentos de biofarmácia e análise compartimental em estudos comparativos quantitativos de relação estrutura química-atividade biológica, para elucidar a distribuição, metabolismo e excreção dos complexos ^(55,79).

1.1 - IMPORTÂNCIA DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS NO DESENVOLVIMENTO DE RADIOFÁRMACOS DE TECNÉCIO-99m

O comportamento biológico de um complexo de ^{99m}Tc é determinado pela molécula como um todo. O metal central determina, primeiramente, a estabilidade do complexo, orientando a distribuição do(s) ligante(s) (geometria), determinante das propriedades eletrônicas e hidrofóbicas da face externa. É o ligante que está em contato direto com o sistema biológico determinando, desta forma, as propriedades biológicas do complexo, dentro das condições impostas pela própria geometria e carga. Pode-se dizer que o ligante apresenta uma face dirigida para o metal central (Tc), que é usada para coordenar o metal, e outra dirigida para o meio biológico e que irá interagir com este meio

Dentre as propriedades físico-químicas, a lipofilicidade tem atraído grande interesse em estudos de relação estrutura química-atividade biológica que a lipofilicidade, devido a sua relação direta com solubilidade na fase aquosa, permeação de membranas e sua contribuição na interação entre o ligante e o sítio receptor ⁽⁵⁹⁾.

O entendimento desta propriedade envolve, portanto, o conhecimento da estrutura, função e propriedades das membranas biológicas, bem como da estrutura e propriedades físico-químicas do fármaco tais como tamanho e forma da molécula, seu grau de ionização e lipossolubilidade relativa de suas formas neutra e ionizada ⁽⁵⁹⁾.

Na interação fármaco-membrana, a membrana pode atuar nas moléculas do composto prevenindo a difusão para o sítio ativo, ligando-se ou acumulando o composto. A difusão através da membrana pode se tornar a etapa limitante do processo. Além disto, a solvatação do composto em uma membrana pode levar a alteração conformacional em sua estrutura ^(59,97).

De modo inverso, o fármaco também pode atuar nas propriedades da membrana, alterando sua espessura ou fluidez, o potencial da membrana e a hidratação de grupos polares ^(59,97).

Os primeiros radiofármacos de tecnécio empregados com sucesso destinaram-se à avaliação de órgãos excretórios. De fato, existe um grande número de radiofármacos de ^{99m}Tc sendo utilizados para avaliação dos mecanismos de eliminação do organismo, ao contrário dos radiofármacos destinados à obtenção de imagens de órgãos não excretórios, que são de desenvolvimento mais recente ⁽⁷²⁾.

Em verdade, a hidrofiliabilidade associada à maioria dos complexos de tecnécio existentes, restringe o transporte destes radiofármacos através das membranas, impedindo o

uso dos mesmos nos estudos de imagem de órgãos não excretórios ou na medida da perfusão sanguínea regional ⁽⁷²⁾ .

Compostos extremamente hidrossolúveis são incapazes de atravessar barreiras lipídicas e ter acesso a órgãos ricos em lipídios, tais como o cérebro ou outros tecidos neuronais. Radiofármacos de tecnécio-99m, destinados à avaliação do fluxo sanguíneo regional cerebral devem ser lipofílicos de modo a atravessar a barreira hematoencefálica. A permanência destes compostos no cérebro, entretanto, estará condicionada a mecanismos de aprisionamento que geralmente envolvem a conversão das espécies neutras e lipofílicas em espécies polares hidrofílicas ⁽⁸⁸⁾ .

A barreira hematoencefálica promove uma separação funcional entre o sangue e o fluido extracelular do cérebro, protegendo o mesmo da penetração incontrolada de moléculas, íons, etc. e impedindo a troca livre de substâncias entre os compartimentos intra e extravascular ⁽⁸⁸⁾ . Para que uma substância atravesse a barreira hematoencefálica intacta, deve ser transportada por um processo mediado por carregador (como glicose por proteínas carregadoras) ou por difusão livre (como substâncias lipofílicas). Radiofármacos hidrofílicos não podem atravessar a barreira hematoencefálica a menos que alguma patologia a tenha alterado, aumentando, desta forma, sua permeabilidade ⁽⁸⁸⁾ .

O grau de ionização correlaciona-se diretamente com a solubilidade de compostos. O pKa de um composto é determinante de sua atividade biológica, uma vez que influencia tanto no transporte como na reatividade do composto em seu sítio de ação ^(16.84) .

Muitos fármacos são ácidos ou bases fracas apresentando-se parcial ou quase que totalmente ionizados, dependendo do pH do meio. A forma não ionizada é geralmente mais lipossolúvel do que a forma ionizada e difunde-se através das membranas biológicas por processo passivo, segundo um gradiente de concentração e de acordo com seu coeficiente de partição (P). A forma ionizada é absorvida por processo ativo e tem sua

distribuição condicionada pelo seu pKa e pelo pH do meio. Os fármacos geralmente ligam-se a receptores na forma ionizada ^(16,104) .

O coeficiente de partição (P) é definido como a relação das concentrações da substância nas fases orgânica e aquosa de um sistema de dois compartimentos sob condições de equilíbrio ⁽⁵⁹⁾ . Apesar do coeficiente de partição de muitos sistemas solvente orgânico/água terem sido utilizados nos primeiros estudos de relação estrutura química-atividade, o solvente orgânico n-octanol foi escolhido por representar um modelo apropriado dos constituintes lipídicos de uma membrana biológica devido a sua longa cadeia alquílica e ao grupo hidroxil polar, entre outras vantagens ⁽⁵⁹⁾ .

O coeficiente de partição pode também ser determinado utilizando-se cromatografia em camada delgada ou cromatografia líquida de alta eficiência, sendo tal técnica especialmente útil para solutos que apresentam certo grau de impureza ^(85,104) .

Além da hidrofobicidade, os aspectos eletrônicos também podem exercer papel importante na difusão do composto através das membranas biológicas e na ligação com o receptor ⁽¹⁰⁰⁾ .

O mecanismo de ação de um fármaco está diretamente relacionado com as forças interativas de sua ligação aos receptores. Tais forças são essencialmente as mesmas envolvidas na interação de todas as moléculas orgânicas. Assim, alguns tipos de interação fármaco-receptor são: ligação covalente, ligação iônica, ligação íon-dipolo e dipolo-dipolo, ligação hidrogênio, transferência de carga, interações hidrofóbicas e de van der Waals ⁽¹⁰⁷⁾ .

Ligações covalentes são muito fortes e a menos que uma enzima específica quebre esta ligação, é improvável a sua ruptura. Isto pode representar uma desvantagem para agentes farmacodinâmicos onde se espera um efeito reversível da ligação, ou uma vantagem para agentes quimioterápicos ⁽¹⁰⁷⁾ .

No pH fisiológico, alguns aminoácidos são protonados, originando centros positivamente carregados nas proteínas. Drogas contendo grupos carregados, especialmente ácidos carboxílicos, poderão se ligar a estes centros por interação iônica ou eletrostática, dependendo da distância entre as cargas e da constante dielétrica do meio que as separa. Ligações fortes, porém reversíveis, são ideais para agentes farmacodinâmicos, que devem se ligar ao receptor para dar início à resposta biológica e então se dissociar ^(84,107).

Da mesma forma, as características eletrônicas de um dado composto também determinam o grau de ligação às proteínas plasmáticas que, por sua vez, também relaciona-se com a difusão entre membranas ⁽⁷⁹⁾.

Interações eletrostáticas entre os centros de alta ou baixa densidade eletrônica na droga e o oposto no receptor, também oferecem oportunidades consideráveis para ligação. Como resultado das diferenças de eletronegatividade entre oxigênio, enxofre ou nitrogênio e carbono, ligações entre estes elementos são polarizadas com uma densidade eletrônica aumentada no heteroátomo e reduzida no átomo de carbono ⁽¹⁰⁷⁾.

As ligações de hidrogênio também podem desempenhar papel importante no processo de ligação, uma vez que ligações OH e NH são constituintes comuns das proteínas e muitos fármacos contém átomos eletronegativos. As ligações H se formariam entre os átomos de H de ligações OH e NH e átomos eletronegativos como oxigênio, nitrogênio e enxofre ⁽¹⁰⁷⁾. Tais átomos doadores de elétrons são constituintes comuns dos ligantes utilizados para complexação com tecnécio-99m e, além de participarem na formação do complexo, conferem aos mesmos características eletrônicas particulares.

Na interação fármaco-receptor, também devemos considerar as forças de van der Waals, resultantes da polarização natural da nuvem de elétrons, induzida por átomos quando se aproximam um do outro. As forças de van der Waals atuam em moléculas

polares e não polares e ocorrem por período de tempo extremamente curto (10^{-6} segundos) (84,107)

Além das propriedades eletrônicas e hidrofóbicas, o estudo dos aspectos estéricos envolvidos na interação entre ligantes e sítios biológicos aceptores correspondentes é de importância decisiva para compreensão do papel desempenhado pelas características estruturais em promover a atividade biológica ⁽¹⁰⁰⁾.

Ao ser introduzida na corrente sanguínea, as moléculas podem permanecer em circulação ou atravessar a membrana do endotélio capilar saindo do espaço intersticial ou ainda penetrar no espaço intracelular após ter atravessado as membranas externas e internas. Desta forma, com relação ao tamanho das moléculas pode-se estabelecer, primeiramente, limites de exclusão de algumas membranas ⁽⁷⁹⁾. Além disto, a teoria fármaco-receptor requer, de forma geral, que um ligante exerça sua ação biológica como consequência da ligação ou interação com receptores específicos, tais como proteínas de membrana, enzimas, etc, indicando que a estrutura tri-dimensional do ligante governa os princípios de reconhecimento e discriminação molecular, apesar do alto grau de flexibilidade presente nas biomacromoléculas ⁽¹⁰⁰⁾.

Os efeitos estéricos podem surgir de inúmeras formas. Um fator primário resulta da repulsão entre átomos não ligados. Tais repulsões podem determinar a influência estérica intramolecular de substituintes nas propriedades moleculares bem como intermolecular específica no ligante sobre o receptor. Estas influências estão relacionadas ao volume e arranjo espacial dos subfragmentos e substituintes ligados. Além disso, uma série de efeitos estéricos secundários tais como, alterações na solvatação de sítios ativos ou bloqueio pela interação de um grupo volumoso, podem estar envolvidos na determinação da variação da reatividade química ⁽¹⁰⁰⁾.

Outro aspecto importante a ser considerado é a especificidade estereoquímica. A correlação entre isomerismo geométrico e atividade biológica tem recebido pouca atenção uma vez que existem diferenças marcantes nas propriedades físico-químicas dos isômeros geométricos. Já no caso dos isômeros ópticos, as diferenças na atividade biológica são dependentes da habilidade do isômero em reagir seletivamente com o sistema biológico (84,100)

No caso de radiofármacos de tecnécio, quando os isômeros são formados após a complexação com o elemento radioativo, a necessidade de separação das espécies radioquímicas isoméricas geralmente inviabiliza a utilização do radiofármaco na rotina clínica.

As três propriedades consideradas, hidrofóbica, eletrônica e estérica podem ser expressas por meio de parâmetros que, além de contribuir para elucidação da distribuição farmacocinética de um composto e sua interação com sítios receptores, oferecem suporte metodológico e teórico para o planejamento racional de fármacos, que toma como base compostos com reconhecida atividade farmacológica, visando a identificação de análogos mais ativos, menos tóxicos ou mais seletivos do que o composto de partida (25,48,58,65,69,74,104,112)

Entre as diversas abordagens descritas na literatura, destaca-se o estudo das relações quantitativas estrutura-atividade, QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*), que visa determinar de forma quantitativa a influência de propriedades físico-químicas sobre a atividade biológica em séries de compostos análogos, permitindo o planejamento racional de análogos mais adequados às necessidades da Medicina atual (104,112)

1.2 - ESTUDOS FARMACOCINÉTICOS NO DESENVOLVIMENTO DE RADIOFÁRMACOS DE TECNÉCIO-99m

O estudo da cinética de radiofármacos *in vivo* tem sido a base do diagnóstico em Medicina Nuclear, com a observação de imagens sequenciais da chegada, distribuição e saída do radiofármaco de diferentes órgãos e sistemas. Além disso, os dados obtidos em estudos radiofarmacocinéticos permitem a realização de cálculos de doses de radiação absorvida por diferentes órgãos ⁽⁸¹⁾.

A avaliação da distribuição biológica serve de suporte para o desenvolvimento de novos radiofármacos, especialmente em estudos comparativos, uma vez que irá refletir as alterações estruturais, introduzidas em uma estrutura molecular básica. Tais alterações estruturais promovidas na molécula de um composto podem ocasionar alterações nas características farmacocinéticas, mais especificamente, na taxa de absorção, no volume de distribuição, na taxa e tipo de metabolismo, na ligação às proteínas plasmáticas e ainda na taxa e tipo de eliminação ^(81,96).

O objetivo da farmacocinética é descrever as alterações na concentração de fármacos e de seus metabólitos nos vários fluidos do organismo e tecidos em função do tempo. Equações matemáticas e modelos são utilizados para descrever os resultados experimentais e para obter parâmetros farmacocinéticos tais como constantes de velocidade de transferência (k), indicativas da absorção, metabolismo e eliminação do fármaco, volume de distribuição (Vd) e o grau de ligação às proteínas plasmáticas ⁽⁹⁶⁾.

A análise compartimental representa um modelo utilizado para definir quantitativamente a distribuição de um fármaco no organismo em função do tempo. Um compartimento, quase sempre, é um volume real de distribuição potencial da substância

podendo ser representado por um ou um conjunto de órgãos com características semelhantes de irrigação e de afinidade pelo fármaco ⁽⁸¹⁾.

A hipótese de compartimentalização envolve a utilização de modelos matemáticos, que permitem definir um certo número de parâmetros aos quais se pode atribuir valores numéricos, com o objetivo de aproximar-se ao máximo dos parâmetros biológicos. O modelo do qual se parte é sempre uma hipótese. Havendo concordância entre os parâmetros determinados experimentalmente e o modelo escolhido, pode-se considerar a hipótese de partida válida ⁽⁸¹⁾.

O modelo desenvolvido em termos matemáticos, isto é, descrito por uma série de equações, poderá ser testado contra todos os dados experimentais disponíveis. Desta forma, a metodologia de modelagem envolve não somente a postulação de um modelo (isto é, o esquema que o representa), mas também a transformação dos dados em parâmetros que descrevem este modelo, o teste de modelos alternativos e a programação de novos experimentos ⁽⁸¹⁾.

O primeiro passo para se chegar a um modelo de distribuição de fármacos consiste em analisar os resultados obtidos em diferentes amostragens experimentais, como por exemplo, a medida da captação sanguínea, em órgãos de interesse, no corpo inteiro e excreções, em função do tempo após a administração do radiofármaco, elaborando-se curvas que podem ser expressas por meio de equações matemáticas convenientes. Inicia-se, geralmente, com a construção da curva de captação sanguínea em função do tempo, a partir da qual pode-se decidir os experimentos subseqüentes e o tratamento matemático apropriado ^(31,91).

Para atingir o sítio de ação um composto deve ser transportado de seu ponto de administração pelos líquidos do organismo, em especial o sangue, que age como um transportador de substâncias estranhas introduzidas no organismo com finalidade

terapêutica ou diagnóstica. Em uma análise compartimentalizada, o sangue representa um compartimento central do qual o fármaco é distribuído para os tecidos e receptores específicos, para os órgãos de biotransformação e excreção, podendo cada um destes sítios ser considerado como um compartimento ^(17,23,31).

Após a introdução de um traçador na corrente sanguínea, este se distribui através dos compartimentos por um processo geralmente reversível rápido. A eliminação de uma substância de um determinado compartimento obedece a um processo de primeira ordem, isto é, a quantidade de substância que sai na unidade de tempo é proporcional à quantidade nele presente, definindo assim a propriedade de linearidade dos compartimentos. A excreção, bem como a biotransformação do fármaco são processos que caracterizam os mecanismos de eliminação ⁽²⁷⁾.

No sangue, o fármaco pode se apresentar dissolvido na fase aquosa, incorporado às células sanguíneas ou ainda ligado às proteínas plasmáticas. Nos dois últimos casos, para difundir-se para fora do sangue, o fármaco necessita primeiramente ser liberada na fase aquosa. O tempo que o composto permanece no sangue depende destes fatores de ligação, da capacidade do composto de atravessar as barreiras biológicas e dos mecanismos de eliminação envolvidos ⁽³¹⁾.

A cinética do composto no sangue difere de acordo com a droga e também de acordo com a via de administração empregada. As curvas mais simples são obtidas após administração endovenosa e tornam-se mais complexas quando o traçador é administrado por via oral, retal ou por injeção intramuscular.

No caso da administração endovenosa, a curva pode assumir a forma de uma simples exponencial (Equação 1), ou de uma série de exponenciais (Equação 2).

$$C(t) = C_1 \cdot e^{-\lambda_1 t} \quad (1)$$

$$C(t) = \sum_{i=1}^n C_i \cdot e^{-\lambda_i t} \quad (2)$$

Nestas equações que descrevem a variação da concentração do composto no sangue ou plasma em função do tempo, $C(t)$ é a concentração no tempo t ; C_i são as concentrações extrapoladas sobre o eixo das ordenadas na curva concentração versus tempo para cada componente exponencial da curva (concentração no tempo zero); as constantes λ_i , representadas pela inclinação de cada componente da curva, são constantes de velocidade híbridas, uma vez que representam uma combinação dos processos de distribuição, difusão e eliminação do compartimento central, determinados pelas constantes de velocidade de transferência (k) ^(27,81,110).

Para drogas que sofrem processo de transformação metabólica e excreções múltiplas em vários compartimentos do organismo, a cinética sanguínea irá indicar vários coeficientes de transferência. Na verdade, cada uma das curvas experimentais pode ser expressa matematicamente por uma somatória de termos exponenciais. O número de compartimentos com trocas reversíveis necessários para reproduzir os dados experimentais é, no mínimo, igual ao número de termos exponenciais da curva plasmática ^(27,31,91).

A análise das curvas experimentais pode ser feita utilizando-se programas de computador adequados, alimentados, basicamente, com os dados experimentais das diferentes amostragens efetuadas em função do tempo após a administração do fármaco. As curvas experimentais podem ser traduzidas em funções exponenciais, e um modelo

apropriado permite a determinação de equações diferenciais que podem ser integradas de modo a simular a distribuição biológica do radiofármaco no sistema estudado ^(17,23,81) .

O modelo, por sua vez, traduzindo a distribuição do radiofármaco, permite a interpretação dos resultados experimentais de forma quantitativa e dinâmica.

2 - UTILIZAÇÃO DE LIGANTES AMINOTIÓLICOS NA PRODUÇÃO DE RADIOFÁRMACOS DE TECNÉCIO-99m: DESENVOLVIMENTO DE RADIOFÁRMACOS RENAIIS E CEREBRAIS

Por muitos anos, os radiofármacos de tecnécio utilizados para mapear o cérebro, tais como o ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA), gluco-heptonato de sódio, pirofosfato de sódio ou o próprio pertecnetato de sódio, eram excluídos do tecido cerebral normal pela presença da barreira hematoencefálica intacta, limitando-se, assim, à medida da integridade da barreira. Por volta dos anos 70, entretanto, a Medicina Nuclear começou a dar menor ênfase à medida da integridade da barreira hematoencefálica e maior ênfase à determinação regional do fluxo sanguíneo cerebral, metabolismo de glicose e utilização de oxigênio ⁽⁷¹⁾ .

O valor clínico da medida do fluxo sanguíneo regional cerebral tem sido, há muito, reconhecido. Variações locais no fluxo podem ser associadas a doenças cerebrais vasculares e outras desordens neurológicas ^(71,72,86) .

O interesse por radiofármacos capazes de atravessar a barreira hematoencefálica aumentou consideravelmente com os resultados clínicos obtidos nas imagens de Tomografia Computadorizada por Emissão de Pósitrons (*PET - Positron Emission Tomography*), utilizando compostos marcados com ^{15}O , ^{13}N , ^{11}C e ^{18}F , com especial interesse para ^{18}F -flúor-deoxiglicose ^(11,34,35,36,37,88,89,102). Tais agentes, entretanto, não têm sido utilizados de forma difundida em diagnóstico, devido ao alto custo dos estudos de *PET* ^(49,71).

Estudos utilizando aminas radiomarcadas com emissores gama, que se difundem passivamente através da barreira hematoencefálica intacta, demonstraram a possibilidade de utilização da Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único (*SPECT - Single Photon Emission Computer Tomography*) na aquisição de imagens cerebrais. Estes radiofármacos incluem aminas radioiodadas que possuem alta captação e períodos de retenção cerebral relativamente longos ^(49,129).

Das várias aminas estudadas, N-isopropil- ^{123}I iodoanfetamina (IMP- ^{123}I) ^(22,49,60,88,89,98,130) e N,N,N'-trimetil-N-(2-hidroxi-3-metil-5- ^{123}I iodobenzil)-1,3-propano diamina (HIPDM- ^{123}I) ^(21,63,88) (Figura 1), demonstraram características favoráveis para medida do fluxo sanguíneo cerebral regional em humanos e sua correlação com diferentes estados patológicos. Entretanto, o tempo de meia vida relativamente curto do ^{123}I (13,3 horas), dificultam o desenvolvimento de um sistema eficiente de distribuição comercial das aminas marcadas, inviabilizando sua utilização rotineira na maioria dos serviços de Medicina Nuclear em especial naqueles distantes dos locais de produção ^(50,109).

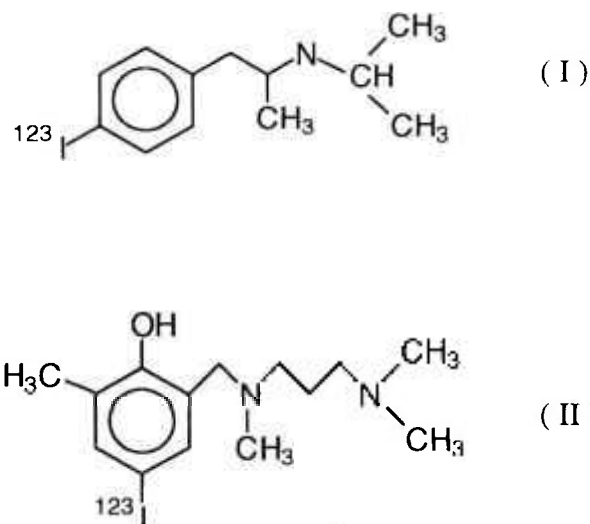


Figura 1 - Estrutura química de IMP-¹²³I (I) e HIPDM-¹²³I (II)

Os inconvenientes mencionados na utilização de isótopos emissores de pósitrons bem como de ¹²³I estimularam ainda mais a obtenção de compostos marcados com ^{99m}Tc capazes de atravessar a barreira hematoencefálica.

Compostos do tipo aminotiol ou mercaptoaminas são conhecidos por formarem complexos estáveis com tecnécio do tipo $Tc(N)_n(S)_n$ ou $TcO(N)_n(S)_n$.

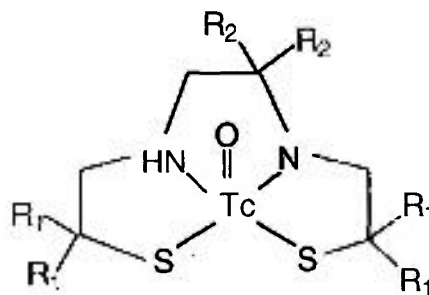
Burns e colaboradores ⁽²⁰⁾ foram os primeiros a demonstrar que ligantes do tipo bis-aminotiol (BAT) ou diaminoditiol (DADT), N_2S_2 , formam quelatos neutros e lipofílicos com ^{99m}Tc.

Subseqüentemente, Kung e colaboradores ⁽⁶²⁾ sintetizaram uma série de derivados BAT alquil substituídos para marcação com ^{99m}Tc (Figura 2). Todos os derivados N_2S_2 reagiram com o tecnécio reduzido para formar quelatos cuja estrutura está representada na Figura 2. São complexos pentacoordenados de oxotecnécio (V), com o átomo de tecnécio unindo-se a dois átomos de nitrogênio e dois de enxofre, formando a

base de uma estrutura piramidal cujo ápice é representado pela ligação com o átomo de oxigênio.

Após complexação com o núcleo TcO^{+3} , três dos quatro prótons ionizáveis no ligante N_2S_2 (dois S-H e um N-H), são perdidos para neutralizar a carga +3. Assim, três dos grupos doadores têm geometria sp^3 enquanto um (o átomo de N deprotonado) é sp^2 (124).

O trabalho de Kung e colaboradores (62), demonstrou que os complexos de ^{99m}Tc com derivados BAT mais lipofílicos apresentam boa penetração na barreira hematoencefálica e alta eficiência de extração cerebral, refletindo o fluxo sanguíneo regional, com evidências claras de captação inicial maior na matéria cinzenta em relação à matéria branca. Contudo, tais compostos apresentaram redistribuição cerebral nos primeiros 15 minutos, resultando em distribuição homogênea da radioatividade, atribuída à ausência de um mecanismo de aprisionamento destinado a prevenir o transporte através da membrana celular nos dois sentidos.



R1: CH₃ CH₃ C₂H₅

R2: H CH₃ H

Figura 2 - Estrutura química dos complexos BAT- ^{99m}Tc

Esforços subseqüentes foram concentrados na obtenção de complexos BAT-^{99m}Tc com estabilidade e lipossolubilidade similares que fossem aprisionados intracelularmente no cérebro por um período compatível com a aquisição de imagens.

No desenvolvimento das aminas marcadas com ¹²³I, utilizou-se o mecanismo aprisionamento em função do pH ⁽⁶¹⁾. De acordo com este mecanismo, uma molécula lipossolúvel contendo um substituinte amínico seria aprisionada intracelularmente assim que a espécie amínica, positivamente carregada, entrasse no cérebro, baseado na relativa acidez do meio intracerebral (pH 7,0) quando comparada ao meio extracelular (pH 7,4) ⁽⁶¹⁾.

Apesar do sucesso das aminas marcadas com ¹²³I não poder ser atribuído exclusivamente a este mecanismo, a hipótese do pH serviu de base para elaboração de novos complexos BAT-^{99m}Tc, com cadeias laterais amínicas ^(42,68).

Efange e colaboradores ⁽⁴²⁾, sintetizaram dois derivados BAT, designados por DEA e TMPDA, com cadeias laterais amínicas (Figura 3).

Cada complexo formado com ^{99m}Tc foi obtido como mistura de dois isômeros, *syn* e *anti*, separados por CLAE. Ambos os isômeros do TMPDA-^{99m}Tc apresentaram baixa captação cerebral quando comparados com os isômeros do DEA-^{99m}Tc. Destes, a espécie *syn* apresentou captação significativa e persistente.

Os coeficientes de partição destes compostos sugerem penetrabilidade da barreira hematoencefálica. Contudo, o comportamento biológico dos isômeros do TMPDA-^{99m}Tc indica claramente que a lipofilicidade é uma condição necessária mas insuficiente para penetrabilidade da barreira. Segundo o autor ⁽⁴²⁾, a elevada basicidade desta amina atua sobre a magnitude de alteração do coeficiente de partição como função do pH. Os isômeros de TMPDA-^{99m}Tc apresentam alteração do coeficiente de partição de um fator de 2,5 (entre

pH 7,0 e 7,4) enquanto que os isômeros do DEA-^{99m}Tc apresentam apenas pequena alteração.

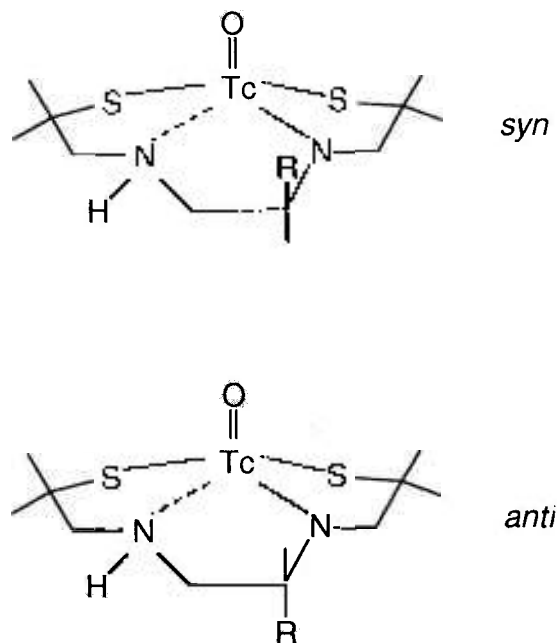


Figura 3 - Estrutura dos complexos BAT-^{99m}Tc isoméricos

DEA: R = CH₂N(C₂H₅)₂

TMPDA: R = CH₂N(CH₃)(CH₂)₃N-(CCH₃)₂

Apesar da penetrabilidade e permanência satisfatórias do isômero *syn* do DEA-^{99m}Tc, a necessidade de separação das formas isoméricas após a marcação dificulta sua utilização clínica.

Paralelamente ao desenvolvimento dos derivados BAT, Volkert e colaboradores⁽¹²³⁾ iniciaram o desenvolvimento de uma nova classe de complexos de ^{99m}Tc, baseada no ligante propilenaminoxima (PnAO) (Figura 4 (I)), que também forma um complexo neutro e lipofílico com ^{99m}Tc. É um complexo pentacoordenado, com estrutura de pirâmide

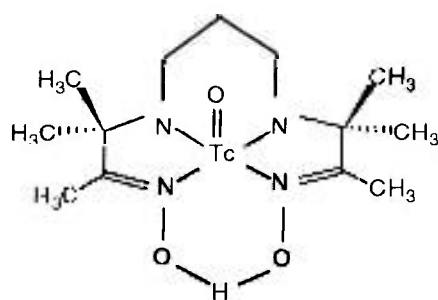
quadrada, no qual o tecnécio se une a quatro átomos de nitrogênio e um de oxigênio no ápice da pirâmide.

Dos vários derivados PnAO posteriormente investigados, a hexametilpropilenaminaoxima (HM-PAO), mostrou características de captação e retenção cerebral pertinentes para utilização clínica. De fato, o HM-PAO existe em duas formas isoméricas, meso e d,l (Figura 4 (II)). Apesar dos estudos clínicos originais terem sido conduzidos com uma mistura destas duas formas isoméricas, demonstrou-se, posteriormente, que um dos diastereoisômeros, o d,l-HM-PAO, origina um complexo de ^{99m}Tc com captação e retenção cerebral superiores quando comparado ao complexo originado da mistura estereoisomérica ⁽⁸²⁾.

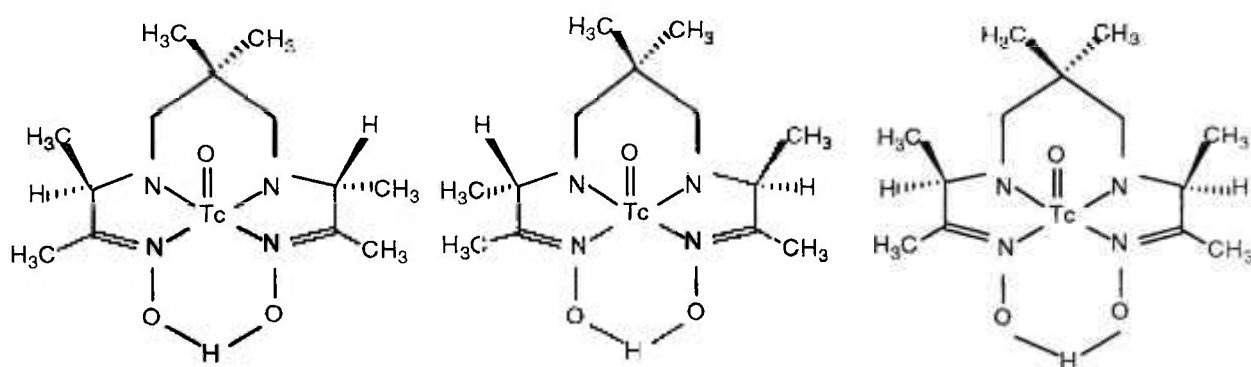
Além disso, sua distribuição reflete o fluxo sanguíneo regional cerebral e promove a aquisição de imagens cerebrais de alta qualidade em pacientes com uma variedade de desordens cerebrovasculares e neurológicas ^(7,66,80,82,83,99,124).

O mecanismo de retenção cerebral do complexo d,l-HM-PAO- ^{99m}Tc parece envolver a conversão do quelato lipofílico a produtos hidrofílicos em presença de glutatona ^(7,80,83,124).

Apesar do complexo d,l-HM-PAO- ^{99m}Tc representar um grande avanço para avaliação rotineira da perfusão cerebral, estudos radioquímicos demonstram considerável conversão do complexo primário em um complexo secundário, cerca de 30 minutos após a marcação, limitando o tempo de utilização do material ^(51,52,82). Além disto, a perda do complexo primário é acentuada quando se utiliza ^{99m}Tc eluído há mais de duas horas, quando se emprega uma alta concentração radioativa ou quando se utiliza um gerador não previamente eluído dentro de um período de 24 horas. Esta última característica depende da procedência do gerador ^(51,52,82).



(I)



(II)

**Figura 4 - Estrutura dos complexos formados com ^{99m}Tc de:
PnAO (I); -d,l e meso-HM-PAO (II)**

Dando prosseguimento à busca por um composto marcado com ^{99m}Tc para imagens de fluxo sanguíneo cerebral regional, Cheesman e col. ⁽²⁸⁾ consideraram vários mecanismos potenciais que promoveriam retenção adequada do composto sem interferir na distribuição como função do fluxo. Uma transformação química *in vivo*, bem caracterizada, de um complexo lipofílico em espécies que pudessem ser aprisionadas no cérebro, preencheria estas características. Devido a presença de esterases no cérebro, os autores consideraram a possível hidrólise de um éster em um ácido carboxílico. Assim, sintetisaram

ligantes do tipo BAT com grupamentos ésteres incorporados e prepararam os complexos de oxo- $^{99m}\text{Tc(V)}$ correspondentes ⁽²⁸⁾.

Dentre estes ligantes, destacam-se os isômeros D,D e L,L de N,N'-bis-(1-carboetoxi-2-mercaptop) etilendiamina (ECD) (Figura 5). A farmacologia do complexo formado com ^{99m}Tc está intimamente associada à estereoquímica do composto ^(41,124,127).

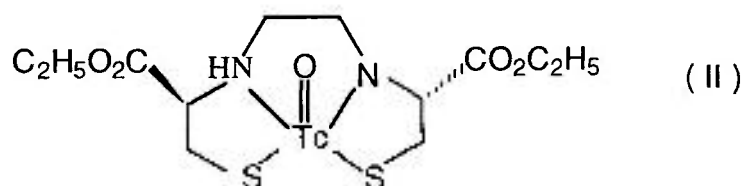
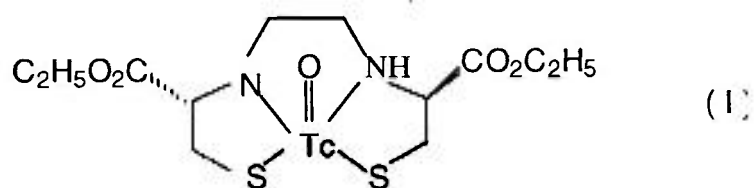


Figura 5 - Estrutura dos complexos D,D (I) e L,L-ECD- ^{99m}Tc (II)

Estudos cintilográficos realizados em macacos demonstraram que ambos os complexos atravessam a barreira hematoencefálica e oferecem imagens similares cerca de 5 minutos após a administração da dose. Imagens mais tardias, contudo, evidenciaram o clareamento total do D,D-ECD- ^{99m}Tc do cérebro e a retenção do L,L-ECD- ^{99m}Tc . De fato, L,L-ECD- ^{99m}Tc é um complexo estável, neutro e lipofílico que atravessa a barreira

hematoencefálica e é retido no cérebro em um padrão consistente com a perfusão cerebral regional⁽¹²⁷⁾.

Vários estudos têm sido realizados em indivíduos voluntários indicando a utilização promissora do complexo L,L-ECD-^{99m}Tc na avaliação da perfusão regional cerebral⁽⁶⁷⁾ e na avaliação de desordens cerebrais^(50,111,113). A excelente estabilidade do complexo (maior que 6 horas) oferece uma vantagem potencial para uso rotineiro^(111,127).

A retenção cerebral do complexo está, provavelmente, relacionada a sua transformação *in vivo* por meio de hidrólise enzimática de uma das funções éster, conforme demonstrou Walovitch e col.⁽¹²⁸⁾, incubando homogenatos de córtex cerebral de macaco com L,L-ECD-^{99m}Tc e observando a rápida conversão do complexo a uma forma complexada mais polar.

Estudos realizados *in vivo* pelo mesmo autor, utilizando-se indivíduos normais verificaram a presença de metabólitos no sangue e urina. No sangue, a taxa composto:metabólito encontrada foi de 1:1 aos 4 minutos e 1:10 aos 60 minutos após injeção. A atividade urinária era correspondente aos metabólitos de-esterificados do L,L-ECD (formas mono-éster isoméricas e a di-ácida) (Figura 6)⁽¹²⁵⁾.

Durante o estudo do comportamento biológico dos metabólitos do L,L-ECD-^{99m}Tc^(118,119,120), verificou-se que o derivado di-ácido, L,L-Etilenodicisteína-^{99m}Tc (L,L-EC-^{99m}Tc) (Figura 6), era rapidamente depurado do sangue e excretado eficientemente pelos rins na urina. Em função de tal observação passou-se a investigar a potencialidade de tal metabólito como agente de função renal.

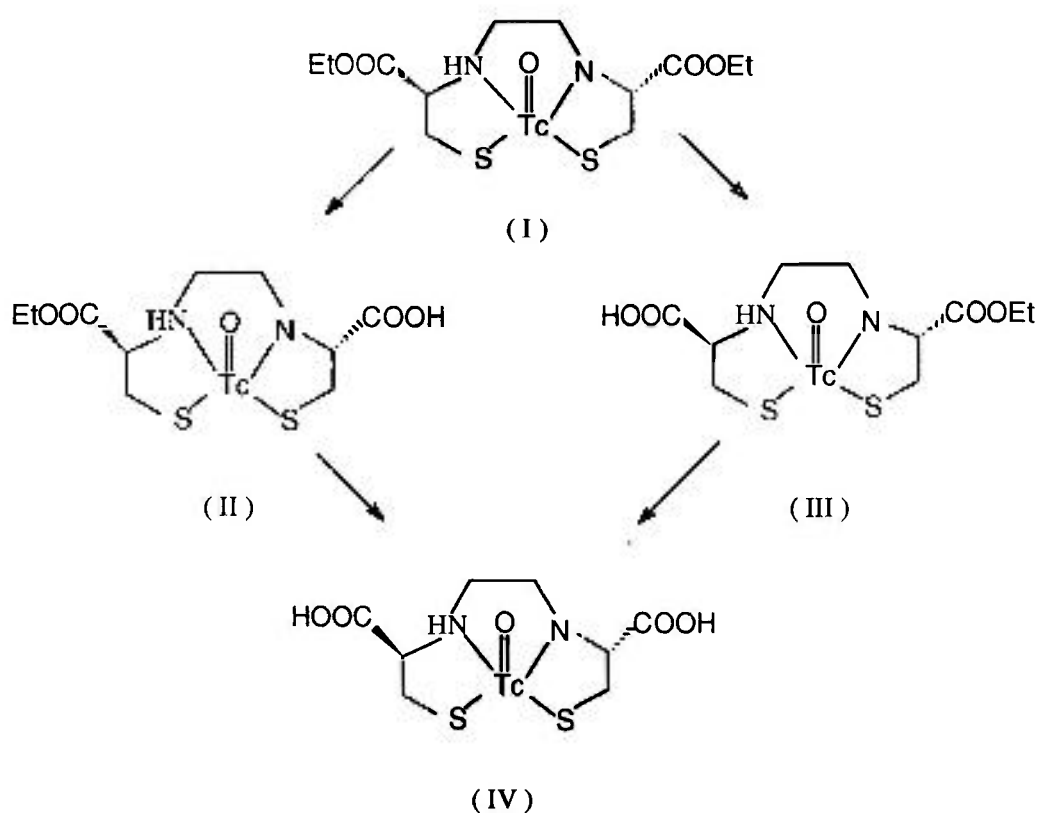


Figura 6 - Estrutura do complexo L,L-ECD-^{99m}Tc e seus metabólitos formados por

hidrólises sucessivas da função éster:

(I) - L,L-ECD-^{99m}Tc

(II) e (III) - Formas mono-éster/mono-ácida

(IV) - L,L-EC-^{99m}Tc

Ao contrário do agente de perfusão cerebral, que deve apresentar alta lipossolubilidade, um agente para estudo funcional renal deve apresentar alta especificidade para excreção e baixa retenção no organismo, permitindo a avaliação de importantes funções tais como, a filtração glomerular, a secreção e reabsorção tubular e outras características que por ventura possam influenciar no diagnóstico a ser realizado ⁽⁴⁵⁾.

A avaliação da função tubular renal é feita com a determinação de um índice clínico importante, o Fluxo Plasmático Renal Efetivo (FPRE). Um radiofármaco destinado à medida do FPRE deve possuir características estruturais peculiares que garantam não somente a eficiência de ligação às proteínas transportadoras, localizadas na parede das células tubulares, como também a capacidade de introduzi-lo no interior de tais células e, posteriormente, na luz do túbulo renal ⁽³⁸⁾.

O o-iodo-hipurato de sódio (OIH), marcado com ¹³¹I (Hipuran-¹³¹I), desenvolvido por Tubis em 1960, é um dos radiofármacos com características estruturais convenientes e comercialmente disponível para o estudo da função tubular renal (Figura 7) ^(10, 29, 45). Entretanto, alguns inconvenientes, tais como, aumento da concentração de iodeto livre na preparação em função do tempo de armazenagem, dose de radiação absorvida pelo paciente relativamente alta e aquisição de imagens cintilográficas de resolução baixa, sugerem o desenvolvimento de novos radiofármacos, em especial marcados com tecnécio-^{99m}.

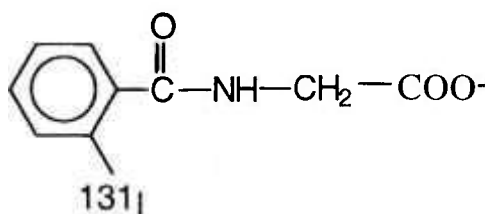


Figura 7 - Estrutura do Hipuran-¹³¹I

Em 1979, Davison e colaboradores ⁽³²⁾ introduziram uma classe de agentes quelantes para marcação com ^{99m}Tc, do tipo diaminoditiol, com destaque para o N,N'-bis(mercaptoacetamida)-etilendiamina (DADS). Seu derivado carboxilado, DADS-CO₂, foi sintetizado por Fritzberg e colaboradores ⁽⁴⁷⁾ em 1982 (Figura 8).

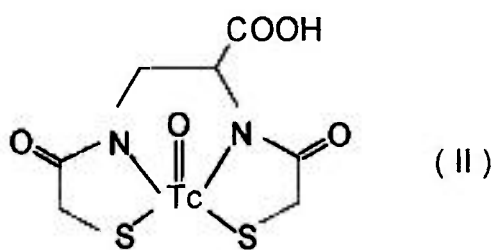
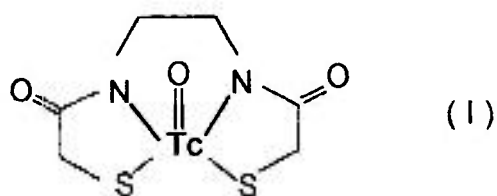


Figura 8 - Estrutura dos complexos DADS-^{99m}Tc (I) e DADS-CO₂-^{99m}Tc (II)

Chervu e colaboradores ⁽²⁹⁾ sintetizaram, em 1984, um derivado do ácido p-amino-hippúrico para marcação com ^{99m}Tc, denominado, simplifcadamente, de PAHIDA (ácido p-[(bis-carboximetil)aminometilcarboxiamino]hippúrico), (Figura 9).

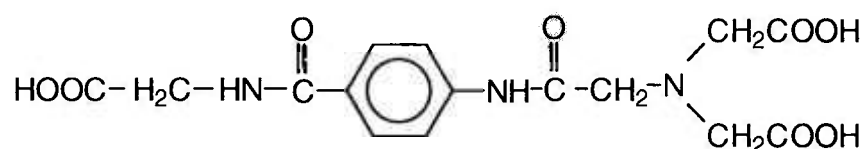


Figura 9 - Estrutura do PAHIDA

Entretanto, os três compostos citados apresentam problemas que impedem ou dificultam sua utilização clínica. O DADS-^{99m}Tc, apresenta elevada fração de captação hepática em indivíduos com função renal comprometida ^(47,57). DADS-CO₂, ao se complexar com ^{99m}Tc, promove formação de epímeros quelados com somente um dos isômeros apresentando propriedades biológicas satisfatórias ^(47,70). Quanto ao PAHIDA-^{99m}Tc, apresenta depuração renal diminuída quando comparada ao Hipuran-¹³¹I relacionada, provavelmente, à metabolização a nível renal do composto, bem como a possíveis impedimentos estéricos na interação com os receptores tubulares ^(4,101,131).

Um outro composto para marcação com ^{99m}Tc, do tipo N₃S, também sintetizado por Fritzberg e colaboradores ⁽⁴⁶⁾ em 1986, merece destaque pela similaridade de comportamento fisiológico com Hipuran-¹³¹I. Trata-se do Mercaptoacetilglicilglicina-^{99m}Tc (MAG₃-^{99m}Tc), (Figura 10).

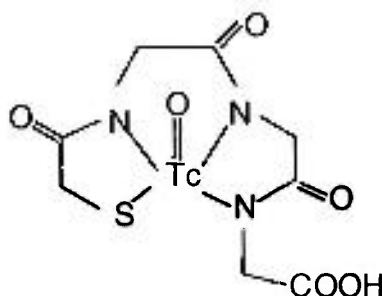


Figura 10 - Estrutura do complexo $\text{MAG}_3\text{-}^{99\text{m}}\text{Tc}$

Apesar de muitos estudos demonstrarem uma forte correlação entre a depuração de $\text{MAG}_3\text{-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ e $\text{Hipuran-}^{131}\text{I}$, existem diferenças significantes em seus comportamentos biológicos. A ligação do $\text{MAG}_3\text{-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ às proteínas plasmáticas é relativamente alta e o clareamento plasmático em humanos é aproximadamente 65% do $\text{Hipuran-}^{131}\text{I}$ ^(1,18,19,53,106). Além disso, os dois agentes não se comportam de forma similar em todas as situações clínicas. Alguns estudos demonstram a não proporcionalidade entre o clareamento sanguíneo dos dois compostos e sugerem que o $\text{MAG}_3\text{-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ possa não ser o substituto ideal para o $\text{Hipuran-}^{131}\text{I}$ ^(93,105,117).

Um estudo comparativo entre $\text{MAG}_3\text{-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ e $\text{L,L-EC-}^{99\text{m}}\text{Tc}$, efetuado em indivíduos voluntários normais, revelou que o último apresenta excreção urinária similar ao primeiro, taxa rim/radiação de fundo maior e captação hepática desprezível. A depuração plasmática, segundo o mesmo estudo, é mais rápida para o $\text{L,L-EC-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ ⁽¹¹⁵⁾.

A comparação entre $\text{L,L-EC-}^{99\text{m}}\text{Tc}$, $\text{MAG}_3\text{-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ e $\text{Hipuran-}^{131}\text{I}$, realizada em pacientes com doença renal obstrutiva revela que o $\text{L,L-EC-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ é um bom substituto do

Hipuran-¹³¹I na rotina de obtenção de imagens renais, promovendo imagens de alta qualidade e doses baixas de radiação para o paciente, tal qual MAG_3 -^{99m}Tc. A vantagem do L,L-EC-^{99m}Tc sobre o MAG_3 -^{99m}Tc residiria na captação hepática mais baixa e simplicidade de preparação ⁽⁸⁷⁾ .

Todos estes resultados favoráveis, aliados à facilidade de síntese e marcação do composto L,L-EC, estimulam a pesquisa de propriedades físico-químicas e biológicas que consagrem a utilização deste novo radiofármaco renal na rotina clínica, em substituição ao Hipuran-¹³¹I.

II - OBJETIVO

É notório o interesse da classe médica nuclear brasileira pela introdução de compostos marcados com ^{99m}Tc tanto para avaliação da função tubular renal, como para avaliação da perfusão cerebral. Os radiofármacos L,L-EC- ^{99m}Tc e L,L-ECD- ^{99m}Tc parecem preencher, respectivamente, as características necessárias para realização de tais estudos e têm sido alvo de várias investigações no que diz respeito à otimização das condições de marcação com ^{99m}Tc bem como avaliação das propriedades biológicas ^(67,87,113,115,116,119,127).

A escolha dos compostos em estudo baseou-se, certamente, no interesse clínico que apresentam, representando este trabalho uma oportunidade de padronização de conjuntos reativos liofilizados de L,L-EC e L,L-ECD a serem utilizados pela comunidade médica nuclear brasileira. Tal padronização envolve a síntese e caracterização dos compostos, o estudo dos parâmetros envolvidos na etapa de marcação com ^{99m}Tc e a avaliação das condições de liofilização dos produtos, obtendo-se conjuntos de reativos com estabilidade compatível com a produção, armazenamento e comercialização.

A avaliação da distribuição biológica dos complexos L,L-EC- ^{99m}Tc e L,L-ECD- ^{99m}Tc em animais representa parte importante e imprescindível do processo de padronização dos respectivos conjuntos reativos liofilizados. A obtenção de modelos compartimentalizados de distribuição biológica destes complexos permitirá estabelecer uma análise comparativa, avaliando a influência da estrutura química nos parâmetros farmacocinéticos dos mesmos.

Trabalhando somente com dois compostos, não poderemos, obviamente, realizar um estudo de QSAR, uma vez que este demanda a utilização de uma série de compostos. O presente trabalho, entretanto, salienta a importância da relação entre

estrutura química e atividade biológica de radiofármacos, avaliada a partir de parâmetros farmacocinéticos, e representa um passo inicial para elaboração futura de novos radiofármacos cerebrais e/ou renais, envolvendo a síntese de compostos com núcleo $TcO(N_2S_2)$ com diferentes substituintes, racionalmente escolhidos.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

1 - MATERIAIS

1.1 - REAGENTES E SOLUÇÕES

- . Acetona - grau de pureza p.a., Merck
- . Acetonitrila - grau de pureza p.a., Merck
- . Ácido acético glacial - grau de pureza p.a., Merck
- . Ácido clorídrico - grau de pureza p.a., Merck
- . Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) - grau de pureza p.a., Qeel
- . Ácido Formamidino sulfônico (AFS) - grau de pureza p.a., Sigma
- . Ácido R-(-)Tiazolidino-4-carboxílico - grau de pureza p.a. Aldrich
- . Ácido Tricloroacético (ATC)- grau de pureza p.a., Merck
- . Amônia gasosa - 99% pureza, White Martins
- . Ascorbato de estanho (*TINASC*) - frascos liofilizados contendo 20,2mg de Sn (II), preparados de acordo com procedimento previamente descrito⁽⁸⁾
- . Cloreto de amônia - grau de pureza p.a., Merck
- . Cloreto de sódio - grau de pureza p.a., Merck
- . Cloreto estanoso ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) - grau de pureza p.a., Merck
- . Clorofórmio - grau de pureza p.a., Merck
- . Etanol - grau de pureza p.a., Merck

- Heparina - solução 5000UI/ml - *LIQUEMINE*, Roche
- Hidróxido de sódio - grau de pureza p.a., Merck
- Manitol - grau de pureza p.a., Nuclear
- Nitrogênio gasoso, White Martins
- Pentobarbital sódico 3% - Qeel
- Pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) - solução eluída de gerador ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$, *IPEN-TEC*, IPEN-CNEN/SP
- Sódio metálico - Merck
- Uretana - Sigma

1.2 - EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético/aquecedor, modelo 752A, Fisatom, Brasil
- Aparelho para determinação de ponto de fusão em capilar, Mettler, modelo FP-5
- Aparelho para análise elementar, Elemental Analyser 2400 CHN, Perkin Elmer
- Balança modelo HM 100, Helmac, Brasil
- Calibrador de radioisótopos, modelo Mediac, Nuclear Chicago, Estados Unidos
- Câmara de cintilação, Ohio Nuclear, modelo ON 100
- Centrífuga modelo GLC-L, Sorval, Estados Unidos
- Contador automático tipo poço, com cristal de NaI(Tl), modelo ANSR, Abbot, Brasil
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo 480c, C.G., Brasil
- Espectrofotômetro F.T.I.R. 1750, Perkin Elmer
- Espectrômetro de RMN, 80MHz, Bruker
- Evaporador rotatório, Buchler, Estados Unidos

- Liofilizador, modelo L4KR com câmara, Edwards, Brasil

1.3 - OUTROS

- Fitas de alumínio empregnadas com sílica gel para cromatografia em camada delgada (CCD-SG) - DC-Alufohlen-Kieselgel 60, Merck
- Membrana filtrante de poro 0,22 μ m, Millipore
- Coluna cromatográfica para cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa, Nucleosil C18 (250 x 4,6mm; 5 μ m), Instrumentos Científicos C.G.

1.4 - ANIMAIS

- Camundongos *Swiss*, adultos, pesando entre 25 e 30 g, alimentados com ração comercial e água - biotério do IPEN- CNEN/SP
- Coelho *New Zeland* pesando aproximadamente 3,5 kg - Divisão experimental do Instituto do Coração, São Paulo
- Cão pesando aproximadamente 10 kg - Divisão experimental do Instituto do Coração, São Paulo

2 - MÉTODOS

2.1 - PREPARAÇÃO DE L,L-ETILENODICISTEÍNA (L,L-EC) E L,L-ETILENODICISTEÍNA DIETIL ÉSTER (L,L-ECD)

A L,L-etilenodicisteína, N,N'-bis-L-(1-carboxi-2-mercapto) etiletenodiamina (II), é um dímero de cisteína que pode ser obtido pela redução com sódio metálico do ácido R-(-)tiazolidino-4-carboxílico (I) em amônia líquida, como descrito por Blondeau e col. e representado na Figura 11 ⁽⁹⁾.

Em frasco de três bocas de 500 ml, sob agitação magnética, imerso em banho de gelo seco/acetona e equipado com condensador para amônia (dedo frio), coletaram-se 120 ml de amônia líquida. Adicionaram-se 13,2g do ácido R-(-)tiazolidino-4-carboxílico e, em seguida, o sódio metálico em pedaços pequenos, até o aparecimento de coloração azul intensa persistente por mais de 15 minutos (aproximadamente 8,0g de sódio metálico). Adicionou-se uma pequena porção de cloreto de amônia anidro até desaparecimento da coloração azul. Evaporou-se a amônia líquida, dissolveu-se o resíduo em água destilada e filtrou-se. O pH do filtrado foi ajustado para 2,0 com ácido clorídrico concentrado promovendo a precipitação do composto.

Após permanecer em banho de gelo por algumas horas, o precipitado foi filtrado, lavado com cerca de 300ml de água destilada em três porções e retomado em 100 ml de água destilada. O produto foi purificado por sucessivas precipitações de seu sal sódico com ácido clorídrico. A forma monomérica (N-metil-cisteína) (III) foi obtida a

partir da evaporação do filtrado e águas de lavagem combinados e extração com etanol, seguida de evaporação do solvente.

O dicloridrato de L,L-Etilenodicisteína dietil éster ou dicloridrato de N,N'-bis-L-(1-carboxi-2-mercapto)etiletilendiamina (IV), pode ser obtido pela esterificação do dímero L,L-Etilenodicisteína, utilizando-se etanol anidro saturado com gás clorídrico conforme representado na Figura 11 ⁽⁹⁾.

Em frasco de três bocas de 500 ml, equipado com um condensador, sob agitação magnética, misturaram-se 4,0g do dímero L,L-EC a 100 ml de etanol anidro. Saturou-se a mistura reagente com gás clorídrico, mantendo-a em refluxo por 5 horas. A mistura resultante foi resfriada em banho de gelo, filtrada e lavada com etanol anidro. O produto foi recristalizado sucessivas vezes de etanol anidro quente.

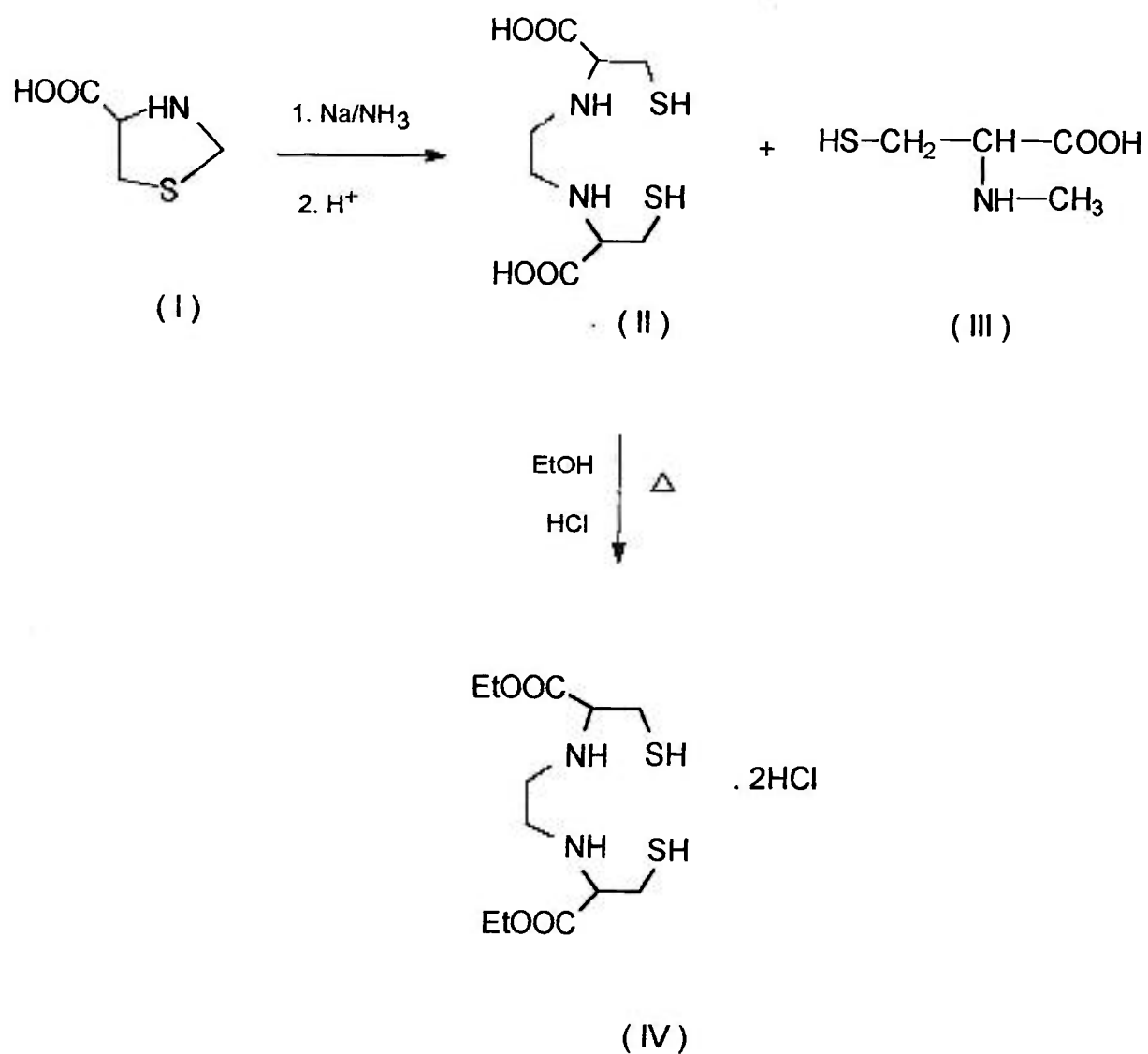


Figura 11 - Esquema reacional: obtenção de L,L-EC e L,L-ECD:

(I) - ácido R-(-)Tiazolidino-4-carboxílico

(II) - L,L-Etilenodicisteína (L,L-EC)

(III) - N-metil-cisteína

(IV) - L,L-Etilenodicisteína dietil éster (L,L-ECD)

2.2 - ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

. **FAIXA DE FUSÃO** - as determinações das faixas de fusão dos compostos obtidos foram realizadas em tubo capilar.

. **ANÁLISE ELEMENTAR** - as análises elementares de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio foram realizadas no Laboratório de Análise Elementar do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

. **ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO** - os espectros no infravermelho utilizados para identificação dos compostos foram registrados em espectrofotômetro no Instituto de Química da Universidade de São Paulo; as amostras foram analisadas no estado sólido, em pastilhas de KBr.

. **ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA** os espectros de RMN-¹H, foram obtidos em espectrômetro 80MHz, no Laboratório de Análise Instrumental do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, utilizando-se D₂O 99% com 1% de TMS como padrão de referência interna.

2.3 - ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE MARCAÇÃO COM ^{99m}Tc

2.3.1 - MARCAÇÃO DE L,L-EC COM ^{99m}Tc

O complexo L,L-EC- ^{99m}Tc pode ser preparado à temperatura ambiente, utilizando-se cloreto estânico ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) como agente redutor do pertecnetato de sódio, em pH superior a 11, conforme descrito na literatura, com rendimento radioquímico satisfatório ^(116,120).

Visando a preparação de conjuntos reativos liofilizados para pronta marcação com ^{99m}Tc , foram avaliados os seguintes parâmetros de marcação para 1,0 mg de L,L-EC:

- . massa de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 1, 10, 50, 100, 125, 200, 250, 500 e 1000 μg
- . atividade de ^{99m}Tc - 37, 370, 740, 1850 e 3700 MBq (1, 10, 20, 50 e 100mCi, respectivamente)
- . volume final de marcação - 1, 2, 4 e 6 ml
- . pH de marcação - 7, 8, 9, 10 e 12
- . período de incubação - 1, 5, 15 e 30 minutos

Em todos os estudos, realizou-se um número mínimo de quatro determinações para cada ítem de cada parâmetro de modo a obter-se resultados estatisticamente confiáveis.

A Tabela 1 resume as condições das marcações realizadas à temperatura ambiente quando da avaliação dos parâmetros diferentes, para 1,0 mg de L,L-EC.

Tabela 1 - Parâmetros avaliados na marcação de L,L-EC com ^{99m}Tc

PARÂMETRO AVALIADO	CONDIÇÕES DE MARCAÇÃO				
	pH	MASSA (μg) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	ATIVIDADE (MBq)	VOLUME ^{99m}Tc (ml)	INCUBAÇÃO (min.)
MASSA $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	12	1 - 1000	37	1	15
ATIVIDADE	12	100	37-3700	1	15
VOLUME ^{99m}Tc	12	100	37	1 - 5	15
INCUBAÇÃO	12	100	37	1	1 - 30
pH	7 - 12	100	37	1	15

A amostra de L,L-EC foi dissolvida em tampão fosfato 0,1M no pH indicado, previamente nitrogenado. A solução de cloreto estânico foi preparada em HCl 0,05N previamente nitrogenado. Durante a avaliação do parâmetro atividade de ^{99m}Tc , verificou-se a estabilidade da marcação por um período de seis horas.

Além dos parâmetros citados, efetuaram-se marcações utilizando-se como agentes redutores ácido formamidino sulfônico - AFS - (1 mg) e ascorbato de estanho - TINASC - (26,3; 52,6 e 105,2 μg de Sn^{+2}).

As marcações com AFS, efetuadas em pH 7, 8, 9, 10 e 12 foram efetuadas com aquecimento em banho de água fervente por 15 minutos. As marcações com TINASC foram realizadas à temperatura ambiente, e em pH 7 e 12 para massa de 52,6 μg de Sn^{+2} .

AVALIAÇÃO DA PUREZA RADIOQUÍMICA

Em todas as marcações efetuadas, a pureza radioquímica foi avaliada por meio de cromatografia ascendente em camada delgada, utilizando-se fitas de alumínio impregnadas com sílica gel (CCD-SG), de 12 x 1,5 cm em dois sistemas de solventes: acetona e ácido acético 0,5M. A amostra foi aplicada a 1 centímetro da margem inferior da fita e a frente do solvente percorreu uma distância de 10 cm a partir do ponto de aplicação (26,116,118,120)

Após a corrida, as fitas secas foram cortadas em segmentos de 1 cm, contados em contador gama. Estabelecidas as condições ideais de marcação, as fitas cromatográficas passaram a ser divididas em dois segmentos para contagem, sendo o primeiro a 2 centímetros do ponto de aplicação da amostra. A Tabela 2 apresenta o Rf (distância de migração) das espécies radioquímicas de interesse.

Tabela 2 - Análise por cromatografia em camada delgada da marcação de L,L-EC com ^{99m}Tc

FASE		DISTÂNCIA DE MIGRAÇÃO (Rf)		
ESTACIONÁRIA	MÓVEL	L,L-EC- ^{99m}Tc	$^{99m}\text{TcO}_4$	$^{99m}\text{TcO}_2$
CCD-SG	ACETONA	0	0,9 - 1,0	0
	ÁC. ACÉTICO 0,5M	0,9 - 1,0	0,9 - 1,0	0

Para identificação de outras formas radioquímicas, possivelmente presentes no estudo de variação do pH, utilizou-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com coluna Nucleosil C18 (250 x 4,6mm;5 μ), com fluxo de 1,0ml/min de mistura gradiente de tampão fosfato 0,05M pH 2,5 e etanol: etanol 0-6% (0-10 minutos); etanol 6% (10-30 minutos) ^(116,118,120). O efluente passou por detetor UV (215 nm) e detetor de radioatividade LN-2040, Berthold.

2.3.2 - MARCAÇÃO DE L,L-ECD COM ^{99m}Tc

O complexo L,L-ECD-^{99m}Tc pode ser preparado à temperatura ambiente, utilizando-se cloreto estânico (SnCl₂.2H₂O) como agente redutor do pertecnetato em presença de EDTA e manitol, em pH fisiológico, conforme descrito na literatura ^(50,67,127).

Foram avaliados os seguintes parâmetros, para 1,0 mg de L,L-ECD, 360 μ g de EDTA e 24 mg de manitol:

- . massa de SnCl₂.2H₂O - 1, 10, 50, 100, 125, 200, 250, 500 e 1000 μ g
- . atividade de ^{99m}Tc - 37, 370, 740, 1850, 3700, 7400 MBq (1, 10, 20, 50, 100 e 200 mCi, respectivamente)
- . volume final de marcação - 2, 4 e 6 ml
- . período de incubação - 1, 5, 10, 15, 30 e 45 minutos
- . pH de marcação - 2,0 - 3,0 e 7,5

Em todos os estudos, realizou-se um número mínimo de quatro determinações para cada item de cada parâmetro.

A Tabela 3 resume as condições de marcação realizadas à temperatura ambiente, quando da avaliação dos diferentes parâmetros, para 1,0 mg de L,L-ECD.

Tabela 3 - Parâmetros avaliados na marcação de L,L-ECD com ^{99m}Tc

PARÂMETRO AVALIADO	CONDIÇÕES DE MARCAÇÃO				
	pH	MASSA (μg) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	ATIVIDADE (MBq)	VOLUME ^{99m}Tc (ml)	INCUBAÇÃO (min)
MASSA $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7,5	1 - 1000	37	1	30
ATIVIDADE	7,5	100	37 - 3700	1	30
VOLUME ^{99m}Tc	7,5	100	37	1 - 5	30
INCUBAÇÃO	7,5	100	37	1	5 - 45
pH	2,0 - 3,0	100	37	1	30

Os compostos L,L-ECD, EDTA e manitol foram dissolvidos em tampão fosfato 0,02M, previamente nitrogenado e no pH indicado. A solução de cloreto estânico foi preparada em HCl 0,05N previamente nitrogenado.

A estabilidade da marcação foi avaliada por período de seis horas. Promoveu-se ainda marcação sem utilização de EDTA e manitol.

AVALIAÇÃO DA PUREZA RADIOQUÍMICA

Em todas as marcações efetuadas, a pureza radioquímica foi avaliada por meio de cromatografia ascendente utilizando-se como suporte fitas de alumínio impregnadas com sílica gel de 12 x 1,5 cm (CCD-SG) e como solventes, acetona e solução de cloreto de sódio 20%. Após a corrida, as fitas foram secas e cortadas em segmentos de 1 centímetro para contagem em contador gama. Também neste caso, após o estabelecimento das condições ideais de marcação, as fitas cromatográficas passaram a ser divididas em apenas dois segmentos: a fita corrida em solução salina foi cortada a 5 centímetros do ponto de aplicação e a fita corrida em acetona a 2 centímetros do mesmo ponto ^(114,118,127). A Tabela 4 descreve o Rf das formas radioquímicas de interesse.

Tabela 4 - Análise por cromatografia em camada delgada da marcação de L,L-ECD com ^{99m}Tc

FASES		DISTÂNCIA DE MIGRAÇÃO (Rf)		
ESTACIONÁRIA	MÓVEL	L,L-ECD- ^{99m} Tc	^{99m} TcO ₄	^{99m} TcO ₂
CCD-SG	NaCl 20%	0	0,9 - 1,0	0
	ACETONA	0,9 - 1,0	1,0	0

Para identificação de outras possíveis espécies radioquímicas, em especial no estudo da variação do pH e na marcação efetuada na ausência de EDTA e manitol, utilizou-se CLAE, com a mesma coluna utilizada no estudo anterior, com fluxo de 1,0 ml/min. de mistura gradiente de tampão fosfato 0,05M pH 2,5 e etanol: etanol 0-60% (0-40 minutos);

etanol 60% (40-60 minutos). O efluente passou por detetor UV (215 nm) e detetor de radioatividade LN2040, Berthold.

2.4 - HIDRÓLISE ALCALINA DO COMPLEXO L,L-ECD-^{99m}Tc

Misturaram-se 3,0 ml de L,L-ECD-^{99m}Tc (37MBq) e 1 ml de NaOH 1N. Após 15 minutos, adicionou-se HCl 1N até pH 7 ^(118,121). Os produtos derivados da hidrólise foram isolados por CCD-SG utilizando-se NaCl 20% como solvente e por CLAE, utilizando-se gradiente descrito para determinação da pureza radioquímica do L,L-ECD-^{99m}Tc.

2.5 - ELABORAÇÃO DE CONJUNTOS DE REATIVOS LIOFILIZADOS PARA MARCAÇÃO COM ^{99m}Tc

As condições de liofilização estudadas para obtenção de conjuntos de reativos viáveis de L,L-EC e L,L-ECD para marcação com ^{99m}Tc, envolveram a variação do tipo e massa do agente redutor, pH e período de congelamento, dependendo do caso.

2.5.1 -CONJUNTOS DE REATIVOS LIOFILIZADOS DE L,L-EC

. Agente redutor - massa por frasco

- $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 100, 125, 250, 500 e 1000 μg
- *TINASC* - 26,3, 52,6, 105,2 μg de Sn^{+2}

. Congelamento

- realizado no liofilizador - período de 5 horas
- realizado com nitrogênio líquido - período de 15 minutos

. Ciclo de liofilização - 16 horas

Os conjuntos de reativos liofilizados de L,L-EC foram preparados mediante dissolução do L,L-EC (1,0 mg/ml) em tampão fosfato pH 12, previamente nitrogenado. O agente redutor (cloreto estanoso ou *TINASC*) foi dissolvido em HCl 0,05N previamente nitrogenado. Após a dissolução do L,L-EC, acrescentou-se volume ideal da solução de agente redutor, e levou-se o pH a 12 com NaOH 0,1N antes do acerto do volume final com tampão.

A solução foi filtrada em filtro Millipore 0,22 μ e fracionada em frascos tipo penicilina estéreis (1 ml/frasco), em capela de fluxo laminar. Os frascos foram submetidos ao congelamento e liofilização.

2.5.2 - CONJUNTOS DE REATIVOS LIOFILIZADOS DE L,L-ECD

. Agente redutor - massa por frasco

- $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 100, 125, 250, 500 e 1000 μg

. Congelamento

- realizado no liofilizador - período de 5 horas

- realizado com nitrogênio líquido - período de 15 minutos

. pH da mistura reagente - 2 a 3 e 7,5

. ciclo de liofilização - 16 horas

Os conjuntos de reativos liofilizados de L,L-ECD foram preparados mediante dissolução dos sais de cloridrato de L,L-ECD (1,0 mg/ml), EDTA (360 $\mu\text{g/ml}$) e manitol (24 mg/ml) em tampão fosfato pH 7,5 preparado com água bidestilada e previamente nitrogenado ^(50,67,127). Adicionou-se a esta solução, volume ideal da solução de cloreto estanoso preparada como descrito anteriormente. Quando necessário, ajustou-se o pH a 7,5 com NaOH 0,1N antes do acerto do volume final.

Para preparo dos conjuntos liofilizados de dicloridrato de L,L-ECD em pH ácido, os sais L,L-ECD, EDTA e manitol foram dissolvidos em água bidestilada recém nitrogenada e a massa ideal de cloreto estanoso foi dissolvida em pequeno volume de HCl concentrado, que foi adicionado à esta solução. Após verificação do pH (2 a 3), completou-se o volume com água bidestilada e nitrogenada.

Em ambos os casos, as soluções resultantes foram filtradas em filtro Millipore 0,22 μ , fracionadas em frasco tipo penicilina (1,0 ml/frasco) em capela de fluxo laminar, submetidas à congelamento e liofilizadas.

A estabilidade dos conjuntos de reativos liofilizados de L,L-EC e L,L-ECD foi avaliada por período de 6 meses.

2.6 - ESTUDOS BIOLÓGICOS DOS COMPLEXOS

L,L-EC-^{99m}Tc E L,L-ECD-^{99m}Tc

2.6.1 - ESTUDOS BIOLÓGICOS EM CAMUNDONGOS

Em todos os estudos biológicos realizados em camundongos *Swiss*, os animais foram previamente pesados e a dose do produto marcado (aproximadamente 1,85 MBq/0,1 ml) foi administrada em veia caudal sem utilização de anestesia, com exceção do estudo de coleta de bile no qual os animais foram anestesiados com uretana.

Utilizou-se um número mínimo de 10 animais para cada tempo avaliado na realização dos diferentes estudos.

ESTUDOS DE DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA

Após administração da dose do respectivo radiofármaco e tendo transcorrido o tempo pré estabelecido para cada animal (1, 3, 5, 10, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos) estes foram sacrificados por decapitação e o sangue coletado em frascos heparinizados.

De imediato foram retirados os seguintes órgãos: coração, pulmão, estômago, baço, fígado, rins, intestinos e cérebro. Os órgãos foram pesados e a radioatividade determinada em contador gama tipo poço com detetor de NaI(Tl). As caudas dos animais também foram contadas para eventual correção da dose administrada.

Alíquotas de 100µl de sangue foram preparadas para determinação da radioatividade sanguínea e o restante do sangue foi centrifugado a 2000 rpm por 15 minutos, para determinação da radioatividade plasmática em amostras de 100µl de plasma.

As porcentagens da dose administrada presentes nos diversos órgãos, no sangue e plasma, foram determinadas em relação a um padrão da dose administrada, apropriadamente diluído e medido em contador gama, mantendo-se a mesma geometria e mesmo tempo de contagem das amostras.

A volemia e o volume plasmático foram determinados utilizando-se as seguintes fórmulas ⁽³⁾ :

$$\text{VOLEMIA (ml)} = \text{Peso do animal (g)} \times 0,0778 \text{ (ml/g)}$$

$$\text{VOLUME PLASMÁTICO (ml)} = \text{Peso do animal (g)} \times 0,0488 \text{ (ml/g)}$$

A radioatividade presente nas amostras de sangue e plasma, associadas, respectivamente, à volemia e volume plasmático, permitiu a determinação da porcentagem da dose administrada presente no sangue e plasma total de cada animal.

ESTUDOS DE RETENÇÃO DE CORPO INTEIRO

Poucos segundos antes de ser atingido o tempo de interesse após a administração dos radiofármacos, os animais foram estimulados a urinar e sacrificados por imersão em nitrogênio líquido. Congelados, cada animal foi segmentado e distribuído em tubos para contagem. A somatória das contagens destes tubos representa a retenção de corpo inteiro, calculada em termos percentuais a partir de um padrão da dose administrada.

ESTUDOS DE ELIMINAÇÃO

A eliminação urinária dos compostos foi avaliada amarrando-se o pênis dos animais no momento da administração da dose para contenção da urina na bexiga (para períodos menores ou iguais a 60 minutos) que foi retirada transcorrido o tempo de interesse. A urina retirada da bexiga foi diluída em balão volumétrico e amostras de 1 ml foram retiradas para contagem.

Para avaliação da excreção urinária em períodos superiores a 60 minutos, os animais foram colocados em pequenas gaiolas individuais, circulares, com diâmetro de aproximadamente 8 cm, com fundo de rede e suporte inferior para coleta de urina. Transcorrido o tempo desejado após a administração da dose, a urina armazenada foi coletada. Devido ao pequeno volume, bem como impregnação da urina na rede da gaiola, foram efetuadas lavagens repetidas da gaiola com volumes pequenos de água destilada. A urina e águas de lavagem de cada gaiola foram colocadas em balões volumétricos individuais para padronização de volume. Ao final do procedimento, uma alíquota de 1 ml de urina diluída teve sua radioatividade medida em contador gama e a porcentagem da dose eliminada na urina foi calculada a partir de um padrão da dose administrada.

A eliminação dos compostos pela via intestinal foi estimada a partir da medida de captação dos intestinos (delgado e grosso) com e sem conteúdo intestinal. Para o composto L,L-ECD-^{99m}Tc, procedeu-se ainda a coleta de fezes de animais mantidos em gaiolas metabólicas para os tempos de 4, 8, 16 e 24 horas após a administração da dose. A captação biliar foi avaliada por meio de coleta seriada de bile, a partir da canulação do duto biliar em animais anestesiados com uretana.

DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM DE LIGAÇÃO ÀS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

A porcentagem de ligação dos compostos às proteínas plasmáticas foi avaliada por método de precipitação proteica com ácido tricloroacético (TCA) ⁽¹⁸⁾.

Amostras de plasma (200µl), coletadas 1, 15, 30 e 60 minutos após a administração da dose, foram submetidas à precipitação proteica com 1 ml de solução de ATC 10%. Após centrifugação e separação do sobrenadante, o precipitado foi lavado com 1 ml de solução de ATC, centrifugado e o sobrenadante foi novamente separado. As proteínas plasmáticas precipitadas foram contadas em contador gama e a porcentagem de ligação calculada a partir da contagem da amostra de plasma inicial.

AValiação Cromatográfica de Fluídos Biológicos

Amostras de urina, plasma e bile coletados após a administração de L,L-ECD-^{99m}Tc foram analisados por CLAE, para identificação de possíveis formas radioquímicas,

diferentes do produto administrado. As condições cromatográficas empregadas foram as mesmas descritas para determinação da pureza radioquímica do radiofármaco.

As amostras de plasma foram obtidas de 3 animais, 1 minuto após a administração do radiofármaco e misturadas. A mistura plasmática recebeu tratamento prévio com acetonitrila (1 ml para 0,5 ml de plasma) para precipitação de proteínas plasmáticas^(18,73). Após centrifugação, os sobrenadantes foram filtrados em filtro Millipore 0,22 μ e cromatografados.

As amostras de urina foram coletadas de 3 animais para cada tempo, a saber, 5, 30 e 60 minutos após a administração da dose. A amostra de bile representa o acúmulo dos primeiros 60 minutos após a administração. As amostras de urina e de bile foram filtradas com filtro Millipore 0,22 μ e cromatografadas.

Para o composto L,L-EC-^{99m}Tc efetuou-se análise da urina coletada de 3 animais para cada tempo (5, 30 e 60 minutos) após a administração da dose, por meio de cromatografia em camada delgada, utilizando-se sistema cromatográfico descrito na avaliação da pureza radioquímica do complexo.

2.6.2 - ESTUDOS BIOLÓGICOS EM ANIMAIS DE MÉDIO PORTE

Para obtenção de imagens cintilográficas dos complexos L,L-EC-^{99m}Tc e L,L-ECD-^{99m}Tc, foram utilizados animais de médio porte. No primeiro caso, a distribuição foi avaliada em coelho *New Zeland*, mediante administração da dose na veia marginal (185 MBq), estando o animal imobilizado em posição anterior. As imagens foram adquiridas imediatamente após a administração da dose, em estudo dinâmico, utilizando-se intervalo de

3 segundos por exposição em Câmara de Cintilação equipada com programa desenvolvido para o radiofármaco $\text{MAG}_3\text{-}^{99\text{m}}\text{Tc}$. Selecionando-se os rins como área de interesse, foram obtidas as curvas renais.

O composto $\text{L,L-ECD-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ foi avaliado em cão, anestesiado com pentabarbital, mediante administração da dose em veia femural (555 MBq). As imagens cerebrais foram adquiridas 15, 30 e 60 minutos após administração da dose em posição frontal e lateral.

2.7 - ELABORAÇÃO DE MODELOS COMPARTIMENTALIZADOS DE DISTRIBUIÇÃO FARMACOCINÉTICA

As análises compartimentais dos dois complexos foram elaboradas com base nos estudos de distribuição biológica realizados em camundongos, utilizando-se o programa ANACOMP para análise dos dados experimentais, cálculo dos coeficientes de transferência (k) e simulação dos modelos propostos⁽⁷⁷⁾.

Para elaboração do modelo compartimentalizado de distribuição do complexo $\text{L,L-EC-}^{99\text{m}}\text{Tc}$, o programa foi alimentado com resultados experimentais de captação do complexo (amostragens) em diferentes tempos após a administração da dose, a saber: amostragem 1 = sangue; amostragem 2 = corpo inteiro e amostragem 3 = urina. No caso do complexo $\text{L,L-ECD-}^{99\text{m}}\text{Tc}$, o programa foi alimentado com as seguintes amostragens: amostragem 1 = sangue; amostragem 2 = corpo inteiro; amostragem 3 = urina; amostragem 4 = fezes; amostragem 5 = fígado e amostragem 6 = cérebro.

Em ambos os casos assumiu-se que para o tempo zero, 100% da dose administrada encontra-se no sangue (compartimento 1).

Um modelo com três compartimentos foi proposto para o complexo L,L-EC-^{99m}Tc, (Figura 12). Os três compartimentos considerados foram numerados da seguinte forma:

COMPARTIMENTO	REPRESENTAÇÃO
1	VASCULAR
2	EXTRA-VASCULAR
3	URINA ACUMULADA

Para este modelo definiram-se os seguintes parâmetros Sigma ($S_{i,j}$): (1,1); (2,1); (2,2) e (3,3), todos iguais a 1.

Os parâmetros $S_{i,j}$ representam a contribuição relativa de cada órgão ou compartimento na medida experimental. Como a eficiência de contagem da radioatividade é praticamente a mesma para todos os órgãos, adotou-se o valor unitário para os parâmetros $S_{i,j}$.

Para o composto L,L-ECD-^{99m}Tc foi proposto um modelo mais complexo com 7 compartimentos (Figura 13). De acordo com as amostragens experimentais foram definidos os seguintes parâmetros Sigma $S_{i,j}$: (1,1); (2,1); (2,2); (2,4); (2,6); (2,7); (3,3); (4,5); (5,2) e (6,7), todos iguais a 1.

No modelo esquematizado na Figura 13, os sete compartimentos considerados foram numerados da seguinte forma:

COMPARTIMENTO N°	REPRESENTAÇÃO
1	SANGUE
2	FÍGADO
3	URINA ACUMULADA
4	BILE
5	FEZES ACUMULADA
6	DEMAIS ÓRGÃOS
7	CÉREBRO

As medidas experimentais correspondem à somatória da radioatividade dos diferentes órgãos ou compartimentos. Cada função experimental (amostragem) é representada pela combinação linear dos respectivos compartimentos, isto é:

$$\text{Medida do Sangue (1)} = S_{1,1} \cdot \text{Sangue}$$

$$\begin{aligned} \text{Medida do corpo inteiro (2)} = & S_{2,1} \cdot \text{Sangue} + S_{2,2} \cdot \text{Fígado} + S_{2,7} \cdot \text{Cérebro} + \\ & S_{2,4} \cdot \text{Bile} + S_{2,6} \cdot \text{Demais órgãos} \end{aligned}$$

Em ambos os modelos propostos, os valores dos coeficientes de transferência entre compartimentos (k) foram inicialmente estimados em faixas e após cada tentativa de ajuste, foram aprimorados.

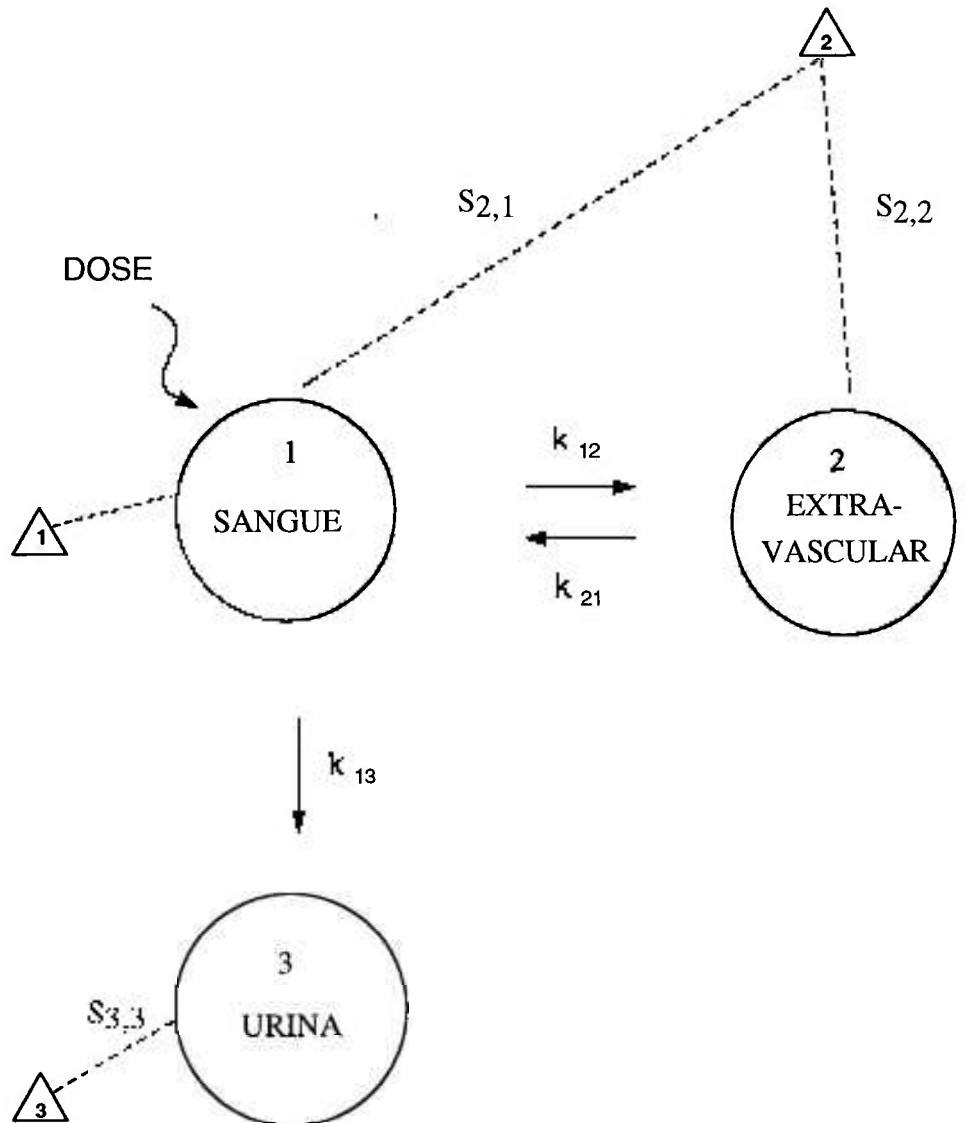


Figura 12 - Modelo de distribuição biológica proposto para o composto L,L-EC-^{99m}Tc
 - os círculos representam os compartimentos e os triângulos os dados ou amostragens

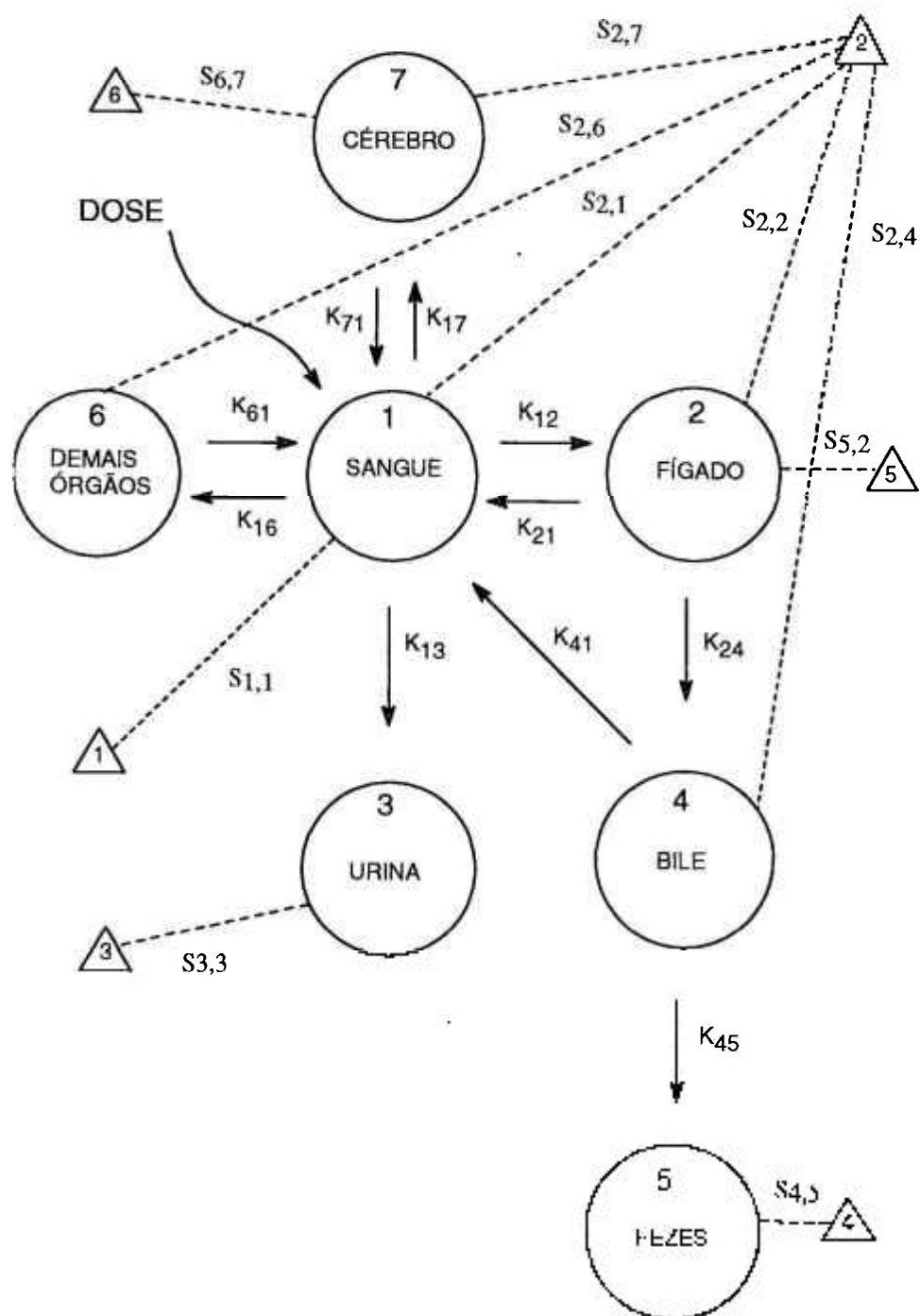


Figura 13 - Modelo de distribuição biológica proposto para o composto L,L-ECD-^{99m}Tc - os círculos representam os compartimentos e os triângulos os dados ou amostragens

IV - RESULTADOS

1 - PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS L,L- EC E L,L-ECD

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos na preparação dos dois compostos em estudo.

Tabela 5 - Valores de rendimento de síntese, faixas de fusão (experimental e literatura) e análise elementar (experimental e calculada) dos compostos L,L-EC e L,L-ECD

COMPOSTO	RENDIMENTO	FAIXA DE FUSÃO (°C)		ANÁLISE ELEMENTAR	
		EXPERIMENTAL	LITERATURA (*)	EXPERIMENTAL	CALCULADA
L,L-EC				C: 35,62	35,80%
	4,1g (32%)	248 - 251	251 - 253	N: 10,23	10,44%
				H: 5,89	6,01%
L,L-ECD				C: 35,46	36,27%
	1,72g (43%)	190 - 194	197 - 198	N: 7,08	7,05%
				H: 6,42	6,60%

(*) - Refs. 9, 40 e 94

Os espectros de infravermelho (KBr) obtidos para os compostos L-L-EC e L,L-ECD foram analisados para identificação das bandas de absorção relativas às ligações características do dímero de cisteína, comuns aos dois compostos, quais sejam:

- estiramento N-H de amina secundária ($2300-3000\text{ cm}^{-1}$);
- deformação N-H de amina secundária (1560 cm^{-1});
- estiramento S-H ($2300-3000\text{ cm}^{-1}$);
- estiramento CH_2 ($2300-3000\text{ cm}^{-1}$);
- estiramento C-N (1075 cm^{-1});

Observou-se também a presença das bandas de absorção características de cada composto, a saber:

- estiramento C=O de carboxila (1593 cm^{-1}) - presente no espectro do composto L,L-EC;
- estiramento C=O de COOEt (1737 cm^{-1}) - presente no espectro do composto L,L-ECD;
- estiramento C=O de EtO^- (1230 cm^{-1}) - presente no espectro do composto L,L-ECD.

Os espectros de RMN- ^1H obtidos para os compostos em estudo, revelaram os seguintes deslocamentos químicos:

- Composto L,L-EC - δ (ppm) - 4,73 (s, 2H, -CH);
4,59 (d, 4H, - $\text{CH}_2\text{-N}$);
4,79 (s, 2H, -NH-).
- Composto L,L-ECD - δ (ppm) - 1,40 (t, 6H, CH_3);
3,27 (dq 4H, $\text{CH}_2\text{-S}$);
4,20 (m, 4H, OCH_2);
4,60 (t, 2H, CH-);
3,30 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$).

2 - ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE MARCAÇÃO COM ^{99m}Tc

2.1 - MARCAÇÃO DE L,L-EC COM ^{99m}Tc

Variando-se a atividade de marcação de 37 a 3700 MBq (1 a 100mCi), a porcentagem de pureza radioquímica avaliada por cromatografia em camada delgada foi superior a 99% e as preparações permaneceram estáveis por um período avaliado de seis horas.

Variando-se o volume de marcação (1 a 6 ml) não foram observadas alterações na porcentagem de pureza radioquímica que permaneceu superior a 99%.

Um período de incubação de 5 minutos à temperatura ambiente foi suficiente para formação do complexo de interesse com porcentagem de pureza radioquímica superior a 99%.

A avaliação da pureza radioquímica em função da massa de cloreto estano utilizado, pode ser observada na Tabela 6.

Tabela 6 - Variação da porcentagem de pureza radioquímica do complexo L,L-EC-^{99m}Tc determinada por cromatografia em camada delgada em função da massa do agente redutor (SnCl₂.2H₂O)

MASSA SnCl ₂ .2H ₂ O (µg)	PUREZA RADIOQUÍMICA (%)
1,0	94,24 ± 0,15
10,0	99,67 ± 0,13
100,0	99,58 ± 0,08
125,0	99,48 ± 0,17
250,0	98,38 ± 0,72
500,0	91,36 ± 3,87
1000,0	56,21 ± 5,58

As alterações mais significativas ocorreram nos estudos da variante pH. A análise por CLAE da mistura utilizando-se cloreto estanoso a pH 12 evidencia um único pico com tempo de retenção (Rt) de 18,6 minutos. A pureza radioquímica não foi afetada pela neutralização desta mistura reagente (Figura 14).

Nas marcações efetuadas em pH mais baixo (7 a 10), um segundo complexo se forma e a porcentagem da forma radioquímica de interesse (Rt = 18,6 minutos) diminui com a redução do pH (Figura 15, Tabela 7).

Usando-se AFS como agente redutor em diferentes pH os cromatogramas de CLAE evidenciam a formação de mais de três espécies radioquímicas (Figura 16, Tabela 7). Em todos os casos a porcentagem da forma radioquímica desejada é reduzida quando comparada com a marcação utilizando-se cloreto estanoso.

Os cromatogramas de CLAE obtidos para preparações utilizando-se *TINASC* como agente redutor em pH 7 e 12 podem ser observados na Figura 17.

Tabela 7 - Influência do pH e agente redutor das misturas reagentes na pureza radioquímica do complexo L,L-EC-^{99m}Tc

REDUTOR	PUREZA RADIOQUÍMICA (%) (Rt = 18,6 min.)				
	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10	pH 12
SnCl ₂ .2H ₂ O	44,13 ± 12,35	59,95 ± 8,47	64,12 ± 10,98	72,60 ± 2,41	99,61 ± 0,13
AFS	7,82 ± 1,25	5,36 ± 1,17	17,01 ± 7,51	23,60 ± 9,20	71,21 ± 1,90

2.2 - MARCAÇÃO DE L,L-ECD COM ^{99m}Tc

A variação da pureza radioquímica do complexo L,L-ECD-^{99m}Tc em função da massa do agente redutor (SnCl₂.2H₂O) pode ser observada na Tabela 8.

Tabela 8 - Variação da porcentagem de pureza radioquímica do complexo L,L-ECD-^{99m}Tc determinada por cromatografia em camada delgada em função da massa do agente redutor (SnCl₂.2H₂O)

MASSA SnCl ₂ .2H ₂ O (μg)	PUREZA RADIOQUÍMICA (%)
1	79,26 ± 1,22
10	96,83 ± 0,38
100	98,90 ± 0,71
125	98,89 ± 0,46
250	89,86 ± 1,51
500	91,14 ± 5,02
1000	82,16 ± 4,21

A porcentagem de pureza radioquímica determinada por cromatografia em camada delgada foi superior a 98% para volume final de marcação de 1 a 4 ml. Para volumes finais de 5 e 6 ml a porcentagem de pureza radioquímica decresce, respectivamente, para 94,45 ± 0,32 e 89,61 ± 0,24%.

Um período mínimo de 15 minutos foi requerido para que as marcações atingissem rendimento radioquímico superior a 98%. As marcações efetuadas com atividade variando de 37 a 3700MBq (1 a 100 mCi) apresentaram porcentagem de pureza radioquímica superior a 98% e permaneceram estáveis por período superior a quatro horas.

A Figura 18 mostra as análises de CLAE realizadas para marcações efetuadas em pH 2,0-3,0 e 7,5, bem como para marcação realizada sem EDTA e manitol.

3 - HIDRÓLISE ALCALINA DO COMPLEXO L,L-ECD-^{99m}Tc

Os produtos da hidrólise alcalina do complexo L,L-ECD-^{99m}Tc podem ser observados no cromatograma de CLAE na Figura 19.

4 - ELABORAÇÃO DE CONJUNTOS DE REATIVOS LIOFILIZADOS PARA MARCAÇÃO COM ^{99m}Tc

O estudo das condições de liofilização possibilitou a obtenção de conjuntos de reativos liofilizados de L,L-EC e L,L-ECD com estabilidade superior a 4 meses, quando armazenados em geladeira.

4.1 - CONJUNTOS DE REATIVOS DE L,L-EC

As condições empregadas na elaboração dos conjuntos de reativos liofilizados, que garantiram a estabilidade dos produtos frente ao processo de liofilização e ao armazenamento foram:

- . **agente redutor/massa** - $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (250 μg) e "TINASC" (105,2 μg de Sn^{+2})
- . **congelamento** - realizado com nitrogênio líquido por período de 15 minutos
- . **ciclo de liofilização** - 16 horas

4.2 - CONJUNTOS DE REATIVOS DE L,L-ECD

Da mesma forma, na obtenção dos conjuntos de reativos liofilizados de L,L-ECD, as condições apropriadas foram:

- . **pH da mistura reagente** - 2,0 a 3,0
- . **agente redutor/massa** - $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (125 μg)
- . **congelamento** - realizado com nitrogênio líquido por período de 15 minutos
- . **ciclo de liofilização** - 16 horas

5 - ESTUDOS BIOLÓGICOS DOS COMPLEXOS L,L-EC-^{99m}Tc E L,L-ECD-^{99m}Tc

5.1 - ESTUDOS BIOLÓGICOS EM CAMUNDONGOS

ESTUDOS DE DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA

Os clareamentos sanguíneos dos compostos L,L-EC-^{99m}Tc e L,L-ECD-^{99m}Tc, expressos em porcentagem da dose administrada presente no sangue e plasma podem ser observados na Tabela 9.

As Tabelas 10 a 13 relacionam os resultados de captação de L,L-EC-^{99m}Tc (Tabela 10 e 11) e L,L-ECD-^{99m}Tc (Tabela 12 e 13) nos diferentes órgãos e tecidos, expressos em porcentagem da dose por órgão e porcentagem da dose por grama de órgão.

Tabela 9 - Níveis sanguíneos e plasmáticos de L,L-EC-^{99m}Tc e L,L-ECD-^{99m}Tc expressos em porcentagem da dose administrada

TEMPO (min.)	L,L-EC- ^{99m} Tc		L,L-ECD- ^{99m} Tc	
	% DOSE SANGUE	% DOSE PLASMA	% DOSE SANGUE	% DOSE PLASMA
1	35,57 ± 8,42	33,47 ± 6,66	22,29 ± 7,75	20,67 ± 8,72
3	10,16 ± 2,65	10,87 ± 4,85	13,09 ± 5,01	13,48 ± 4,73
5	6,54 ± 1,10	6,49 ± 1,26	9,15 ± 2,74	9,66 ± 3,48
10	3,43 ± 0,65	3,71 ± 0,51	6,45 ± 0,69	5,64 ± 0,88
15	3,31 ± 0,55	2,38 ± 0,93	4,78 ± 1,46	4,18 ± 0,73
30	1,29 ± 0,29	1,22 ± 0,53	3,17 ± 0,81	3,14 ± 0,92
60	0,53 ± 0,08	0,62 ± 0,20	1,90 ± 0,48	1,66 ± 0,42
120	0,24 ± 0,05	0,16 ± 0,02	1,02 ± 0,32	0,97 ± 0,20

Tabela 10 - Porcentagem da dose administrada de L,L-EC-^{99m}Tc por órgão avaliado

TEMPO (min.)	PORCENTAGEM DA DOSE DE L,L-EC- ^{99m} Tc POR ÓRGÃO						
	CORAÇÃO	PULMÃO	ESTÔMAGO	BACO	FÍGADO	RINS	CÉREBRO
1	0,45±0,04	1,41±0,22	0,53±0,08	0,19±0,05	5,27±0,66	37,19±13,1	-
3	0,20±0,07	0,65±0,18	0,41±0,12	0,09±0,02	3,03±0,46	25,31±11,2	-
5	0,14±0,02	0,37±0,08	0,28±0,06	0,06±0,01	2,96±0,45	17,35±6,46	0,30±0,02
10	0,08±0,02	0,20±0,04	0,16±0,04	0,03±0,01	2,01±0,30	9,11±4,73	0,13±0,01
15	0,05±0,01	0,19±0,08	0,27±0,18	0,03±0,01	1,90±0,30	5,55±2,81	0,048±0,004
30	0,03±0,01	0,11±0,04	0,07±0,01	0,02±0,01	1,18±0,21	3,40±1,61	0,038±0,003
60	0,021±0,0	0,05±0,02	0,05±0,01	0,01±0,00	0,81±0,13	2,37±1,65	0,018±0,001
120	0,012±0,0	0,015±0,0	0,03±0,01	0,01±0,00	0,64±0,01	0,65±0,37	-

Tabela 11 - Porcentagem da dose administrada de L,L-EC-^{99m}Tc por grama de órgão avaliado

TEMPO (min.)	PORCENTAGEM DA DOSE DE L,L-EC- ^{99m} Tc POR GRAMA DE ÓRGÃO						
	CORAÇÃO	PULMÃO	ESTÔMAGO	BAÇO	FÍGADO	RINS	CÉREBRO
1	2,48±0,31	4,31±0,62	1,57±0,42	1,42±0,50	2,70±0,39	20,72±5,06	-
3	1,21±0,29	2,33±0,49	0,98±0,16	0,64±0,13	1,17±0,27	13,62±4,19	-
5	0,95±0,13	1,40±0,18	0,81±0,17	0,43±0,07	1,56±0,28	6,63±1,13	0,12±0,01
10	0,46±0,14	0,83±0,22	0,43±0,12	0,27±0,05	1,36±0,30	3,77±0,68	0,053±0,005
15	0,36±0,16	0,67±0,24	0,55±0,25	0,20±0,05	0,96±0,19	2,49±0,88	0,019±0,001
30	0,19±0,04	0,35±0,09	0,23±0,05	0,12±0,03	0,69±0,15	1,55±0,40	0,016±0,004
60	0,12±0,01	0,19±0,06	0,16±0,03	0,06±0,01	0,62±0,18	1,15±0,22	0,007±0,001
120	0,05±0,03	0,05±0,01	0,07±0,02	0,03±0,01	0,31±0,01	0,27±0,003	-

Tabela 12 - Porcentagem da dose administrada de L,L-ECD-^{99m}Tc por órgão avaliado

TEMPO (min.)	PORCENTAGEM DA DOSE DE L,L-ECD- ^{99m} Tc POR ÓRGÃO						
	CORAÇÃO	PULMÃO	ESTOMAGO	BAÇO	FIGADO	RINS	CÉREBRO
1	0,70±0,02	2,45±0,32	0,72±0,18	0,39±0,09	30,04±6,60	5,19±1,61	2,29±0,39
3	0,37±0,07	1,75±0,19	0,56±0,12	0,23±0,04	33,27±4,03	4,71±0,98	1,14±0,21
5	0,23±0,05	1,24±0,09	0,50±0,11	0,18±0,03	28,27±4,49	4,48±1,19	1,25±0,27
10	0,17±0,03	0,84±0,11	0,36±0,06	0,11±0,03	16,79±1,51	2,59±0,51	-
15	0,11±0,03	0,66±0,11	0,29±0,11	0,06±0,01	14,88±3,02	2,16±0,50	1,12±0,53
30	0,07±0,01	0,27±0,05	0,30±0,15	0,06±0,02	8,74±1,67	1,53±0,34	0,38±0,14
60	0,04±0,01	0,28±0,08	0,33±0,13	0,04±0,01	8,05±0,66	1,00±0,29	0,19±0,08
120	0,02±0,01	0,13±0,02	0,15±0,04	0,02±0,01	6,14±0,44	0,71±0,25	0,07±0,01

Tabela 13 - Porcentagem da dose administrada de L,L-ECD-^{99m}Tc por grama de órgão avaliado

TEMPO (min.)	PORCENTAGEM DA DOSE DE L,L-ECD- ^{99m} Tc POR GRAMA DE ÓRGÃO						
	CORAÇÃO	PULMÃO	ESTÔMAGO	BACO	FÍGADO	RINS	CÉREBRO
1	4,48±0,17	9,82±1,93	2,62±0,91	2,93±0,19	29,88±8,49	16,46±5,06	4,03±1,54
3	2,80±0,44	6,97±0,72	1,74±0,23	2,13±0,57	27,92±4,14	16,89±5,02	2,91±0,75
5	1,86±0,23	4,84±0,24	1,44±0,22	1,19±0,25	20,62±3,21	16,79±5,26	2,24±0,39
10	1,45±0,37	3,73±0,49	1,40±0,29	0,99±0,07	15,03±1,26	8,55±1,39	-
15	0,84±0,20	2,73±0,54	0,88±0,29	0,56±0,14	12,57±2,20	7,28±1,55	1,54±1,32
30	0,67±0,10	1,34±0,25	1,83±1,00	0,43±0,08	8,50±2,07	4,77±1,22	0,77±0,53
60	0,31±0,12	1,01±0,26	1,21±0,46	0,23±0,07	6,63±1,54	3,19±0,90	0,36±0,21
120	0,10±0,03	0,49±0,11	0,49±0,15	0,10±0,02	4,46±0,97	1,97±0,67	0,19±0,18

ESTUDOS DE RETENÇÃO DE CORPO INTEIRO

Os resultados obtidos nos estudos de retenção de corpo inteiro dos complexos L,L-EC-^{99m}Tc e L,L-ECD-^{99m}Tc podem ser observados na Tabela 14.

Tabela 14 - Retenção de corpo inteiro dos complexos L,L-EC-^{99m}Tc e L,L-ECD-^{99m}Tc expressos em porcentagem da dose administrada

TEMPO (min.)	% DOSE CORPO INTEIRO	
	L,L-EC- ^{99m} Tc	L,L-ECD- ^{99m} Tc
1	73,79 ± 8,79	-
3	62,60 ± 9,65	-
5	42,57 ± 8,91	78,34 ± 12,44
15	28,55 ± 8,60	72,07 ± 7,18
30	13,66 ± 5,24	66,84 ± 10,19
60	7,66 ± 2,29	62,12 ± 5,38
120	6,39 ± 0,57	56,98 ± 10,32
240	3,83 ± 0,85	35,92 ± 3,91
960	-	2,24 ± 1,18

ESTUDOS DE ELIMINAÇÃO

A Tabela 15 expressa os resultados obtidos nos estudos de eliminação urinária dos dois complexos.

Tabela 15 - Eliminação urinária dos complexos L,L-EC-^{99m}Tc e L,L-ECD-^{99m}Tc expressa em porcentagem da dose administrada

TEMPO (min.)	% DOSE ELIMINADA NA URINA	
	L,L-EC- ^{99m} Tc	L,L-ECD- ^{99m} Tc
1	0,29 ± 0,20	-
5	53,14 ± 13,14	6,20 ± 3,78
10	71,52 ± 4,92	-
15	77,35 ± 4,61	18,62 ± 7,49
30	85,59 ± 7,51	31,06 ± 6,59
60	89,65 ± 6,09	33,81 ± 9,21
120	94,38 ± 3,56	39,83 ± 2,79
240	93,89 ± 0,85	49,63 ± 7,26

A Tabela 16 expressa a captação intestinal dos complexos L,L-EC-^{99m}Tc e L,L-ECD-^{99m}Tc considerando-se o intestino cheio (com conteúdo intestinal) e intestino vazio (sem conteúdo intestinal e lavado), bem como captação encontrada nas fezes coletadas em períodos mais tardios para o complexo L,L-ECD-^{99m}Tc.

Tabela 16 - Avaliação da eliminação intestinal dos complexos L,L-EC-^{99m}Tc e L,L-ECD-^{99m}Tc expressos em porcentagem da dose administrada

TEMPO (min.)	PORCENTAGEM DA DOSE ADMINISTRADA				
	L,L-EC- ^{99m} Tc		L,L-ECD- ^{99m} Tc		FEZES
	INT. CHEIO	INT. VAZIO	INT. CHEIO	INT. VAZIO	
5	3,13 ± 0,45	0,36 ± 0,12	13,03 ± 4,58	3,93 ± 1,65	-
15	4,01 ± 0,70	0,58 ± 0,36	23,30 ± 5,78	8,51 ± 1,95	-
30	5,04 ± 0,80	0,13 ± 0,04	33,26 ± 9,44	8,50 ± 3,51	-
60	4,00 ± 0,82	0,11 ± 0,04	38,25 ± 5,79	8,24 ± 1,09	-
120	3,67 ± 0,60	0,04 ± 0,01	43,66 ± 6,90	8,17 ± 1,79	-
240	-	-	44,89 ± 8,20	7,21 ± 3,46	1,37 ± 2,26
360	-	-	40,89 ± 8,03	2,90 ± 0,01	-
480	-	-	25,65 ± 5,92	2,06 ± 0,46	13,96 ± 2,69
960	-	-	-	-	16,69 ± 2,27
1440	-	-	-	-	28,23 ± 3,12

Os níveis de captação biliar dos complexos em estudo estão expressos na Tabela 17.

Tabela 17 - Eliminação biliar dos complexos L,L-EC-^{99m}Tc e L,L-ECD-^{99m}Tc expressa em porcentagem da dose administrada

TEMPO (min.)	% DOSE ELIMINADA NA BILE ACUMULADA	
	L,L-EC- ^{99m} Tc	L,L-ECD- ^{99m} Tc
30	0,65 ± 0,72	24,88 ± 1,33
60	1,77 ± 0,93	35,94 ± 1,72
120	2,84 ± 0,83	41,29 ± 1,25
240	2,86 ± 1,09	50,19 ± 0,73
360	-	53,31 ± 0,73
420	-	54,39 ± 0,63
960	-	57,70 ± 0,35

DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM DE LIGAÇÃO ÀS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

As porcentagens de ligação às proteínas plasmáticas dos radiofármacos em estudo podem ser observados na Tabela 18.

Tabela 18 - Porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas dos complexos L,L-EC-^{99m}Tc e L,L-ECD-^{99m}Tc

COMPOSTO	% LIGAÇÃO ÀS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS
L,L-EC- ^{99m} Tc	30,64 ± 6,90
L,L-ECD- ^{99m} Tc	83,97 ± 2,75

AVALIAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE FLUÍDOS BIOLÓGICOS

Os cromatogramas de CLAE das amostras urinárias de animais administrados com L,L-ECD-^{99m}Tc podem ser observados na Figura 20. Os cromatogramas de CLAE de plasma e bile acumulada podem ser observados na Figura 21.

A análise por CCD-SG da urina de animais administrados com L,L-EC-^{99m}Tc não identificou nenhuma espécie radioquímica diferente do produto original administrado.

5.2 - ESTUDOS BIOLÓGICOS EM ANIMAIS DE MÉDIO PORTE

O estudo cintilográfico dinâmico do complexo L,L-EC-^{99m}Tc realizado em coelho pode ser observado nas Figuras 22 e 23. As imagens obtidas do cérebro de cão administrado com L,L-ECD-^{99m}Tc podem ser observadas na Figura 24.

6 - ANÁLISE COMPARTIMENTAL DOS COMPLEXOS L,L-EC-^{99m}Tc E L,L-ECD-^{99m}Tc

Os modelos compartimentalizados propostos para os dois complexos ajustaram-se aos dados experimentais.

No caso do complexo L,L-EC-^{99m}Tc, o sistema de equações exponenciais (f_i) que define o modelo é o seguinte:

$$f_1 = 92,0739 e^{-1,1790t} + 7,9261 e^{-0,0528t}$$

$$f_2 = -57,8379 e^{-1,1790t} + 57,8379 e^{-0,0528t}$$

$$f_3 = 34,2360 [1 - e^{-1,1790t}] + 65,7640 [1 - e^{-0,0528t}]$$

As constantes de transferência (k) determinadas são:

$$k(1,2) = 0,6513270 \pm 0,022264 \text{ min}^{-1}$$

$$k(2,1) = 0,1420923 \pm 0,036045 \text{ min}^{-1}$$

$$k(1,3) = 0,4383749 \pm 0,017290 \text{ min}^{-1}$$

A Tabela 19 confronta os resultados de captação experimental e calculada para cada amostragem utilizada na elaboração do modelo de distribuição do complexo L,L-EC-^{99m}Tc.

Tabela 19 - Porcentagem da dose administrada (experimental e calculada) das diferentes amostragens utilizadas na determinação do modelo de distribuição do complexo L,L-EC-^{99m}Tc

TEMPO (min.)	% DOSE ADMINISTRADA					
	SANGUE		CORPO INTEIRO		URINA	
	EXPERIMENTAL	CALCULADA	EXPERIMENTAL	CALCULADA	EXPERIMENTAL	CALCULADA
0	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00	0,00
1	35,57	35,84	73,79	72,91	0,29	27,09
3	10,16	9,44	62,60	57,12	-	-
5	6,54	6,32	42,57	50,59	53,14	49,41
10	3,43	4,67	-	-	71,52	61,22
15	3,31	3,59	28,55	29,77	77,35	70,23
30	1,29	1,62	13,66	13,48	85,59	86,52
60	0,53	0,33	7,66	2,76	89,65	94,24

A Tabela 20 e os gráficos descritos na Figura 25 expressam a porcentagem da dose administrada presente nos três compartimentos descritos no modelo.

Tabela 20 - Porcentagem da dose administrada do composto L,L-EC-^{99m}Tc presente em cada compartimento em função do tempo.

TEMPO (min.)	% DOSE ADMINISTRADA		
	COMPARTIMENTO 1	COMPARTIMENTO 2	COMPARTIMENTO 3
0	100,00	0,00	0,00
1	35,84	37,07	27,09
3	9,44	47,68	42,88
5	6,32	44,25	49,41
10	4,67	34,10	61,22
15	3,59	26,18	70,23
30	1,62	11,85	86,52
60	0,33	2,43	94,24

Para o complexo L,L-ECD-^{99m}Tc o sistema de equações exponenciais (f_i) que define o modelo é o seguinte:

$$f_1 = 49,4041 e^{-1,8415 t} + 14,3386 e^{-0,1441 t} - 1320,32 e^{-2,7200 t} + 1354,82 e^{-2,7227 t} + 1,9341 e^{-0,0037 t}$$

$$f_2 = -36,0581 e^{-1,8415 t} + 46,3571 e^{-0,1441 t} + 589,5958 e^{-2,7200 t} - 604,2715 e^{-2,7227 t} + 4,3144 e^{-0,0037 t}$$

$$f_3 = 3,1899 [1 - e^{-1,8415 t}] + 11,8273 [1 - e^{-0,1441 t}] - 57,7159 [1 - e^{-2,7200 t}] + 59,1644 [1 - e^{-2,7227 t}] + 62,6270 [1 - e^{-0,0037 t}]$$

$$f_4 = -20,2597 e^{-1,8415 t} + 7,7133 e^{-0,1441 t} - 1439,1449 e^{-2,7200 t} + 1450,9585 e^{-2,7227 t} + 0,6784 e^{-0,0037 t}$$

$$f_5 = -0,9950 [1 - e^{-1,8415 t}] + 4,8395 [1 - e^{-0,1441 t}] - 47,8516 [1 - e^{-2,7200 t}] + 48,1962 [1 - e^{-2,7227 t}] + 16,7074 [1 - e^{-0,0037 t}]$$

$$f_6 = -12,9053 e^{-1,8415 t} - 53,5292 e^{-0,1441 t} + 232,8212 e^{-2,7200 t} - 238,6630 e^{-2,7227 t} + 72,1801 e^{-0,0037 t}$$

$$f_7 = 22,0139 e^{-1,8415 t} + 1,7869 e^{-0,1441 t} + 1766,6545 e^{-2,7200 t} - 1790,6169 e^{-2,7227 t} + 0,2275 e^{-0,0037 t}$$

As constantes de transferência (k) calculadas são:

$$k(1,2) = 1,0106441 \pm 0,003450 \text{ min}^{-1}$$

$$k(1,3) = 0,1188984 \pm 0,004257 \text{ min}^{-1}$$

$$k(1,6) = 0,4767261 \pm 0,000150 \text{ min}^{-1}$$

$$k(1,7) = 0,2936572 \pm 0,117426 \text{ min}^{-1}$$

$$k(2,1) = 0,0555062 \pm 0,005659 \text{ min}^{-1}$$

$$k(4,1) = 2,4651326 \pm 0,000652 \text{ min}^{-1}$$

$$k(6,1) = 0,0164463 \pm 0,002422 \text{ min}^{-1}$$

$$k(7,1) = 2,5004842 \pm 0,016958 \text{ min}^{-1}$$

$$k(2,4) = 0,4012364 \pm 0,008734 \text{ min}^{-1}$$

$$k(4,5) = 0,0904384 \pm 0,001237 \text{ min}^{-1}$$

A Tabela 21 apresenta os resultados experimentais e calculados de captação para cada amostragem utilizada na elaboração do modelo de distribuição do complexo L,L-ECD-^{99m}Tc:

Tabela 21 - Porcentagem de dose (experimental e calculada) das diferentes amostragens utilizadas na elaboração do modelo de distribuição do complexo L,L-ECD-^{99m}Tc

TEMPO (min.)	% DOSE ADMINISTRADA											
	SANGUE		C.INTEIRO		URINA		FEZES		FÍGADO		CÉREBRO	
	EXP.	CALC.	EXP.	CALC.	EXP.	CALC.	EXP.	CALC.	EXP.	CALC.	EXP.	CALC.
0	100,0	100,0	100,0	100,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	22,29	24,20	-	-	-	-	-	-	30,04	37,86	2,29	4,01
3	13,09	11,42	-	-	-	-	-	-	33,27	34,20	1,14	1,46
5	9,15	8,88	78,34	85,99	6,20	11,85	-	-	28,27	26,78	1,25	1,09
10	6,45	5,26	-	-	-	-	-	-	16,79	15,13	1,12	0,64
15	4,78	3,48	72,07	77,00	18,62	18,46	-	-	14,88	9,42	0,38	0,42
30	3,17	1,92	66,84	71,27	31,06	22,84	-	-	8,74	4,48	0,19	0,23
60	1,90	1,55	62,12	63,65	33,81	28,85	-	-	8,05	3,46	0,07	0,18
120	1,02	1,24	56,98	51,06	39,83	38,78	-	-	6,14	2,77	-	-
240	-	-	35,92	32,86	49,63	53,15	-	-	-	-	-	-
480	-	-	-	-	-	-	13,96	18,03	-	-	-	-
960	0,06	0,06	2,24	2,34	-	-	16,69	20,40	-	-	-	-
1440	-	-	-	-	-	-	28,23	20,81	-	-	-	-

A Tabela 22 e Figura 26 expressam a porcentagem da dose administrada de L,L-ECD-^{99m}Tc, em função do tempo, nos 7 compartimentos descritos no modelo.

Tabela 22 - Porcentagem da dose administrada de L,L-ECD-^{99m}Tc em cada compartimento em função do tempo

TEMPO (min.)	% DOSE ADMINISTRADA						
	COMP.1	COMP.2	COMP.3	COMP.4	COMP.5	COMP.6	COMP.7
0	100,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	24,20	37,86	5,86	4,66	0,20	23,18	4,01
3	11,42	34,20	9,46	5,60	1,24	36,60	1,46
5	8,88	26,78	11,85	4,42	2,14	44,83	1,09
10	5,26	15,13	15,92	2,48	3,65	56,91	0,64
15	3,48	9,42	18,46	1,53	4,53	62,15	0,42
30	1,92	4,48	22,84	0,71	5,87	63,94	0,23
60	1,55	3,47	28,85	0,55	7,49	57,90	0,18
120	1,24	2,78	38,78	0,44	10,14	46,46	0,15
240	0,80	1,79	53,15	0,28	13,98	29,90	0,09
480	0,33	0,74	68,35	0,12	18,03	12,39	0,04
960	0,06	0,13	77,25	0,02	20,40	2,13	0,01
1440	0,01	0,02	78,78	0,01	20,81	0,36	0,00

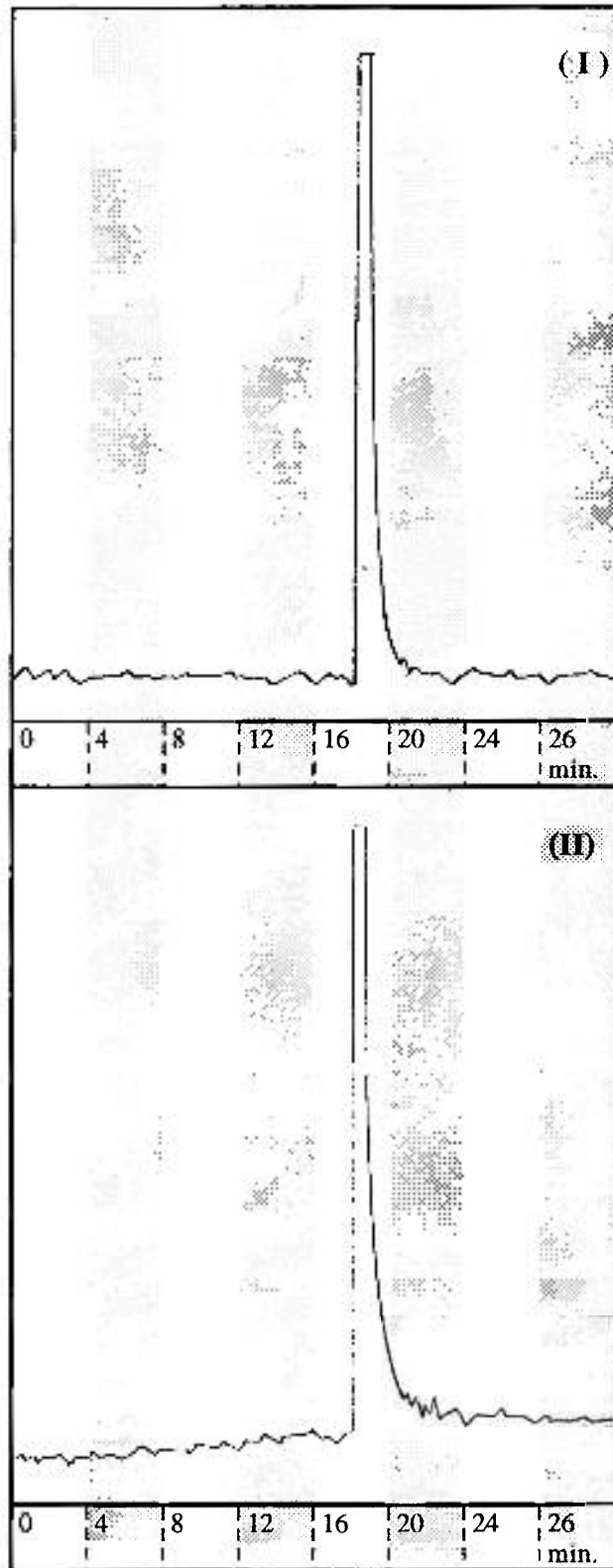


Figura 14 - Cromatogramas de CLAE da marcação de L,L-EC com ^{99m}Tc , utilizando-se $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: pH 12 (I) e após neutralização a pH 7 (II) - Coluna Nucleosil C18, Gradiente tampão fosfato pH 2,5:etanol

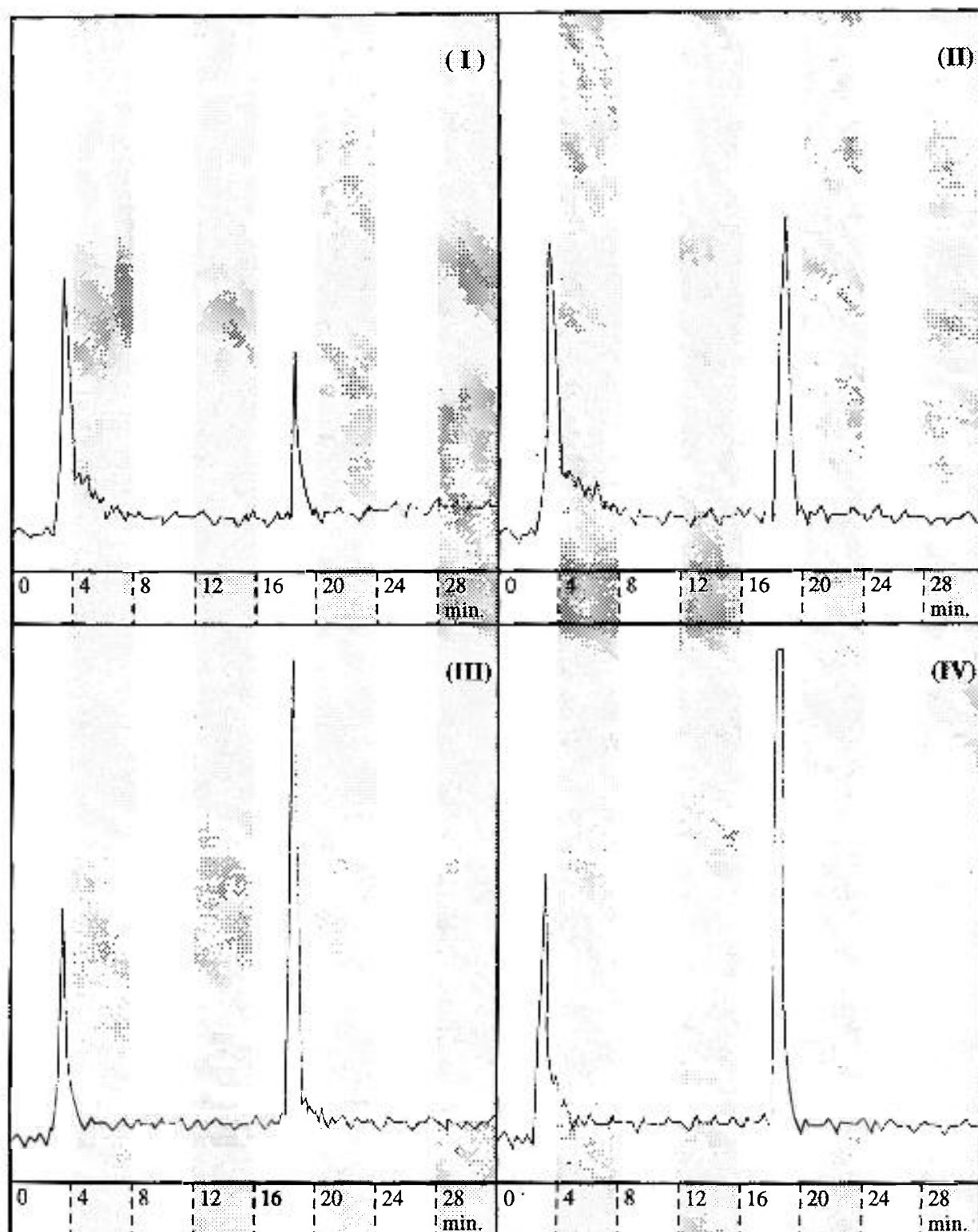


Figura 15 - Cromatogramas de CLAE das marcações de L,L-EC com ^{99m}Tc , utilizando-se $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: pH 7 (I); 8 (II); 9 (III) e 10 (IV) - Coluna Nucleosil C18, Gradiente tampão fosfato pH 2,5:etanol

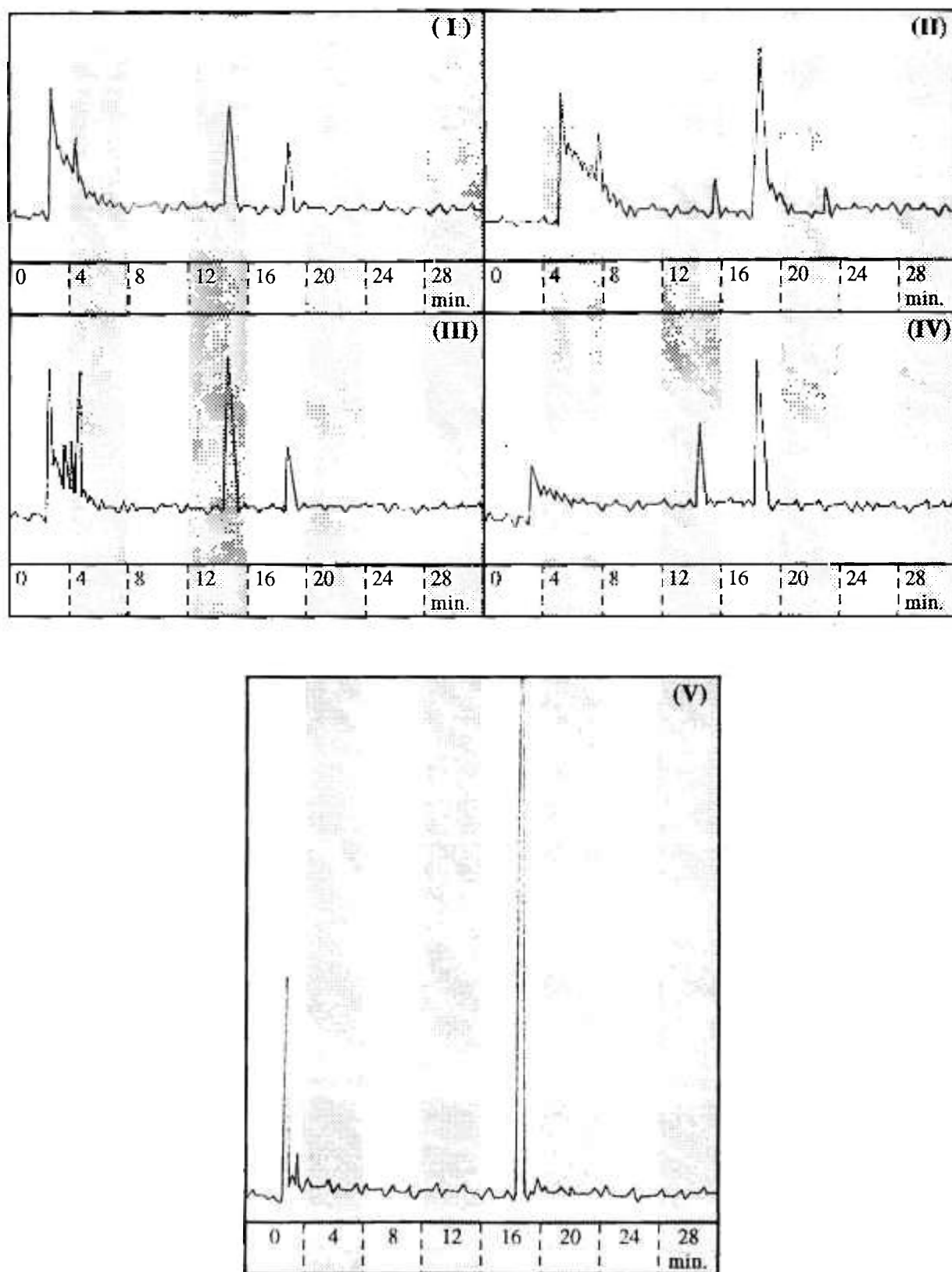


Figura 16 - Cromatogramas de CLAE da marcação de L,L-EC com ^{99m}Tc utilizando FSA: pH 7 (I); 8 (II); 9 (III); 10 (IV) e 12 (V) - Coluna Nucleosil C18, Gradiente tampão fosfato pH 2,5:etanol

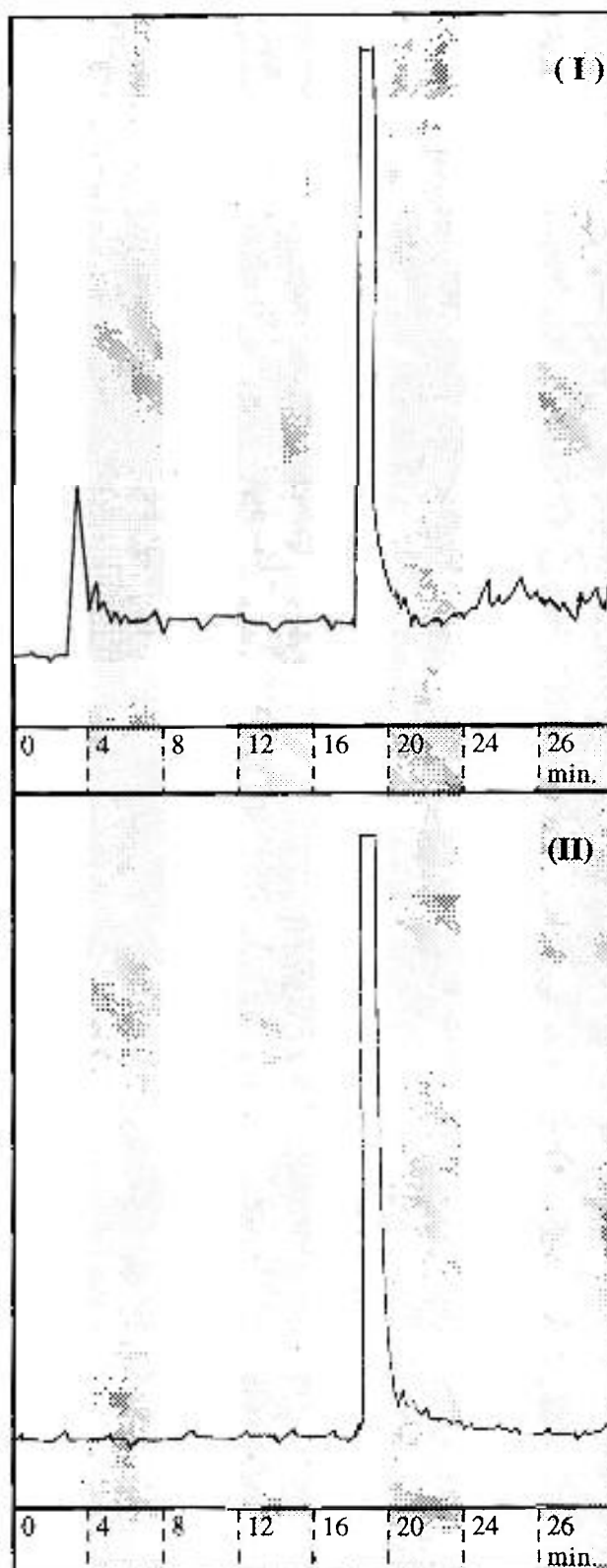


Figura 17 - Cromatogramas de CLAE da marcação de L,L-EC com ^{99m}Tc utilizando-se "TINASC": pH 7 (I) e 12 (II) - Coluna Nucleosil C18, Gradiente tampão fosfato pH 2,5:etanol

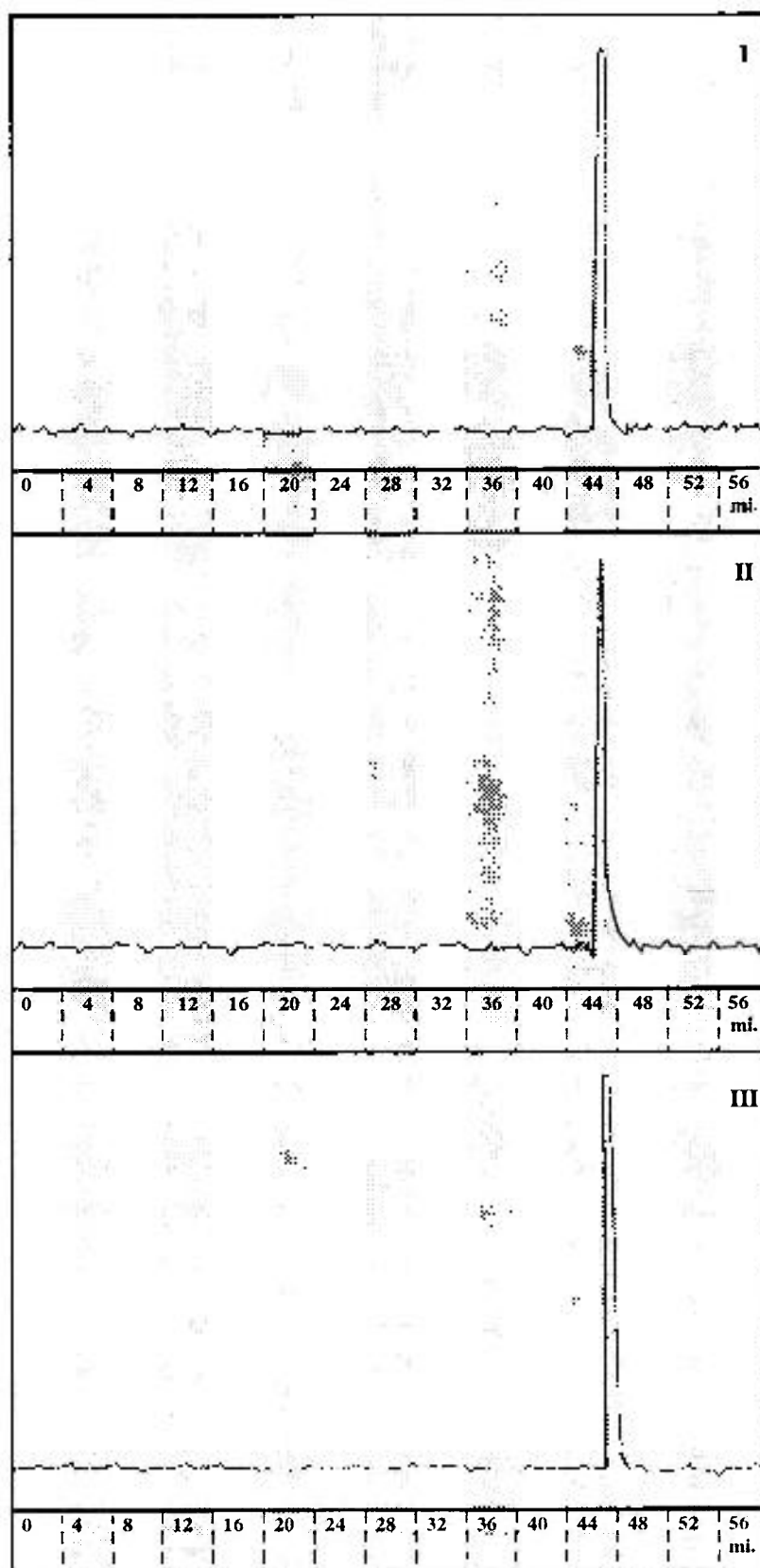


Figura 18 - Cromatogramas de CLAE da marcação de L,L-ECD com ^{99m}Tc utilizando-se $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: pH 2-3 (I); 7,5 (II) e na ausência de EDTA e Manitol (III)
- Coluna Nucleosil C18, Gradiente tampão fosfato pH2,5:etanol

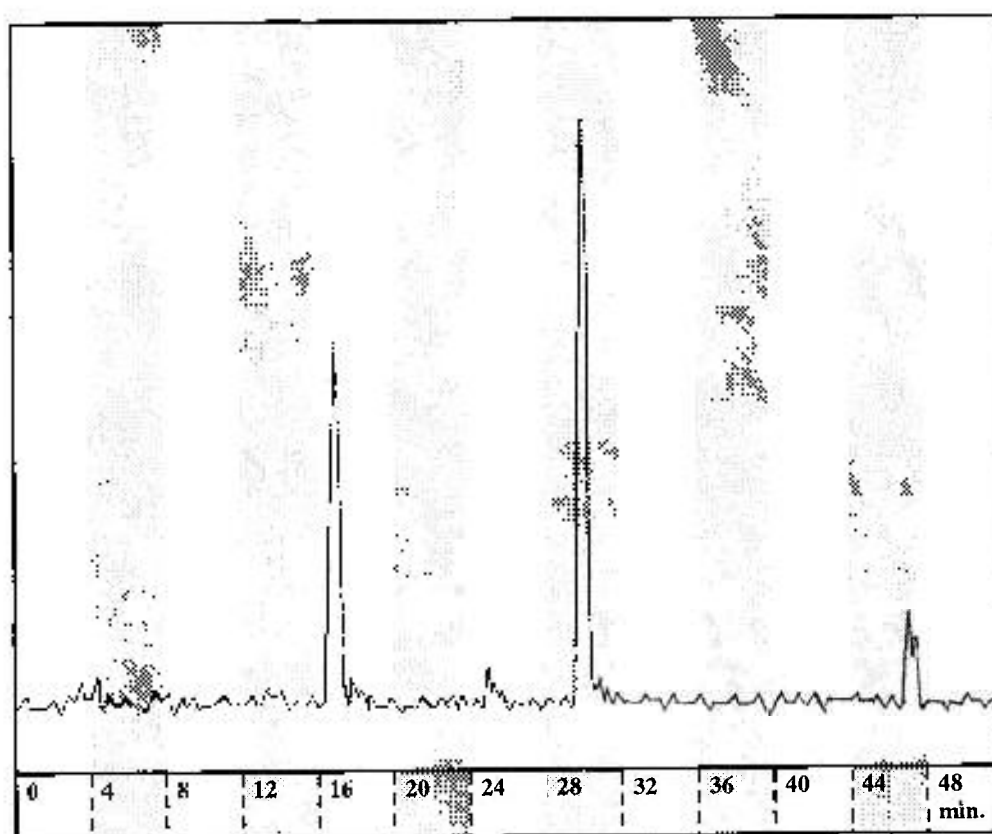


Figura 19 - Cromatograma de CLAE: produtos de hidrólise alcalina de L,L-ECD-^{99m}Tc - Coluna Nucleosil C18, Gradiente tampão fosfato pH 2,5:etanol

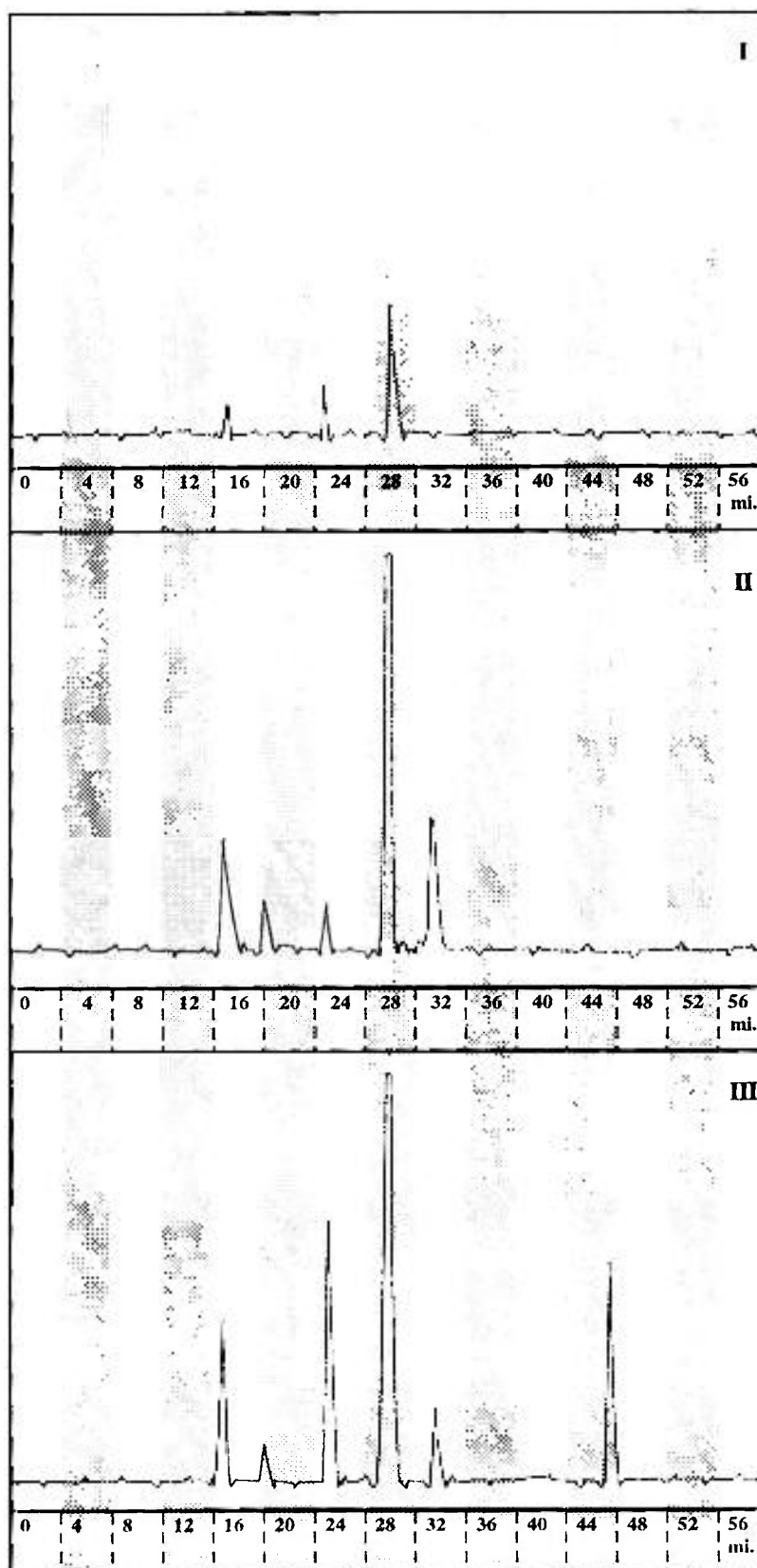


Figura 20 - Cromatogramas de CLAE de urina de animais administrados com L,L-ECD-^{99m}Tc: 5 minutos (I); 30 minutos (II); 60 minutos (III) - Coluna Nucleosil C18, Gradiente tampão fosfato pH 2,5:etanol

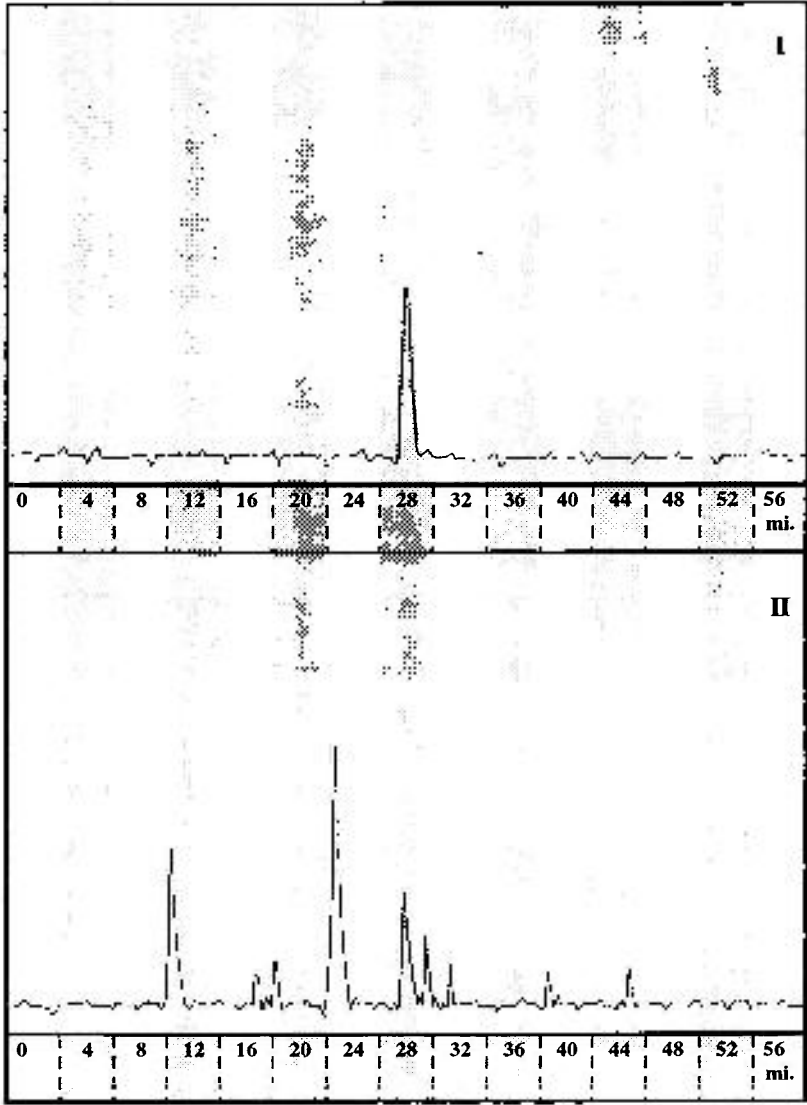


Figura 21 - Cromatogramas de CLAE de amostras de: plasma de 1 minuto (I) e bile acumulada de 60 minutos (II) de animais administrados com L,L-ECD-^{99m}Tc - Coluna Nucleosil C18, Gradiente tampão fosfato pH 2,5:etanol

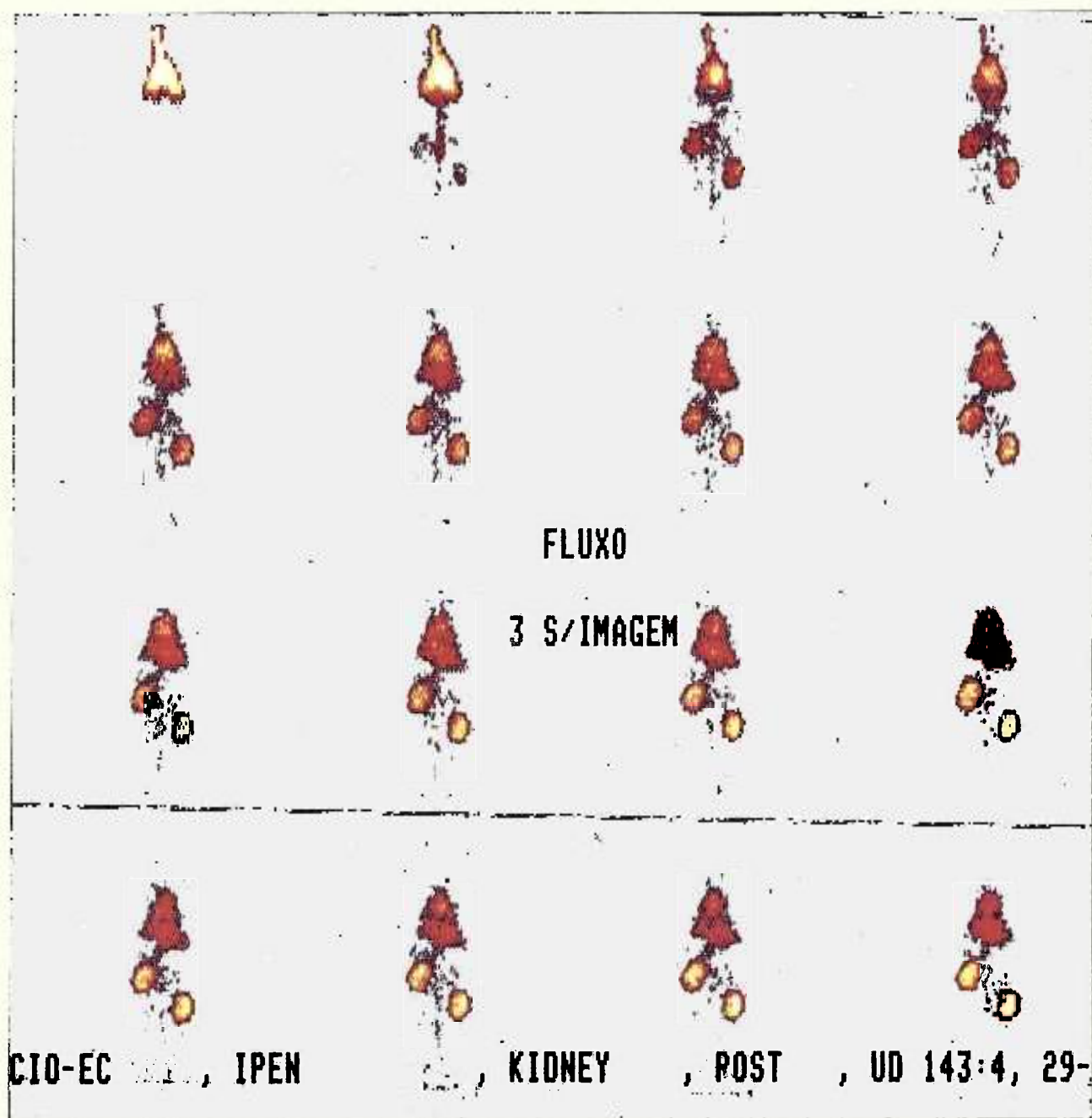


Figura 22 - Estudo cintilográfico dinâmico de L.L-EC-^{99m}Tc realizado em coelho -
Fluxo sanguíneo - 3 segundos por imagem

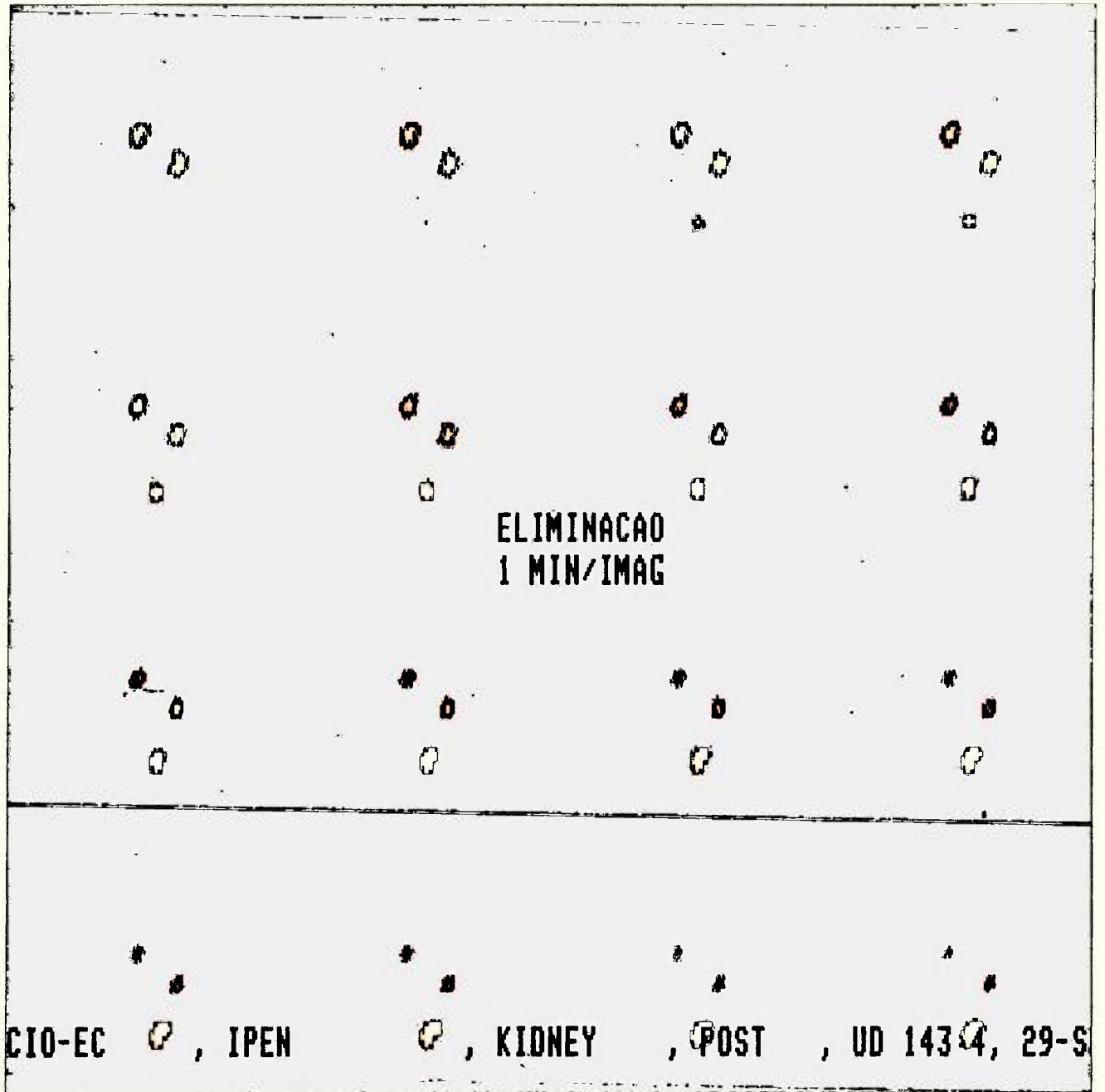


Figura 23 - Estudo cintilográfico dinâmico de L,L-EC-^{99m}Tc realizado em coelho -
Eliminação - 1 minuto por imagem

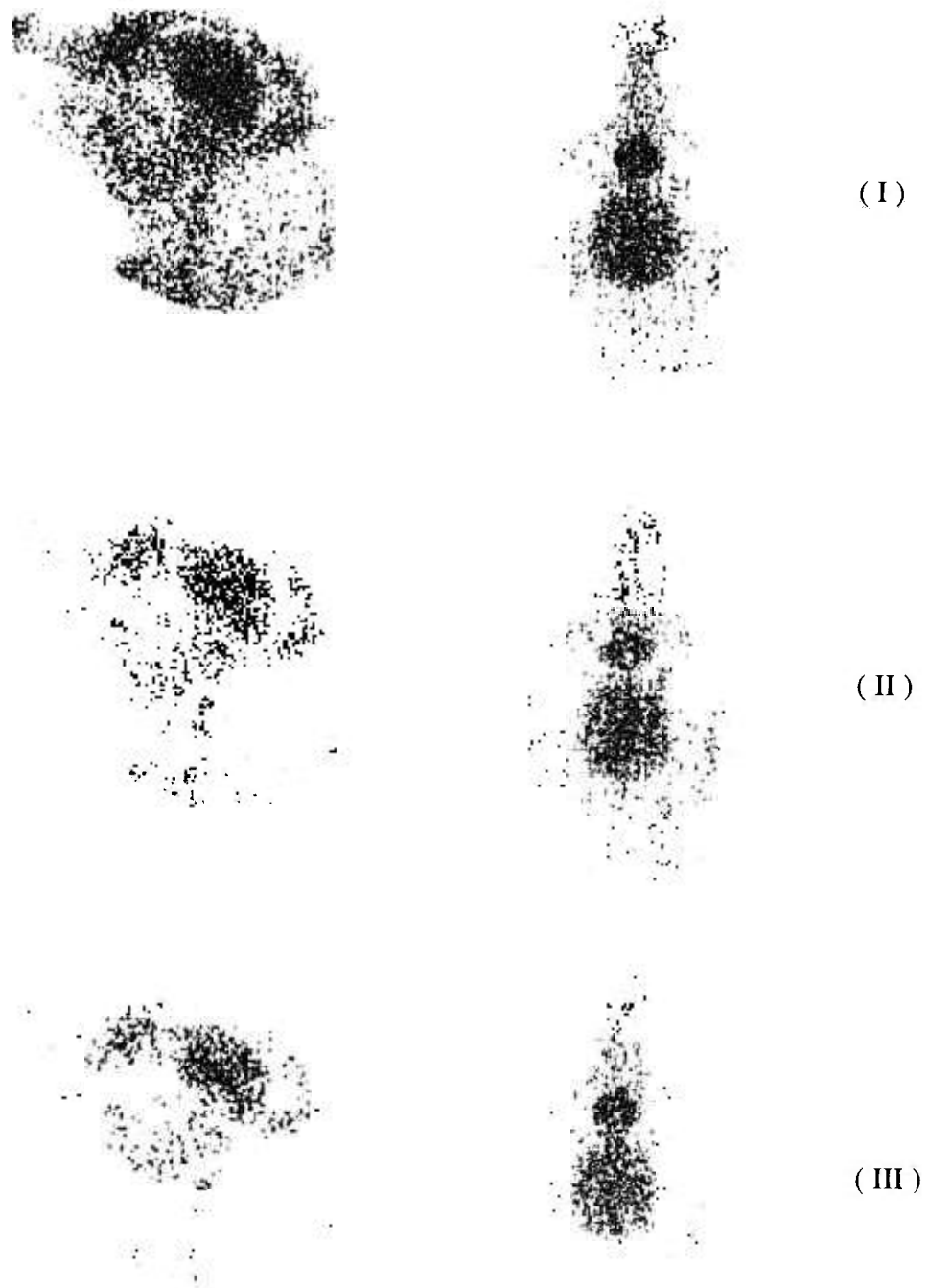


Figura 24 - Cintilografia cerebral de L,L-ECD- ^{99m}Tc realizada em cachorro nas posições Lateral e Vértex aos 15 minutos (I), 30 minutos (II) e 60 minutos (III)

% DOSE ADMINISTRADA

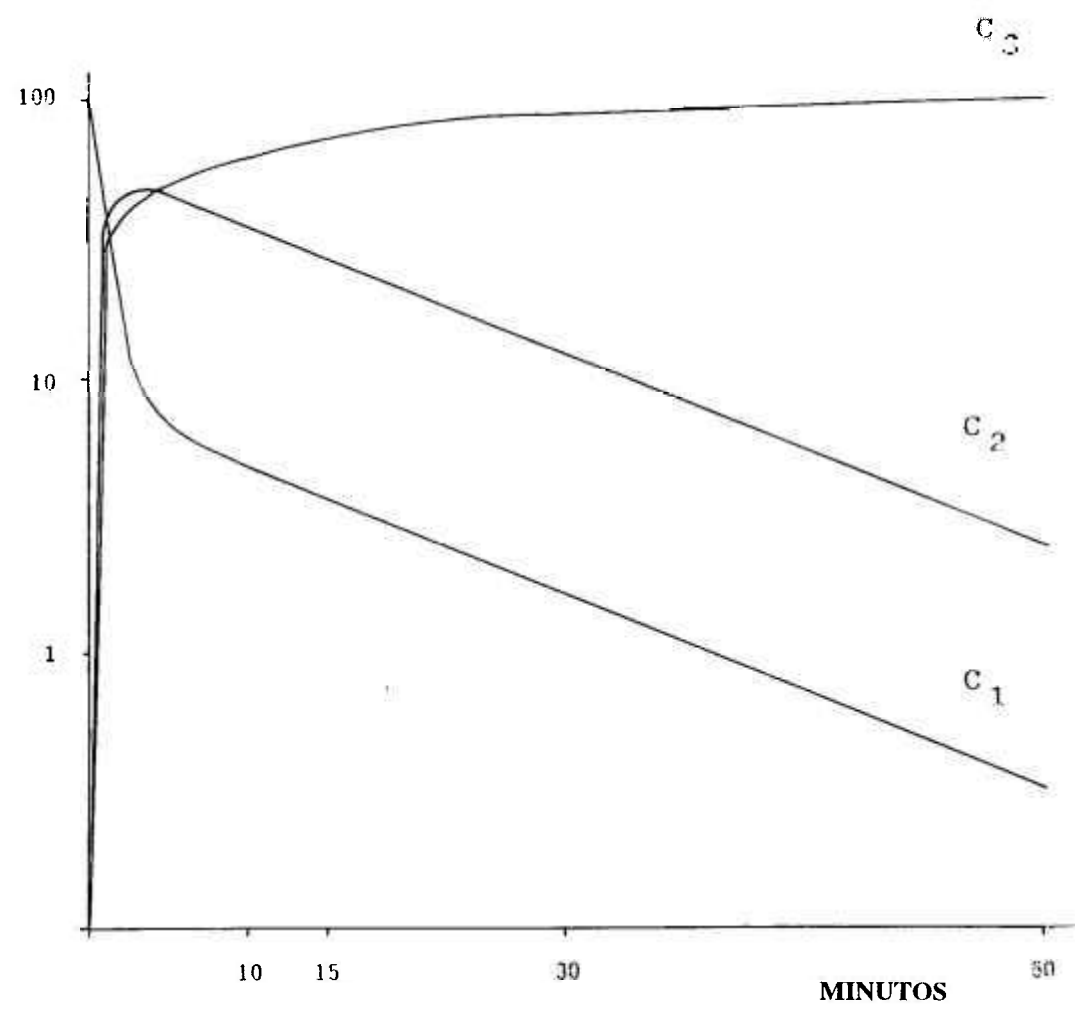


Figura 25 - Curvas que expressam a % dose administrada de L,L-EC-^{99m}Tc em função do tempo nos diferentes compartimentos (C_i) do modelo proposto

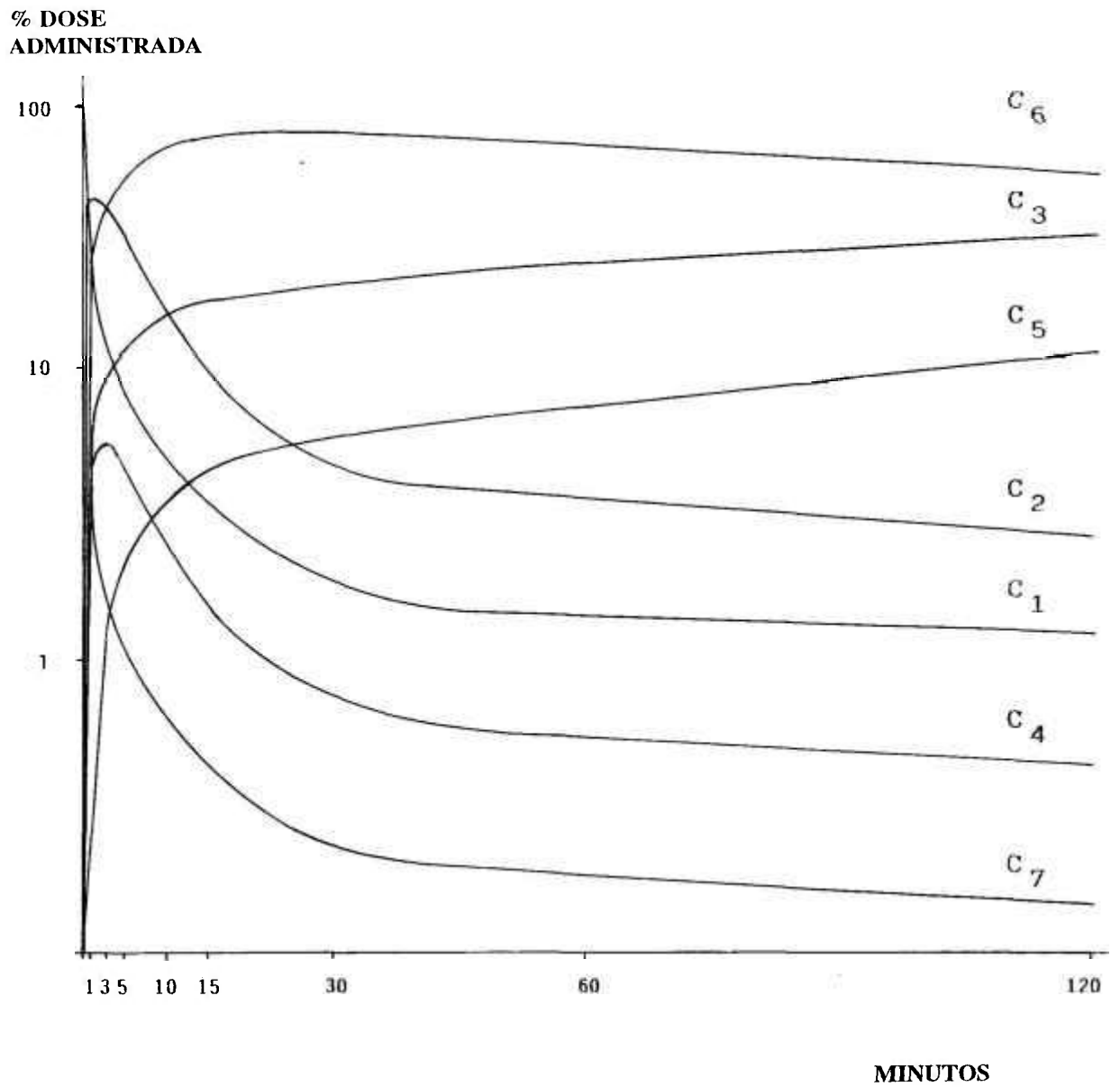


Figura 26 - Curvas que expressam a % dose administrada de L,L-ECD-^{99m}

V - DISCUSSÃO

O desenvolvimento deste trabalho teve início com a síntese dos compostos L,L-Etilenodicisteína (L,L-EC) e L,L-Etilenodicisteína dietil éster (L,L,-ECD). O primeiro foi obtido a partir da redução com sódio metálico em meio de amônia líquida do ácido R(-) tiazolidino-4-carboxílico. A esterificação do dímero resultante com etanol anidro saturado com gás clorídrico, originou o composto L,L-ECD.

O grau de pureza de cada composto foi verificado por meio da faixa de fusão e análises elementares de C,N e H (Tabela 5). As faixas de fusão obtidas são comparáveis aos valores de literatura ^(9,40,94). Os valores encontrados para as análises elementares de ambos os compostos apresentam concordância, dentro do erro experimental, com os valores calculados a partir das respectivas fórmulas moleculares.

Para caracterização dos compostos obtidos avaliaram-se os respectivos espectros na região do infravermelho e de ressonância magnética de ¹H, que confirmaram a obtenção dos produtos de interesse, por meio da identificação dos grupamentos característicos. No espectro de infravermelho do composto L,L-EC, a banda de absorção relativa ao estiramento C=O de carbonila apresentou-se como banda fina e intensa em 1593 cm^{-1} . Neste mesmo espectro observam-se as bandas de estiramento e deformação N-H de amina secundária, respectivamente a 2300-3000 e 1560 cm^{-1} , bem como as bandas de estiramento CH₂ e C-N, 2300-3000 e 1075 cm^{-1} , respectivamente.

A conversão de L,L-EC a L,L-ECD ficou caracterizada pela presença no espectro de IV do composto L,L-ECD, de banda fina e intensa de absorção relativa ao estiramento C=O de COOEt em 1737 cm^{-1} , bem como de estiramento CO do grupo EtO⁻ (1230 cm^{-1}).

O espectro de RMN-¹H do composto L,L-EC identificou os deslocamentos químicos de 2H do grupamento -CH (4,73 ppm), 4H de -CH₂-N (4,59 ppm) e 2H de -NH (4,79 ppm). Analogamente, para o composto L,L-ECD, o espectro de RMN-¹H identificou os deslocamentos químicos de 6H CH₃ (1,40 ppm), 4H CH₂-S (3,27 ppm), 4H OCH₂ (4,20 ppm), 2H -CH (4,60 ppm) e 4H CH₂-CH₂ (3,30 ppm).

Identificados os dois compostos, estudou-se as condições de marcação com ^{99m}Tc, objetivando a elaboração de conjuntos de reativos liofilizados destinados a utilização clínica.

Verificou-se que o pH, tipo e massa de agente redutor, são os fatores mais importantes na determinação da pureza radioquímica do complexo formado entre L,L-EC e ^{99m}Tc.

Os cromatogramas de CLAE das marcações efetuadas em pH diferentes (7 a 12), demonstraram que o complexo de interesse se forma em pH alcalino, mais precisamente entre 11,5 e 12. Efetuando-se a marcação em pH mais baixo, ocorreu formação de uma segunda espécie radioquímica cuja porcentagem é tanto maior quanto menor o pH utilizado, conforme demonstram a Figura 15 e Tabela 7. A análise efetuada por meio de cromatografia em camada delgada excluiu a presença de TcO₄⁻ nestas misturas.

O tempo reduzido de retenção desta segunda espécie radioquímica (3,6 minutos), sugere tratar-se de uma espécie com alta polaridade. Estudos previamente realizados em camundongos demonstraram que tal espécie radioquímica apresenta distribuição distinta do complexo de interesse, revelando alto grau de excreção hepatobiliar (116,120)

Os ligantes diaminoditiólicos tetradentados, são conhecidos por formarem compostos muito estáveis com tecnécio (Tc(V)O-complexos) com base na ligação eficiente

do grupo oxotecnécio a dois átomos S-tiol e N-amina. A experiência geral é de que podem ser marcados com ^{99m}Tc com alto rendimento em pH de aproximadamente 7 ⁽⁷⁹⁾. A preparação do L,L-ECD- ^{99m}Tc com rendimento de aproximadamente 100% é um exemplo prático disto. Entretanto, é surpreendente que a marcação direta de L,L-Etilenodicisteína, derivado di-ácido de L,L-ECD, com ^{99m}Tc em pH 7 resulte em rendimento inferior a 50% da espécie radioquímica de interesse.

A solubilidade do composto L,L-EC é maior em meio alcalino, provavelmente em função da ionização parcial dos grupos amina em valores altos de pH. Provavelmente, os prótons das aminas ionizadas podem contribuir, de certa forma, para formação do complexo L,L-EC- ^{99m}Tc .

A marcação de DADS com ^{99m}Tc , composto diaminoditiólico polar, também é normalmente realizada em pH alcalino. Entretanto, neste caso, o pH da etapa de redução parece não alterar a formação da espécie radioquímica de interesse ⁽⁴⁴⁾.

Com relação ao agente redutor empregado na marcação de L,L-EC, avaliou-se, inicialmente, a utilização de cloreto estanoso, o agente redutor mais empregado em misturas reagentes para marcação com ^{99m}Tc . Os estudos de variação da massa de cloreto estanoso determinaram porcentagem de pureza radioquímica superior a 98% para misturas reagentes contendo de 10 a 250 μg de cloreto estanoso para 1mg de L,L-EC. Massas inferiores a 10 μg resultaram no aumento da porcentagem de $^{99m}\text{TcO}_4$ e massas superiores a 250 μg resultaram no aumento da forma hidrolisada ($^{99m}\text{TcO}_2$) (Tabela 6).

Entretanto, na elaboração dos conjuntos de reativos liofilizados para marcação com ^{99m}Tc , massas inferiores a 250 μg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ não resistiram ao processo de liofilização, provavelmente em função do elevado pH da mistura, desfavorável ao agente redutor empregado. Além disto, foi necessário adaptar-se a etapa de congelamento do processo de liofilização, uma vez que a forma tradicionalmente utilizada pelo Departamento

de Radiofarmácia do IPEN (período de congelamento de 5 horas realizado nas prateleiras do liofilizador) mostrou-se inviável para este produto. O congelamento rápido com nitrogênio líquido e o início imediato do processo de desidratação, permitiram a obtenção de um produto liofilizado com estabilidade superior a 120 dias.

Buscando encontrar condições de maior estabilidade para o agente redutor durante o processo de liofilização, estudamos a utilização de ácido formamídino sulfônico (AFS), especialmente empregado em preparações alcalinas^(6,43) e de ascorbato de estanho (*TINASC*), descrito como especialmente estável⁽⁸⁾.

Marcações utilizando-se *TINASC* como agente redutor em pH 7 e 12 mostraram perfil de CLAE semelhantes aos do cloreto estanoso, ou seja, uma única espécie radioquímica em pH 12, com R_t de 18,6 minutos e o aparecimento de uma segunda espécie radioquímica na marcação efetuada em pH 7 (Figura 17). Os conjuntos reativos liofilizados com este agente redutor (105,2 μg de Sn^{+2} /frasco) mostraram-se estáveis por cerca de 30 dias, mesmo utilizando-se processo de congelamento convencional.

A marcação de compostos com estrutura N_2S_2 utilizando-se AFS como agente redutor foi empregada com sucesso no caso do composto DADS⁽⁴⁴⁾. Apesar da exigência de aquecimento durante a marcação, o AFS apresenta a vantagem de não necessitar de borbulhamento com nitrogênio gasoso. Além disto, sua estabilidade em solução aquosa é maior que a do cloreto estanoso e não existe o risco de formação de espécies hidrolisadas na marcação com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ⁽⁴³⁾.

As marcações de L,L-EC, entretanto, utilizando-se AFS como agente redutor resultaram na formação de diversas espécies radioquímicas, evidenciadas nos estudos de CLAE, inclusive para marcações efetuadas em pH 12 (Figura 16). É importante verificar que a simples alteração do agente redutor pode promover a formação de estados de oxidação do tecnécio mais ou menos favoráveis à formação do complexo de interesse.

Alguns trabalhos que descrevem a utilização de AFS alertam, inclusive, para a facilidade de complexação do próprio agente redutor com ^{99m}Tc ^(6,43,44).

De qualquer forma, os complexos assim formados podem apresentar propriedades biológicas de interesse para utilização em estudos clínicos e merecem investigação posterior.

Cabe observar que o emprego da técnica de cromatografia em camada delgada para determinação da porcentagem de pureza radioquímica, deve ser analisada com cautela uma vez que nem sempre separa todas as espécies radioquímicas presentes numa marcação. A utilização de CLAE é, pois, imprescindível nos estudos de padronização das condições de marcação de novos compostos.

No estudo da variação do volume final de marcação, por exemplo, não observou-se alteração da porcentagem de pureza radioquímica avaliada pelo método de cromatografia em camada delgada. Entretanto, pode-se verificar que o aumento excessivo do volume de marcação causou alteração no pH de marcação que diminuiu de 12 (volume final de marcação até 4,0 ml) para 10, quando o volume final atingiu 6,0 ml. Esta alteração de pH certamente promoverá a formação da segunda espécie radioquímica, conforme foi identificado nos estudos de variação do pH pela técnica de CLAE (Figura 15).

Após estabelecidas as condições ideais para marcação do composto, a cromatografia em camada delgada deve ser utilizada na rotina do controle de qualidade da produção destes conjuntos de reativos, com economia de tempo e material e com eficiência comprovada.

Uma vez efetuada a marcação de reativo liofilizado de L,L-EC com ^{99m}Tc , o pH da mistura reagente deverá ser reduzido (pH aproximadamente 7,0) antes de sua utilização *in vivo*, apesar dos volumes pequenos administrados. Desta forma, os conjuntos de reativos

liofilizados de L,L-EC serão acompanhados de frasco multidose com solução reguladora do pH como solução de ácido fosfórico 0,5M ou tampão fosfato 0,5M pH 5,0 destinadas ao ajuste do pH da marcação antes da administração ao paciente ⁽¹²⁰⁾. A neutralização da mistura reagente, após transcorrido o tempo de marcação, não altera a espécie radioquímica formada, conforme mostra o cromatograma de CLAE na Figura 14.

A marcação de L,L-ECD com ^{99m}Tc foi efetuada utilizando-se massa ainda menor de agente redutor, conforme descrito previamente ^(50,67,127). Determinou-se um limite de aproximadamente 125 µg de SnCl₂.2H₂O, acima do qual ocorre formação da espécie hidrolisada de ^{99m}Tc em porcentagem significativa (Tabela 8). Na elaboração de conjuntos reativos liofilizados de L,L-ECD, massas inferiores a 125 µg de cloreto estanoso resultaram em conjuntos reativos com pouca estabilidade.

O complexo L,L-ECD-^{99m}Tc pode ser formado em pH próximo do neutro, sem prejuízo para formação da espécie radioquímica de interesse. Entretanto, as preparações liofilizadas neste pH mostraram-se pouco estáveis durante período de armazenamento. As preparações liofilizadas em pH ácido (entre 2,0 e 4,0) mostraram-se mais estáveis certamente por ser um pH mais compatível com o agente redutor empregado (cloreto estanoso), podendo ser armazenadas por período superior a 120 dias.

A análise por CLAE das marcações realizadas em pH ácido e neutro bem como da marcação efetuada sem a presença de EDTA e manitol não mostraram alterações no padrão cromatográfico, indicando a formação do mesmo complexo para as três condições, com Rt de aproximadamente 47 minutos (Figura 18). De fato, o EDTA é adicionado ao conjunto reativo liofilizado como um agente anti-oxidante. Manitol é comumente utilizado como componente inerte, responsável pelo aumento da concentração em preparações liofilizadas, de modo a obter-se uma pastilha com bom aspecto comercial e, principalmente, prevenir a ocorrência do aspecto de "teia de aranha", comum em preparações liofilizadas a baixas concentrações.

Nas marcações de ECD com ^{99m}Tc analisadas em CLAE, obteve-se R_t elevado para a espécie L,L-ECD- ^{99m}Tc , quando comparado com o obtido na literatura ⁽¹¹⁸⁾, em função das características da mistura gradiente empregada. Realizou-se, comparativamente, marcação e análise por CLAE nas condições descritas, de uma amostra de L,L-ECD cedida pela Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA), para a qual encontrou-se o mesmo padrão cromatográfico.

Na elaboração dos conjuntos de reativos liofilizados de L,L-ECD também houve a necessidade de trabalhar-se com períodos curtos de congelamento antes da liofilização, utilizando-se nitrogênio líquido, de modo a preservar a integridade da massa pequena de agente redutor presente na formulação.

No momento da marcação para utilização *in vivo*, o conjunto de reativo liofilizado em pH ácido poderá ser reconstituído com volume adequado de tampão pH neutro antes da introdução da solução radioativa, originando um radiofármaco com pH apropriado para administração. Poderá, ainda, ser utilizada a técnica de marcação por transferência, reconstituindo-se o liofilizado com 1,2 ml de solução de NaCl 0,9% e transferindo 1,0 ml desta solução para um frasco contendo volume adequado de tampão pH neutro, antes da marcação com ^{99m}Tc ⁽¹²⁷⁾.

Apesar da literatura consultada descrever a técnica de marcação por transferência ^(41,127), em nossos estudos, não observamos diferenças na porcentagem de pureza radioquímica dos produtos marcados por ambas as técnicas. Entretanto, para melhor definição da condição ideal de marcação, reconhece-se a necessidade da avaliação comparativa da reprodutibilidade de ambos os métodos de marcação em diferentes lotes de conjuntos de reativos liofilizados de L,L-ECD, antes de optar-se definitivamente pelo método mais simples e seguro de marcação direta.

Afshan e colaboradores ⁽²⁾, descreveram recentemente a elaboração de conjuntos de reativos liofilizados de L,L-ECD em diferentes pH, (4,5 a 7,5). Segundo o trabalho, a quantidade de pertecnetato nas preparações aumentou rapidamente em pH abaixo de 5,0 e as marcações de conjuntos reativos liofilizados em pH 7,5 resultaram na formação de apenas 25% da espécie radioquímica de interesse. Os autores sugerem a elaboração de conjuntos reativos liofilizados para marcação direta com tecnécio, estabilizados em pH de aproximadamente 6,0.

Em nossos estudos não observamos a queda da pureza radioquímica em marcações efetuadas a partir de conjuntos de reativos liofilizados em pH ácido. Além disso, convém ressaltar, que nos estudos de Afshan e colaboradores, os autores não mencionam a estabilidade, frente a longos períodos de armazenamento, dos conjuntos reativos liofilizados em pH 6,0, nem tão pouco apresentam dados quanto a reprodutibilidade dos resultados obtidos em diferentes lotes. Desta forma, optou-se pela liofilização dos conjuntos reativos em pH ácido, assegurando estabilidade durante longos períodos de armazenamento e, até que se estabeleça o contrário, a marcação deverá ser realizada por método de transferência.

Paralelamente ao desenvolvimento de conjuntos de reativos liofilizados para pronta marcação de L,L-EC e L,L-ECD, realizou-se estudo de distribuição biológica em animais dos respectivos complexos de ^{99m}Tc, objetivando a definição de modelos compartimentalizados de distribuição farmacocinética.

O estudo da distribuição biológica do complexo L,L-EC-^{99m}Tc em camundongos possibilitou determinar o grau de seletividade do composto pelos diferentes órgãos avaliados. O clareamento sanguíneo do composto (Tabela 9) é bastante rápido e a porcentagem da dose presente no sangue e plasma são praticamente iguais, o que indica que o composto é transportado no sangue quase que exclusivamente por sua fração plasmática. A porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas determinada pelo método de precipitação com ATC ($30,64 \pm 6,90\%$), é bastante próxima da determinada para humanos

pelo método de ultracentrifugação ($28,5 \pm 2,5\%$ ⁽⁸⁷⁾ ou $31 \pm 7\%$ ⁽¹¹⁵⁾) e sensivelmente menor que a do composto $\text{MAG}_3\text{-}^{99\text{m}}\text{Tc}$, que chega a atingir 90% ⁽¹¹⁵⁾ .

As Tabelas 10 e 11 demonstram que a captação do complexo nos diversos órgãos é significativamente baixa quando comparada à captação renal, indicando pequena interferência de órgãos adjacentes na aquisição de imagens cintilográficas renais. A captação renal, que chega a atingir 37% da dose administrada no primeiro minuto após administração, decai rapidamente com o tempo, indicando a eliminação renal do composto sem acúmulo no parênquima, e caracterizando o composto como um radiofármaco de função, com aproximadamente 90% da dose administrada sendo eliminada pela urina após 60 minutos (Tabela 15).

As imagens cintilográficas seqüenciais obtidas em coelho confirmam o rápido clareamento sanguíneo do composto $\text{L.L-EC-}^{99\text{m}}\text{Tc}$, a captação renal e a rápida eliminação urinária, verificando-se acúmulo do radiofármaco na bexiga já nos primeiros instantes após a administração da dose. Contribuem para a definição de imagem excelente, o clareamento rápido do composto, sem acúmulo significativo em órgãos adjacentes, bem como as características favoráveis de colimação do elemento radioativo empregado.

Estudos efetuados em camundongos pré-tratados com probenicida (um bloqueador da função tubular renal), demonstraram que a excreção renal do complexo $\text{L.L-EC-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ é feita principalmente por transporte tubular ativo, provavelmente pelas mesmas proteínas transportadoras responsáveis pela extração e transporte dos ânions hipurato ^(75,120)

A própria porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas sugere a eliminação do composto por processo de secreção tubular, uma vez que tal ligação não restringe a secreção tubular, o mesmo não podendo ser dito para filtração glomerular. No processo de secreção tubular renal, assim que o plasma entra em contato com a membrana plasmática, a fração livre do composto a ser secretado liga-se às proteínas de transporte e é removida. A

ligação a tais proteínas é um processo dinâmico e o equilíbrio é rapidamente restabelecido. A fração livre do equilíbrio é então secretada ^(45,64).

A eliminação intestinal do composto é desprezível, conforme indicam os estudos de captação intestinal (intestino cheio e vazio), bem como o estudo de eliminação biliar (Tabelas 16 e 17).

De fato, a predominância da eliminação urinária do composto é confirmada nos estudos de retenção no corpo inteiro (Tabela 14), onde podemos observar, ponto por ponto, que a porcentagem da dose retida no organismo é aproximadamente 100% menos a quantidade eliminada na urina com exceção do tempo de um minuto após a administração da dose, para o qual a determinação da porcentagem da dose eliminada na urina foi subestimada pela técnica de retirada da bexiga.

No caso da coleta de bile, deve-se considerar ainda que os valores expressos representam a porcentagem acumulada para cada tempo, uma vez que o duto biliar foi canulado para coleta da bile, sem retorno para o organismo. Os resultados são, portanto, indicativos do fluxo biliar do composto, sem considerar uma possível reabsorção sanguínea. A mesma observação é válida para o composto L,L-ECD-^{99m}Tc e, por este motivo, os dados experimentais de captação biliar não foram incluídos na elaboração dos modelos de compartimentalização.

O composto cujo clareamento mais se aproxima do fluxo plasmático renal total é o ácido p-amino-hipúrico (PAH) ⁽⁹⁰⁾. Cerca de 10 a 20% do composto é excretado por filtração glomerular e aproximadamente 80% por secreção tubular o que resulta em uma eficiência efetiva de aproximadamente 90%. Seu análogo radioativo, o o-iodo-hipurato de sódio (Hipuran-¹³¹I), apresenta eficiência de extração relatada de cerca de 85% ^(10,45).

A cinética de distribuição do Hipuran-¹³¹I no organismo obedece a um modelo farmacocinético compartimentalizado de 2 compartimentos, um intra e um extra vascular e um terceiro compartimento (externo), representado pela urina. A dose administrada no compartimento 1 (sanguíneo) permuta com um segundo compartimento e com uma via de depuração unidirecional contínua do reservatório plasmático. Isso produz uma depuração plasmática biexponencial ⁽¹⁰³⁾.

Van Neron e col ⁽¹¹⁵⁾ realizando estudos comparativos entre L,L-EC-^{99m}Tc e MAG₃-^{99m}Tc em indivíduos voluntários assumiu um modelo bicompartimental de distribuição para o complexo L,L-EC-^{99m}Tc para calcular o clearance plasmático e o volume de distribuição dos dois compostos. Os resultados obtidos em nossos estudos de distribuição biológica permitiram a elaboração de um modelo farmacocinético de distribuição para o complexo L,L-EC-^{99m}Tc, que confirma a expectativa assumida por Van Neron e col.

O modelo de três compartimentos proposto (Figura 12) foi ajustado satisfatoriamente aos dados experimentais com ajuda do programa ANACOMP ⁽⁷⁷⁾. O modelo possui um compartimento central ou sanguíneo no qual o composto é administrado e se distribui de forma reversível com um compartimento 2, extravascular. Analogamente ao Hipuran-¹³¹I, uma via de depuração unidirecional contínua, que representa a depuração renal, excreta rapidamente o composto do compartimento central, produzindo uma depuração plasmática biexponencial (f_1).

O clareamento sanguíneo rápido fica caracterizado pela magnitude das constantes de transferência k_{12} e k_{13} , respectivamente 0,651 e 0,438 min⁻¹.

A constante de eliminação k_{13} expressa a velocidade de eliminação renal do composto. Ajustado aos valores experimentais, inclusive os de corpo inteiro, o modelo

confirma a predominância da excreção renal sobre a fecal, neste caso, praticamente inexistente.

Verbruggen e colaboradores ⁽¹²⁰⁾, realizando estudo comparativo em camundongos entre Hipuran-¹³¹I, MAG₃-^{99m}Tc e L,L-EC-^{99m}Tc, determinaram que 30 minutos após administração, a concentração sanguínea e a quantidade eliminada na urina são significativamente maiores para os compostos Hipuran-¹³¹I e L,L-EC-^{99m}Tc, em favor do segundo. Comparado ao MAG₃-^{99m}Tc neste mesmo instante, L,L-EC-^{99m}Tc exibe excreção urinária significativamente maior, menor retenção renal e menor excreção intestinal. Segundo o autor, L,L-EC-^{99m}Tc parece ser mais apropriado que MAG₃-^{99m}Tc para determinação do fluxo plasmático renal efetivo, com base nos estudos realizados em animais ⁽¹²⁰⁾. O modelo de distribuição biológica obtido para o composto, semelhante ao do Hipuran-¹³¹I, confirma os resultados obtidos por Verbruggen e colaboradores.

De acordo com a teoria de Despopolous para transporte tubular de ânions, o substrato a ser transportado deve possuir a seguinte característica estrutural ⁽³³⁾:

$R - C=O - NX - (CHR')_n - COOH$, onde R e R' podem ser alifáticos ou aromáticos, X pode ser um H ou grupamento metila e quando R' for H, n pode variar de 1 a 5. Além disto, a presença concomitante dos grupos carboxila e carbonila é indispensável para a interação.

O composto L,L-EC-^{99m}Tc contém duas vezes uma sequência oxotecnécio glicina, TcO-NH-CH₂-COOH (TcO-G), que, estruturalmente, assemelha-se a cadeia lateral -CO-G do Hipuran e à estrutura proposta por Despopolous. Sanyal e colaboradores, já demonstraram a eliminação tubular de alguns quelatos de cisteína ⁽⁹²⁾. Assim, as sequências TcO-G são, provavelmente, responsáveis pelo transporte eficiente do composto pela proteína receptora tubular postulada. A presença e a posição do grupo carboxila em relação ao núcleo Tc=O também parece ser importante na interação do composto com o receptor.

Tal fato parece bastante claro quando se analisa comparativamente outros radiofármacos renais propostos. O complexo DADS-CO₂-^{99m}Tc, mais especificamente o diastereômero com grupos oxotecnécio e carboxila em posição *cis*, apresenta padrão de excreção mais favorável que o DADS-^{99m}Tc. Desta forma, assume-se que os grupos ricos em elétrons são simultaneamente envolvidos no contato deste composto com o receptor renal. Também no caso do composto MAG₃-^{99m}Tc, o grupo carboxila terminal pode girar livremente tornando-se hábil a assumir uma orientação *cis* com respeito ao núcleo oxotecnécio. No L,L-EC-^{99m}Tc, um dos grupos carboxila é orientado na mesma direção que o TcO-core (*cis*), devendo participar ativamente da interação com o receptor, e o outro em direção oposta (*trans*)⁽¹²⁰⁾.

De fato, Despopoulos⁽³³⁾ já havia demonstrado que vários compostos que mantêm configuração espacial dos grupos carbonila e carboxila similares à configuração do Hippuran são também transportados. A complexação do L,L-EC com ^{99m}Tc parece estabelecer uma geometria satisfatória para o grupamento carboxílico e o núcleo TcO de modo a satisfazer as exigências de interação com o receptor.

Como ressaltado anteriormente, o composto L,L-EC é um dímero de cisteína. A excreção natural de alfa-aminoácidos ocorre por filtração glomerular e é modificada por subsequente absorção tubular. Como os aminoácidos não possuem grupo carbonila crítico, não é surpresa que não sejam excretados por transporte tubular. Contudo, deve-se considerar que os peptídeos, em virtude de suas ligações amida, assemelham-se à cadeia lateral do hipurato e podem ser descritos como tendo estrutura geral para substrato de transporte renal. Segundo Despopoulos⁽³³⁾, a ação de peptidases no sangue, pode destruir estas ligações amida e eliminar a afinidade potencial para o transporte.

Embora desconhecendo-se a ação de peptidases sobre o dímero de cisteína L,L-EC, tal ação parece não ser efetiva para o composto marcado com ^{99m}Tc. A análise por cromatografia em camada delgada de amostras de urina coletadas em diversos tempos após

a administração da dose revelaram a presença de uma única espécie radioquímica com o mesmo padrão cromatográfico da espécie administrada, sugerindo que o composto foi eliminado na forma íntegra.

De forma semelhante ao L,L-EC, MAG_3 também possui estrutura básica de um peptídeo de glicina. Novos derivados do composto MAG_3 foram propostos, substituindo-se um ou mais de seus grupos glicil por outro aminoácido, mais especificamente por alanina, originando os derivados C-metil do MAG_3 . Estes derivados podem assumir configuração D ou L. A marcação de cada uma destas configurações com ^{99m}Tc resultam em misturas de dois diastereoisômeros, obviamente devido à presença de um centro quiral no esqueleto do ligante. Separados em CLAE, as espécies são designadas A e B, em função da ordem de eluição. Estudos demonstraram que o primeiro diastereomero do mercaptoacetil glicil-D-alanil-glicina- ^{99m}Tc ($MAGAG-DA-^{99m}Tc$), possui características de excreção renal superiores aos outros derivados e até mesmo superiores ao $MAG_3-^{99m}Tc$ ⁽¹⁵⁾.

A adição de um grupamento metila à cadeia tripeptídica do MAG_3 resulta em um aumento da lipofilicidade do $MAGAG-DA-^{99m}Tc$ quando comparada à do $MAG_3-^{99m}Tc$, que é caracterizado pelo maior tempo de retenção em CLAE de fase reversa dos diastereômeros do $MAGAG$ em relação ao MAG_3 .

A princípio se poderia supor que o aumento da lipofilicidade de um composto aniônico pudesse estar diretamente correlacionado à diminuição de sua velocidade de eliminação renal, mediada pelas proteínas transportadoras. Contrariamente, o composto $MAGAG-DA-^{99m}Tc$ apresentou características mais favoráveis de eliminação que o $MAG_3-^{99m}Tc$, sugerindo que o transporte mediado pelas proteínas tubulares dependa, em maior extensão, de outros fatores, tais como a distribuição de cargas parciais e de grupamentos polares e lipofílicos da substância, sua configuração, a presença de ligações hidrogênio inter e intra moleculares, densidade eletrônica e, finalmente, um arranjo estrutural apropriado que permita uma interação eficiente com o receptor ^(5,15).

De fato, outros derivados C-metil-MAG₃-^{99m}Tc, como o mercaptoacetil-L-alanilglicilglicina-*B*-^{99m}Tc (MAAGG-LB-^{99m}Tc), mercaptoacetil-glicilglicil-L-alanina-*B*-^{99m}Tc (MAGGA-LB-^{99m}Tc), mercapto-acetil-L-alanil-L-alanilglicina-*B*-^{99m}Tc (MALALAG-*B*-^{99m}Tc) e mesmo o isômero *LB* do MAGAG, apresentaram padrão de eliminação renal bastante inferiores e captação renal significativa, indicando desta forma a importância do posicionamento do grupamento metila para interação apropriada com o receptor, bem como da configuração assumida, uma vez que, em todas as espécies estudadas, os isômeros eluídos primeiramente (*A*), apresentaram propriedades de excreção superiores aos isômeros eluídos tardiamente (*B*) ⁽¹⁴⁾.

Estudos de determinação da configuração utilizando cristalografia de RX parecem indicar que nas espécies *A*, o grupo metila encontra-se orientado em posição *anti* em relação ao grupo oxo-tecnécio. Tal configuração parece ser determinante da velocidade de eliminação dos compostos na urina ⁽¹⁵⁾.

Se a lipofilicidade do composto, por si só, não é indicativa da eficiência do transporte tubular renal, que depende, outrossim, da distribuição parcial de cargas e grupos lipofílicos e polares na substância, parece claro, contudo, que a presença e orientação dos grupamentos carboxílicos na estrutura do complexo L,L-EC-^{99m}Tc é fundamental para o transporte.

O composto L,L-ECD-^{99m}Tc, forma esterificada do dímero L,L-EC-^{99m}Tc, apresenta não somente padrão de eliminação renal diferenciado, mas também propriedades de distribuição biológica distintas, apesar de sua similaridade estrutural com a forma di-ácida.

A introdução dos grupamentos etila aumenta a lipofilicidade do composto em relação à espécie di-ácida, conforme indicado pelo aumento no tempo de retenção da espécie em CLAE (47 minutos).

A presença de ambos os grupamentos etila confere ao complexo de TcO neutralidade e lipofilicidade, permitindo que o composto atravesse a barreira hematoencefálica intacta. A captação do composto em cérebro de camundongo é significativamente maior que da espécie di-ácida (Tabela 12). A capacidade do composto em atravessar a barreira hematoencefálica é ainda mais evidente no estudo cintilográfico realizado em cão (Figura 24). A farmacocinética do L,L-ECD-^{99m}Tc é apropriada para obtenção de imagens de perfusão cerebral, uma vez que o composto clareia muito mais lentamente no cérebro que em outros órgãos. O clareamento é rápido em todas as áreas não cerebrais da cabeça, resultando em excelente contraste entre o cérebro e tecido adjacente quando se realiza imagem planar. O clareamento sanguíneo rápido e a retenção pulmonar mínima deste agente também contribuem para a excelente qualidade de imagem, eliminando qualquer radiação de fundo que pudesse suprir constantemente o cérebro de atividade.

Se a lipofilicidade associada ao complexo L,L-ECD-^{99m}Tc confere-lhe a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, a obtenção de imagens de SPECT convencionais requer ainda que a atividade seja aprisionada por longos períodos no sítio de captação cerebral, devendo o quelato apresentar um mecanismo de aprisionamento no cérebro, conforme observado para o composto L,L-ECD-^{99m}Tc ⁽¹²⁴⁾.

Três mecanismos são considerados como efetivos para o aprisionamento eficiente do radiofármaco no cérebro: (1) ligação do quelato intacto a componentes celulares, proteínas ou outras moléculas na célula; (2) conversão do quelato neutro intacto a uma forma carregada, não difusível e (3) dissociação química intracelular do quelato de ^{99m}Tc para produzir outras espécies não difusíveis ⁽¹²⁴⁾.

No caso do L,L-ECD-^{99m}Tc, após difusão passiva do quelato através da barreira hematoencefálica, o aprisionamento ocorre por conversão do quelato neutro e lipofílico a uma forma hidrofílica, carregada, no interior das células cerebrais. O resultado de estudos *in vitro*, incubando-se o complexo com homogenato de cérebro de macaco, demonstrou que o

processo envolve reação de hidrólise de um grupo éster por uma esterase, mantendo intacto o núcleo $BAT\text{-}^{99m}\text{Tc}$ do complexo ⁽¹¹⁸⁾. O estudo conclui que os metabólitos são, provavelmente, os derivados diastereoméricos mono-éster mono-ácido formados por hidrólise enzimática de uma das funções éster do $L,L\text{-ECD-}^{99m}\text{Tc}$. Como o derivado A (primeiro a ser eluído no estudo de CLAE) é formado em menor quantidade que o B, conclui-se que uma das funções ester é hidrolisada mais lentamente, provavelmente devido a impedimento estérico ⁽⁴²⁾. A estrutura em pirâmide quadrada do $L,L\text{-ECD-}^{99m}\text{Tc}$, origina dois derivados diastereoméricos mono-éster mono-ácido, com o núcleo oxotecnécio respectivamente *syn* e *anti* com relação ao grupo ester hidrolisado.

Estudos realizados em macacos demonstram que o complexo $D,D\text{-ECD-}^{99m}\text{Tc}$ atravessa a barreira hematoencefálica mas é rapidamente clareado do cérebro ⁽⁴¹⁾. Ao contrário da espécie L,L que sofre hidrólise por ação de esterases presentes no homogenato de cérebro de macaco, a espécie D,D praticamente não sofre ação das esterases, revelando velocidade de metabolismo extremamente lenta ⁽¹¹⁸⁾.

A dependência estereoquímica destes processos indica ligação altamente específica ao sítio de ligação enzimática que reconhece a orientação tri-dimensional da cadeia lateral em relação ao núcleo TcO^{+3} ⁽¹²²⁾.

De fato, a hidrólise do composto $L,L\text{-ECD-}^{99m}\text{Tc}$ *in vivo* não ocorre somente no cérebro. A função das enzimas é modificar a estrutura de qualquer composto invasor (necessário ou estranho), de modo que este seja mais facilmente eliminado e para tanto, iniciam reações que tornam as moléculas mais hidrossolúveis. Ésteres e, mais lentamente, amidas, são hidrolisadas por enzimas no sangue, microsomas hepáticos, rins e muitos outros tecidos ⁽¹⁰⁷⁾.

Em função de suas características lipofílicas, o composto $L,L\text{-ECD-}^{99m}\text{Tc}$ apresenta significativa eliminação intestinal (Tabela 16). A captação hepática do composto é

significativamente maior que da espécie di-ácida (menos lipofílica), apresentando intenso fluxo biliar (Tabela 17). O fígado, centro metabólico do organismo, promove, de forma geral, a conversão da droga em espécies menos lipofílicas. O cromatograma de CLAE da bile acumulada de 60 minutos mostra as mesmas espécies metabólicas observadas na urina e ainda evidencia a presença de outras espécies radioquímicas, todas com R_t inferior à da espécie íntegra, L,L-ECD- ^{99m}Tc (Figura 21).

Submetendo-se o produto de hidrólise alcalina de L,L-ECD- ^{99m}Tc à análise por CLAE (Figura 19), encontrou-se perfil cromatográfico conforme descrito na literatura ⁽¹¹⁸⁾, com quatro picos, correspondentes à espécie não metabolizada do quelato ($R_t = 47$ minutos), às duas espécies mono-éster ($R_t = 25$ e 30 minutos) e à espécie di-ácida ($R_t = 17$ minutos). Tanto neste caso, como no caso da hidrólise provocada por metabolismo *in vivo* (CLAE da urina), a espécie mono-éster eluída primeiramente é formada em quantidade menor que a espécie eluída posteriormente.

Observando-se o cromatograma da CLAE da urina acumulada de 60 minutos podemos verificar que a espécie íntegra di-etilada, é eliminada mais tardiamente, não somente pela possível dificuldade de interação com o receptor, mas também por apresentar maior afinidade de ligação às proteínas plasmáticas. De fato, a afinidade da espécie di-esterificada pela proteína plasmática é muito maior que da espécie di-ácida, conforme indicam os estudos de porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas (Tabela 18). Tal afinidade pode estar correlacionada à maior lipofilicidade associada ao complexo L,L-ECD- ^{99m}Tc quando comparado ao metabólitos mais polares.

Estudos realizados em humanos revelaram que após seis horas, 75% da dose administrada de L,L-ECD- ^{99m}Tc havia sido excretada na urina. Toda a atividade urinária era correspondente às espécies metabolizadas do composto (di-ácida e mono-éster) ⁽¹²⁶⁾.

A presença observada em nossos estudos da forma íntegra, L,L-ECD-^{99m}Tc na urina dos camundongos de 60 minutos, deve-se, muito provavelmente, às diferenças no processo de metabolização do composto, quando se considera diferentes espécies.

A base geral para estas diferenças específicas entre espécies na biotransformação de drogas, reside, primariamente, em diferenças entre a natureza, número e atividade de enzimas que catalizam as reações individuais. Várias espécies diferem marcadamente não somente nos níveis basais e atividades das enzimas de biotransformação em adultos normais, mas também em sua regulação. Isto inclui respostas a agentes indutores e repressores, diferenças entre sexo, idade, desenvolvimento, resposta a fatores hormonais e a vários fatores nutricionais e patogênicos ^(56,107).

A lipofilicidade associada ao composto L,L-ECD-^{99m}Tc, determinou para o mesmo uma cinética de distribuição completamente diferente da observada para a espécie di-ácida, L,L-EC-^{99m}Tc. O modelo proposto para o composto, com sete compartimentos, revela considerável complexidade (Figura 13). Deve-se considerar que a coleta de dados experimentais, utilizada na elaboração do modelo, considera a atividade total, sem discriminar as frações correspondentes às espécies metabolizadas do composto. De certa forma, o modelo é útil para estabelecer análises comparativas em termos estruturais. Nele observa-se o clareamento sanguíneo rápido do composto, bem como a eliminação do composto que se faz por duas rotas principais, a urinária e a fecal. Devido a lipofilicidade do composto, a rota de eliminação fecal assume papel importante neste caso.

Comparativamente à espécie di-ácida L,L-EC-^{99m}Tc, a constante k_{13} de eliminação urinária do complexo L,L-ECD-^{99m}Tc é inferior ($0,438 \text{ min}^{-1}$ contra $0,118 \text{ min}^{-1}$, respectivamente).

Pelo mesmo motivo, a captação hepática do composto é significativamente maior que da espécie di-ácida. O fígado, compartimento dois do modelo, representa um

compartimento de metabolização do composto. O retorno da bile para o compartimento sanguíneo foi sugerido em virtude da presença de espécies metabolizadas outras que não as formas mono-éster e di-ácida na urina. Tais espécies metabolizadas no fígado seriam, em parte, reabsorvidas e eliminadas na urina em tempos mais tardios de observação. De qualquer forma, as constantes de eliminação k_{13} e k_{45} , que representam, respectivamente, a eliminação urinária e fecal, confirmam a predominância da eliminação urinária sobre a fecal.

Verbruggen e col. ⁽¹¹⁸⁾, realizaram um importante estudo, reinjetando em camundongos as espécies mono-éster originadas da hidrólise dos compostos D,D e L,L-ECD-^{99m}Tc. Cada uma destas configurações originaram os dois derivados diastereoméricos, identificados em CLAE por *A* (espécie eluída primeiramente) e *B* (espécie eluída tardiamente). Conforme esperado, nenhuma das espécie metabólicas ionizadas foi capaz de atravessar a barreira hematoencefálica.

Os resultados mais interessantes deste estudo, contudo, dizem respeito a eliminação dos compostos. Os isômeros *A* são excretados na urina mais rapidamente que *B*. Se no metabolismo *in vivo* dos complexos íntegros, as espécies *A* formam-se em menor quantidade, significa que elas ainda contêm o grupo éster mais facilmente hidrolisável. Desta forma, quando reinjetados intravenosamente, estas espécies são rapidamente hidrolisadas originando a forma di-ácida, enquanto que as espécies *B* permanecem intactas por um período de tempo mais prolongado. Também é lógico assumir que o derivado di-ácido é mais rapidamente clareado pelos rins e excretado na urina que os metabólitos mono-éster mais lipofílicos.

No mesmo estudo, a atividade no intestino 10 minutos após a administração da dose é baixa para todos os metabólitos testados, exceto para o isômero L,L-A, que mostra a mais alta excreção total (urina + intestino), tanto aos 10 como aos 30 minutos ⁽¹¹⁸⁾.

As enzimas hidrolíticas possuem, indubitavelmente, afinidade mais alta por compostos com uma configuração -L natural e assim a hidrólise do grupo éster irá ocorrer em taxa maior para o isômero L,L-A, que contém tanto o grupo éster mais facilmente hidrolisável como a configuração L,L mais apropriada ⁽¹¹⁸⁾.

O fato de o isômero D,D-A ser excretado em grau maior pela urina aos 10 minutos, mas não no intestino, leva a supor que o transporte deste tipo de composto do fígado para o intestino é um processo carregador-mediado para o qual a configuração L é preferencial, enquanto a excreção urinária seria um fenômeno não estereoespecífico. Isto pode explicar porque encontra-se uma atividade maior aos 30 minutos no fígado e intestino para os isômeros L,L e no sistema renal para os D,D. Da mesma forma, pode-se entender porque o isômero L,L-A é o único que é clareado eficientemente do fígado aos 30 minutos ⁽¹¹⁸⁾.

Em nossos estudos verificou-se no cromatograma de CLAE da amostra de bile, que o perfil de formação das espécies monoéster se inverte, quando comparado ao perfil da hidrólise alcalina ou das amostras de urina. Observa-se uma maior porcentagem da espécie com $R_t = 25$ minutos quando comparada à espécie com $R_t = 30$ minutos. De acordo com os resultados obtidos nos estudos de readministração dos metabólitos mono-éster, a espécie eluída primeiramente seria clareada mais rapidamente do fígado (estereoseletividade) e a captação hepática residual observada poderia ser atribuída à espécie eluída mais tardiamente.

Pode-se estabelecer, desta forma, que após sua administração, o complexo L,L-ECD-^{99m}Tc sofre ação de enzimas hidrolisantes (esterases) em diferentes sítios do organismo, tais como sangue, cérebro, fígado e rins, determinando a eliminação do composto na forma metabolizada por ambas as vias de eliminação.

A metabolização cerebral é responsável pelo aprisionamento do composto no cérebro, que permite a aquisição de imagens cintilográficas. De fato, estudos previamente realizados incubando-se o complexo L,L-ECD-^{99m}Tc com órgãos isolados de ratos, evidenciaram a conversão do complexo neutro para espécies mais polares no sangue, cérebro, pulmão, coração, fígado e rins ^(12,13).

Se, por um lado, a metabolização do composto já a nível sanguíneo determina o clareamento rápido de regiões da cabeça que não o cérebro, facilitando a aquisição de imagens cerebrais e contribuindo para a rápida eliminação do composto, por outro lado, a conversão de fração significativa do quelato difusível, no trânsito, do sítio de administração intravenoso até o cérebro na corrente sanguínea, dificulta a quantificação do fluxo sanguíneo regional ⁽¹²⁴⁾.

Com o objetivo de maximizar a eficiência dos agentes de perfusão cerebral existentes e dos futuros, é essencial entender melhor a relação entre a estrutura do quelato de tecnécio e sua captação, retenção e clareamento do cérebro normal e doente, bem como em outros tecidos não alvo. Isto requer o conhecimento detalhado das propriedades físico-químicas e estereoquímicas dos quelatos e de suas características farmacocinéticas.

Assim, apesar dos radiofármacos não possuírem essencialmente atividade terapêutica, sendo por esta razão comumente designados como fármacos de diagnóstico, a eficácia de sua utilização está diretamente relacionada às propriedades estruturais determinantes de sua distribuição biológica. O desenvolvimento de novos radiofármacos não poderá, pois, prescindir da utilização de novos métodos racionais de planejamento de fármacos, como o *QSAR* e a modelagem molecular.

Acreditamos ter contribuído, com este estudo, para o desenvolvimento de novos radiofármacos de tecnécio, baseados em núcleo Tc(O)N₂S₂. Os dois compostos estudados representam extremos de polaridade e apolaridade, que definem para cada um,

propriedades biológicas e, conseqüentemente, aplicações clínicas distintas. Os estudos de otimização das condições de marcação e, especialmente, os estudos de distribuição farmacocinética efetuados representam importantes subsídios para estudos comparativos, a serem realizados em compostos elaborados a partir da introdução de grupamentos laterais, racionalmente escolhidos, no núcleo central dos compostos diaminoditiólicos.

VI - CONCLUSÕES

1. Os compostos L,L-Etilenodicisteína (L,L-EC) e L,L-Etilenodicisteína dietil éster (L,L-ECD) foram obtidos com rendimento satisfatório, na forma pura e caracterizados por IV e RMN-¹H.
2. Os estudos de determinação das condições de marcação dos compostos L,L-EC e L,L-ECD com Tecnécio-^{99m}, determinaram que parâmetros como tipo e massa de agente redutor e o pH da mistura reagente são determinantes para formação da espécie radioquímica de interesse.
3. Foram obtidos conjuntos de reativos liofilizados de L,L-EC e L,L-ECD para marcação com ^{99m}Tc, com estabilidade superior a 120 dias, quando armazenados em geladeira, viabilizando a comercialização dos produtos. A formulação ideal para cada caso, bem como a introdução de etapa de congelamento com nitrogênio líquido, foram determinantes do sucesso do processo de liofilização.
4. Os estudos de distribuição biológica do complexo L,L-EC-^{99m}Tc, determinaram o rápido clareamento sanguíneo do composto, com eliminação predominantemente urinária. A eliminação rápida do composto, a presença da forma íntegra na urina, bem como a porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas relativamente baixa, falam a favor da eliminação por processo de secreção tubular ativa.
5. A farmacocinética do complexo L,L-EC-^{99m}Tc foi ajustada a um modelo de três compartimentos, à semelhança de outros compostos renais eliminados via secreção tubular ativa. A rápida depuração do composto e seletividade pelos rins, sem captação significativa em órgãos adjacentes, determinam a utilização do complexo em estudos dinâmicos renais.

6. A presença e posicionamento de grupos polares na estrutura do complexo L,L-EC-^{99m}Tc (grupos carbonil e carboxil) parecem ser determinantes da interação do composto com os receptores tubulares renais, mediadores do transporte tubular ativo.

7. Os estudos de distribuição biológica do complexo L,L-ECD-^{99m}Tc, determinaram a capacidade do composto em atravessar a barreira hematoencefálica intacta. Tal propriedade estaria relacionada à neutralidade e lipofilicidade do composto, esta última relativamente maior que da espécie L,L-EC-^{99m}Tc, conforme indicam os tempos de retenção das espécies em CLAE. A permanência do composto no cérebro está relacionada a sua metabolização a espécies mais polares.

8. A lipossolubilidade associada ao composto L,L-ECD-^{99m}Tc determina características de distribuição farmacocinética distintas do complexo di-ácido. Metabolizado *in vivo* por ação de esterases, o complexo apresenta clareamento sanguíneo mais lento e é eliminado por via urinária e fecal.

9. A farmacocinética do composto L,L-ECD-^{99m}Tc foi ajustada a um modelo complexo constituído de sete compartimentos. Apesar de tal modelo não discriminar as espécies metabólicas presentes, ele orienta de forma explícita os locais de biotransformação e via de transporte hepato-biliar e renal, caracterizados com os dados obtidos e com as constantes de transferência.

10. A análise por CLAE da urina de camundongos administrados com L,L-ECD-^{99m}Tc revela a presença das formas metabolizadas do composto (espécie di-ácida e mono-ésteres) e da espécie íntegra, de forma semelhante ao cromatograma obtido para hidrólise alcalina, sendo que a espécie mono-éster eluída primeiramente é eliminada em porcentagem inferior à eluída mais tardiamente, sugerindo que a metabolização do composto por ação das esterases é estereoquimicamente dependente. A presença da espécie íntegra na urina de camundongos, não observada em estudos realizados com outras espécies, relaciona-se,

provavelmente, a diferenças inter-espécie envolvidas no processo de metabolização do composto.

11. A análise por CLAE da bile de camundongos administrados com L,L-ECD-^{99m}Tc revela a presença das mesmas espécies polares observadas na urina, bem como a presença de outras espécies radioquímicas que também podem ser identificadas na urina de 60 minutos, sugerindo reabsorção a partir da bile, após metabolização hepática do composto. Além disto, o estudo da bile em CLAE confirma a suposição estabelecida em outros estudos, de eliminação em maior porcentagem por esta via, da espécie mono-éster eluída primeriamente, ao contrário do padrão cromatográfico urinário, indicando clareamento hepático mais rápido desta espécie (estereoseletividade) e sugerindo que a captação hepática residual seja atribuída à espécie mono-éster eluída mais tardiamente.

12. Os estudos de otimização das condições de marcação e os estudos de distribuição farmacocinética efetuados para os dois compostos diaminoditiólicos que apresentam propriedades físico-químicas distintas, determinadas por suas características estruturais, representam importante subsídeo para estudos comparativos a serem realizados em novos compostos elaborados a partir do núcleo Tc(O)N₂S₂.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDEL-DAYEM, H.M.; SADEK, S.; AL-BAHAR, R.; SABHA, M.; EL-SAYER, M. Comparison of ^{99m}Tc -mercaptoacetyltriglycine and ^{131}I -orthoiodo hippurate in determination of effective renal plasma flow (ERPF). **Nucl. Med. Commun.**, 10: 99-107, 1989.
2. AFSHAN, A.; JEHangIR, M.; ASHRAF, M.; WAQAR, A.; CHIOTELLIS, E. Formulation of a single-component kit for the preparation of technetium-99m labelled ethyl cysteinate dimer: biological and clinical evaluation. **Eur. J. Nucl. Med.**, 21: 991-5, 1994.
3. ALTMAN, P. & DITTMER, D., ed. **Blood and other body fluids**. Washington, D.C., Federation of American Society for Experimental Biology, p. 1-19 (Biological handbooks).
4. ARAÚJO, E.B. **Estudo da biodistribuição e caracterização biológica do ácido p-[(bis-carboximetil)aminometil-carboxiamino]hippúrico (PAHIDA) marcado com tecnécio-99m. Estabelecimento dos parâmetros farmacocinéticos de distribuição por meio de um modelo de compartimentalização**. São Paulo, 1990.(Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).
5. ARIËNS, E.J. QSAR: Conception and misconceptions. **Quant. Struct-Act. Relat.**, 11: 190-4, 1992.

6. BALDAS, J.; BONNYMAN, J.; POJER, P.M.; WILLIAMS, G.A. The influence of reducing agents on the composition of ^{99}Tc -complexes. Implications for $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -radiopharmaceuticals preparation. **Eur. J. Nucl. Med.**, 7: 187-9, 1982.
7. BALLINGER, J.R.; REID, R.H.; GULENCHYN, K.Y. Technetium- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ HM-PAO stereoisomers: Differences in interaction with glutathione. **J. Nucl. Med.**, 29:1998-2000, 1988.
8. BARBOZA, M.R.F; SILVA, C.P.G. Preparação de Glucoheptonato- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ utilizando ascorbato estanoso como agente redutor do íon TcO_4^- . São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, dez. 1983 (**Publicação IPEN 58**).
9. BLONDEAU, P.; BERSE, C.; GRAVEL, D. Dimerization of an intermediate during sodium in liquid ammonia reduction of L-thiazolidine-4-carboxylic acid. **Can. J. Chem.**, 45:49-52, 1967.
10. BLAUFOX, M.D.; CHERVU, L.R.; FREEMAN, L.M. Radiopharmaceuticals for quantitative study of renal function. In: SUBRAMANIAN, G., ed. **Radiopharmaceuticals**. New York, Society of Nuclear Medicine, 1975, p. 385-395.
11. BORGHT, T.V.; PAUWELS, S.; LAMBOTTE, L.; LABAR, D.; DE MAEGHT, S.; STROOBANDT, G.; LATERRE, C. Brain tumor imaging with PET and 2-[Carbon-11]Thymidine. **J. Nucl. Med.**, 35: 974-82, 1994.
12. BORMANS, G.; VAN NEROM, C.; HOOGMARTENS, M.; DE ROO, M.; VERBRUGGEN, A. Metabolism of Tc- $^{99\text{m}}$ ECD in isolated rat organs. **J. Nucl. Med.**, 30 (5): 743, 1989 (Abstract n° 58).

13. BORMANS, G.; VAN NEROM, C.; DE BEUKELAER, C.; HOOGMARTEUS, M.; DE ROO, M.; VERBRUGGEN, A. Comparison of ^{99m}Tc -ECD metabolism in organ homogenates of rat and baboon. **Eur. J. Nucl. Med.**, 15 (8): 423, 1989 (Abstract n° 99).
14. BORMANS, G.; CLEYNHENS, B.; HOOGMARTENS, M.; DE ROO, M.; VERBRUGGEN, A. Synthesis and biological evaluation of L-alanyl derivatives of ^{99m}Tc -MAG3. In: NICOLINI, M, CANDOLI, G.; MAZZI, U. (eds.) **Technetium and Rhenium in chemistry and nuclear medicine**, New York, Cortine International Verona and Raven Press. 1990. V.3, p. 661-6.
15. BORMANS, G.M.; CLEYNHEN, B.J.; DE ROO, M.J.K.; VERBRUGGEN, A.M. Evaluation of the renal excretion characteristics of technetium- 99m mercaptoacetylglycyl-D-alanylglycine in healthy volunteers. **Eur. J. Nucl. Med.**, 19: 271-7, 1992.
16. BOWDEN, K. Eletronic effects in drugs., In: HANSCH, C.; SAMMES, P.G.; TAYLOR, J.B. **Comprehensive medicinal chemistry: the rational design, mechanistic study and therapeutic application of chemical compounds**. Oxford, Pergamon, 1990. V4, p.205-39.
17. BROWNELL, G.L.; BERMAN, M.; ROBERTSON, J.S. Nomenclature for tracer kinetics. **Int. J. Appl. Radiat. Isot.**, 19: 249-62, 1968.
18. BUBECK, B.; BRANDAU, W.; STEINBAECKER, W. Technetium- 99m -labelled renal functioning and imaging agents.II Clinical evaluation of ^{99m}Tc -MAG3 (^{99m}Tc -Mercaptoacetylglycylglycylglycine). **Nucl. Med. Biol.**, 15: 109-118, 1988.

19. BUBECK, B.; BRANDAU, W.; WEBER, E.; KALBLE, T.; PAREKH, N.; GEORGI, P. Pharmacokinetics of Technetium-99m-MAG3 in humans. **J. Nucl. Med.**, 31: 1285-93, 1990.
20. BURNS, H.D.; MANSPEAKER, H.; MILLER, R. **J. Nucl. Med.**, 280, 654, 1979 (Abstract).
21. BURT, R.W.; REDDY, R.V.; MOCK, B.M.; WELLMAN, H.N.; SCHAUWECKER, D.S.; WITT, R. Acetazolamide enhancement of HIPDM brain flow distribution imaging. **J. Nucl. Med.**, 27: 1627-31, 1986.
22. BUSHNELL, D.L.; GUPTA, S.; MLCOCH, A.G.; ROMYN, A.; BARNES, W.E.; KAPLAN, E. Demonstration of focal hyperemia in acute cerebral infarction with iodine-123 Iodoamphetamine. **J. Nucl. Med.**, 28: 1920-3, 1987.
23. CABREJAS, M.L. Utilización de la computadora en estudios dinámicos con radioisótopos en medicina: aplicación del análisis compartimental y no compartimental. **Rev. Biol. Med. Nucl.**, 6: 68-74, 1974.
24. CÁRCAMO, E.C. **Introducción a la farmacocinética**. Washington, D.C., Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, 1982.
25. CENEVIVA, M.P.B. Relações lineares de energia livre e atividade farmacológica. **Química Nova**, 7:141-50, 1984.
26. CERIANI, V.C.; BULDAIN, G.Y.; CERIANI, J.A.; SOLÁ, G.R.; MITTA, A.E.A. Síntesis y control de Tecnecio-99m-Etilendicisteína. Ensayo en seres humanos. **Acta Bioquím. Clín. Latinoam.**, 27 (2): 233-41, 1993.

27. CHAMBERLAIN, J. **Analysis of drugs in biological fluids**. Florida, CRC Press, Boca Raton, 1982, p. 1-49.
28. CHEESMAN, E.H.; BLANCHETTE, M.A.; CALABRESE, J.C.; GANEY, M.V.; MAHEU, L.J.; MORGAN, R.A.; WALOVITCH, R.C.; WATSON, A.D.; WILLIAMS, S.J.; MILLER, S.J. Technetium-99m complexes of ester derivatized diamine-dithiol ligands for imaging brain perfusion. **J. Labell. Comp. Rad.**, 26: 421-3, 1989.
29. CHERVU, L.R.; SUNDORO, B.M.; BLAUFOX, M.D. Technetium- 99m labeled p-amino hippuric acid analog: a new renal agent: concise communications. **J. Nucl. Med.**, 25: 111-5, 1984.
30. CLARKE, M.J. & FACKLER, P.H. The chemistry of technetium: toward improved diagnostic agents. In: **Structure and Bonding**. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, 1982. p. 57-78.
31. COHEN, Y. Transport function of the blood. Pharmacological studies using radioisotopes. **J. Nucl. Biol. Med.**, 12: 26-34, 1968.
32. DAVISON, A.; SOHN, M.; ORVIG, C.; JONES, A.G.; LATOGOLA, M.R. A tetradentate ligand designed specifically to coordinate technetium. **J. Nucl. Med.**, 20: 641, 1979. (Abstract).
33. DESPOPOULOS, A. A definition of substrate specificity in renal transport of organic anions. **J. Theoret. Biol.**, 8: 163-92, 1965.

34. DICHIRO, G.; DE LA PAZ, R.L.; BROOKS, R.A. Glucose utilization of cerebral gliomas measured by 18-F-fluoro-deoxyglucose and positron emission tomography. **Neurology**, 32: 1323-9, 1982.
35. DICHIRO, G. Positron emission tomography using [18F] fluorodeoxyglucose in brain tumors: a powerful diagnostic and prognostic tool. **Invest. Radiol.**, 22: 360-71, 1986.
36. DISCHINO, D.D.; WELCH, M.J.; KILBOURN, M.R.; RAICHLE, M.E. Relationship between lipophilicity and brain extraction of C-11 labeled radiopharmaceuticals. **J. Nucl. Med.**, 24: 1030-8, 1983.
37. DISCHINO, D.D.; WITTMER, S.L.; RAICHLE, M.E. Synthesis and cerebral extraction studies of carbon-11 ethers. **J. Label. Compd. Radiopharm.**, 18: 238-9, 1981.
38. DUBOVSKY, E.V. & RUSSELL, C.D. Quantitation of renal function with glomerular and tubular agents. **Sem. Nucl. Med.**, 12(4): 308-29, 1982.
39. EDWARDS, D.S.; LIU, S.; LYSTER, D.M.; POIRIER, M.J.; VO, C.; WEBB, G.A.; ZHANG, Z.; ORVIG, C. Potential 99mTc radiopharmaceuticals for renal imaging: Tris (N-substituted-3-hydroxy-2-methyl-4-pyridinonato) technetium (IV) cations. **Nucl. Med. Biol.**, 20(7): 857-63, 1993.
40. DU PONT. Clinical trials exemption application Technetium Tc 99m-ECD. (Phase III, Parts I-III), U.K., apr. 1989. (Internal report).
41. EDWARDS, D.S.; CHEESMAN, E.H.; WATSON, M.W.; MAHEU, L.J.; NGUYEN, S.A.; DIMITRE, L.; NASON, T.; WATSON, A.D.; WALOVITCH, R. Synthesis

- and characterization of technetium and rhenium complexes of N,N'-1,2-ethylenediylbis-L-cysteine. Neurolite and its metabolites In: NICOLINI, M.; BANDOLI, G.; MAZZI, U. (eds.) **Technetium and Rhenium in chemistry and nuclear medicine**, New York, Cortine International Verona and Raven Press, 1990. V3, p. 433-44.
42. EFANGE, S.M.N.; KUNG, H.F.; BILLINGS, J.; GUO, Y.Z.; BLAU, M. Technetium-99m bis(aminoethanethiol) complexes with amine sidechains - potential brain perfusion imaging agents for SPECT. **J. Nucl. Med.**, 28:1012-9, 1987.
43. FRITZBERG, A.R.; LYSTER, D.M.; DOLPHIN, D.H. Evaluation of Formamidine Sulfinic Acid and other reducing agents for use in the preparation of Tc-99m labeled radiopharmaceuticals. **J. Nucl. Med.**, 18: 553-557, 1977.
44. FRITZBERG, A.R.; KLENGENSMITH III, W.C.; WHITNEY, W.P.; KUNI, C.C. Chemical and biological studies of Tc-99m N,N'-bis(mercaptoacetamido)-ethylenediamine: a potential replacement for I-131 iodohippurate. **J. Nucl. Med.**, 22: 258-63, 1981.
45. FRITZBERG, A.R. Current status of renal radiopharmaceuticals. **J. Nucl. Med. Technol.**, 12(4): 177-88, 1984.
46. FRITZBERG, A.R.; KASINA, S.; ESHIMA, D.; JOHNSON, D.L. Synthesis and biological evaluation of technetium-99m MAG3 as a hippuran replacement. **J. Nucl. Med.**, 27: 111-6, 1986.
47. FRITZBERG, A.R.; KUNI, C.C.; SLINGENSMITH, W.C.; STEVENS, J.Ç.; WHITNEY, W.P. Synthesis and biological evaluation of Tc-99m N,N'-

- bis(mercaptoacetyl)-2,3 diaminopropanoate a potential replacement for ^{131}I -o-iodohippurate. **J. Nucl. Med.**, 23: 592-8, 1982.
48. HANSCH, C.; LEO, A.; TAFT, R.W. A survey of Hammett substituent constants and resonance and field parameters. **Chem. Rev.**, 91: 165-95, 1991.
49. HILL, T.C.; HOLMAN, B.L.; LOVETT, R.; O'LEARY, D.H.; FRONT, D.;
MAGISTRETTI, P.; ZIMMERMAN, R.E.; MOORE, S.; CLOUSE, M.E.; WU, J.L.;
LIN, T.H.; BALDWIN, R.M. Initial experience with SPECT (Single-photon
Computerized Tomography) of the brain using N-isopropyl I-123 p-
iodoamphetamine: Concise communication. **J. Nucl. Med.**, 23: 191-5, 1982.
50. HOLMAN, B.L.; HELLMAN, R.S.; GOLDSMITH, S.J.; MENA, I.G.; LEVEILLE, J.;
GHERARDI, P.G.; MORETTI, J.L.; BISCHOF-DELALOYE, A.; HILL, T.C.;
RIGO, P.M.; VAN HEERTUM, R.L.; ELL, P.J.; BUELLS, U.; DE ROO, M.C.;
MORGAN, R.A. Biodistribution, Dosimetry, and clinical evaluation of Technetium-
 $^{99\text{m}}$ Ethyl Cysteinate Dimer in normal subjects and in patients with chronic cerebral
infarction. **J. Nucl. Med.**, 30: 1018-24, 1989.
51. HUNG, J.C.; CORTIJA, M.; VOLKERT, W.A.; HOLMES, R.A. Kinetic analysis of
Technetium- $^{99\text{m}}$ d,l.-HM-PAO decomposition in aqueous media. **J. Nucl. Med.**,
29: 1568-76, 1988.
52. HUNG, J.C.; VOLKERT, W.A.; HOLMES, R.A. Stabilization of Technetium- $^{99\text{m}}$ -
D,L-Hexamethylpropyleneamine Oxime ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -D,L-HMPAO) using gentisic acid.
Nucl. Med. Biol., 16 (7): 675-80, 1989.

53. JAFRI, R.A.; BRITTON, K.E.; NIMMON, C.C. Technetium-99m MAG3, a comparison with I-123 and I-131 orthoiodohippurate in patients with renal disorders. **J. Nucl. Med.**, 29: 147-58, 1988.
54. JONES, C.J. Applications in Nuclear Fuel Cycle and Radiopharmacy. In: WILKINSON, G. **Comprehensive Coordination Chemistry**, Pergamon Press, 1989, V.6, p.881-1009.
55. JONES, A.G.; DAVISON, A. The chemistry of Technetium I,II,III and IV. **Int. J. Appl. Radiat. Isot.**, 33: 867-74, 1982.
56. JUCHAU, M.R. Species differences in drug metabolism. In: HANSCH, C.; SAMMES, P.G.; TAYLOR, J.B. **Comprehensive medicinal chemistry: The rational design, mechanistic study & therapeutic application of chemical compounds**. Oxford, Pergamon Press, 1990. V4 p.219-35.
57. KLINGENSMITH III, W.C.; GERHOLD, J.P.; FRITZBERG, A.R.; SPITZER, U.M.; KUNI, C.C.; SINGER, C.J.; WELL III, R. Clinical comparison of Tc-99m N,N'-bis(mercaptoacetamida)ethylenediamine and (131I) ortho-iodo hippurate for evaluation of renal tubular function: concise communication. **J. Nucl. Med.**, 23: 377-80, 1982.
58. KUBINYI, H. Lipophilicity and drug activity. **Prog. Drug Res.**, Basel 1979, V.23 p.97-198.
59. KUBINYI, H. Hansh Analysis and Related Approaches. In: MANNHOLD, R.; KROGSGAARD-LARENSEN, P.L. TIMMERMAN, H. eds. **Methods and Principles in Medicinal Chemistry**. New York, VCH Publishers, 1993. v1.

60. KUHL, D.E.; BARRIO, J.R.; HUANG, S.C.; SELIN, C.; ACKERMANN, R.F.; LEAR, J.L.; WU, J.L.; LIN, T.H.; PHELPS, M.E. Quantifying local cerebral blood flow by N-isopropyl-p-[123I]Iodoamphetamine (IMP) Tomography. **J. Nucl. Med.**, 23: 196-203, 1982.
61. KUNG, H.F. & BLAU, M. Regional intracellular pH shift: a proposed new mechanism for radiopharmaceutical uptake in brain and other tissues. **J. Nucl. Med.**, 21: 147-52, 1980.
62. KUNG, H.F.; MOLNAR, M.; BILLINGS, J.; WICKS, R.; BLAU, M. Synthesis and biodistribution of neutral lipid-soluble Tc-99m complexes that cross the blood-brain barrier. **J. Nucl. Med.**, 25: 326-32, 1984.
63. KUNG, H.F.; TAMPOSCH, K.M.; BLAU, M. A new brain perfusion imaging agent: [I-123]HIPDM: N,N,N'-Trimethyl-N'-[2-hydroxy-3-methyl-5-iodobenzyl]-1,3-propanediamine. **J. Nucl. Med.**, 24: 66-72, 1983.
64. LANDON, E.J. & FORTE, L.R. Cellular mechanism in renal pharmacology. **Ann. Rev. Pharmacol.**, 11: 171-85, 1971.
65. LEO, A.J. Hydrophobic parameter: measurement and calculation. **Methods Enzymol.**, 202: 544-91, 1991.
66. LEONARD, J.P.; NOWOTNIK, D.P.; NEIRINCKX, R.D. Technetium-99m-d,l-HM-PAO: a new radiopharmaceutical for imaging regional brain perfusion using SPECT - a comparison with iodine-123 HIPDM. **J. Nucl. Med.**, 27: 1819-23, 1986.

67. LÉVEILLÉ, J.; DEMONCEAU, G.; DE ROO, M.; RIGO, P.; TAILLEFER, R.; MORGAN, R.A.; KUPRANICK, D.; WALOVITCH, R.C. Characterization of Technetium-99m-L,L-ECD for brain perfusion imaging, Part 2: Biodistribution and brain imaging in humans. **J. Nucl. Med.**, 30: 1902-10, 1989.
68. LEVER, S.Z.; BURNS, H.D.; KERVITSKY, T.M.; GOLDFARB, H.W.; WOO, D.V.; WONG, D.F.; EPPS, L.A.; KRAMER, A.V.; WAGNER, H.N. Design, preparation, and biodistribution of a Technetium-99m triaminedithiol complex to assess regional cerebral blood flow. **J. Nucl. Med.**, 26: 1287-94, 1985.
69. LIEN, E.J. **SAR-Side effects and drug design**. New York, Marcel Dekker, 1986 (Medicinal Research Series V11).
70. LINGENSMITH III, W.C.; TYLER, H.N.; MARSH, W.C.; HANNA, G.M.; FRITZBERG, A.R.; HOLT, S.T. Effect of hidration and dehydration on technetium-99m CO₂ DADS. Renal studies in normal volunteers. **J. Nucl. Med.**, 26: 875-9, 1985.
71. LOBERG, M.D. Radiotracers for cerebral functional imaging - a new class. **J. Nucl. Med.**, 21(2): 183-5, 1980.
72. LOBERG, M.D.; CORDER, E.H.; FIELDS, A.T.; CALLERY, P.S. Membrane transport of Tc-99m labeled radiopharmaceuticals.I.Brain uptake by passive transport. **J. Nucl. Med.**, 20: 1181-8, 1979.
73. LUCIGNANI, G.; ROSSETTI, C.; FERRARIO, P.; ZUCA, L.; GILARDI, M.C.; ZITO, R.; PERANI, D.; LENZI, G.L.; FAZIO, F. In vivo metabolism and kinetics of 99mTc-HMPAO. **Eur. J. Nucl. Med.**, 16: 249-55, 1990.

74. MARTIN, Y.C. **Quantitative drug design: a critical introduction**. New York, Marcel Dekker, 1978 (Medicinal Research Series, V8).
75. MANSUR, S.; JEHANGIR, M.; STATHAKI, S.; PAPADOPOULOS, M.; MASTROSTAMATIS, S.; CHIOTELLIS, E. Renal elimination of some ^{99m}Tc -labelled cysteamine derivatives. **Nucl. Med. Biol.**, 20 (7): 819-23, 1993.
76. MAZZI, U.; NICOLINI, M.; BANDOLI, G.; REFOSCO, F.; TISATO, F.; MORESCO, A.; DUATTI, A. Technetium coordination chemistry: development of new back bones for ^{99m}Tc radiopharmaceuticals. In: NICOLI, M.; BANDOLI, G.; MAZZI, U. (eds.) **Technetium and Rhenium in chemistry and nuclear medicine**. New York, Cortine International Verona and Raven Press, 1990. V3, p.39-50.
77. MESQUITA, C.H. **Modelo para determinação da absorção de substâncias radioativas - Aplicação em radiodosimetria e nutrição**. São Paulo, IPEN/CNEN-USP, 1991. (Tese de Doutorado).
78. MOLINSKI, V.J. A review of ^{99m}Tc generator technology. **Int. J. Appl. Radiat. Isot.**, 33: 811-9, 1982.
79. MURPHY, C.A. **El tecnecio em la Medicina Nuclear**, Sociedade Mexicana de Medicina Nuclear, México, p.311-313, 1985.
80. NAKAMURA, K.; TUKATANI, Y.; KUBO, A.; HASHIMOTO, S.; TERAYAMA, Y.; AMANO, T.; GOTO, F. The behavior of ^{99m}Tc -hexamethylpropyleneamineoxime (^{99m}Tc -HMPAO) in blood and brain. **Eur. J. Nucl. Med.**, 15: 100-7, 1989.

81. MURPHY, C.A. **Manual de Radiofarmacocinetica**. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, Departamento de Medicina Nuclear, México, 1992.
82. NEIRINCKX, R.D.; CANNING, L.R.; PIPER, I.M.; NOWOTNIK, D.P.; PICKET, R.D.; HOLMES, R.A.; VOLKERT, W.A.; FORSTER, A.M.; WEISNER, P.S.; MARIOTT, J.A.; CHAPLIN, S.B. Technetium-99m d,l-HM-PAO: a new radiopharmaceutical for SPECT imaging of regional cerebral blood perfusion. **J. Nucl. Med.**, 28: 191-202, 1987.
83. NEIRINCKX, R.D.; HARRISON, R.C.; FOSTER, A.M.; BURKE, J.F.; ANDERSEN, A.R.; LASSEN, N.A. A model for the in vivo behaviour of Tc-99m d,l-HMPAO in man. **J. Nucl. Med.**, 28: 559, 1987 (Abstract nº 10).
84. NOGRADY, T. **Medicinal Chemistry. A biochemical approach**, Oxford, Oxford University Press, 1989 p.3-57.
85. NUNN, A.D. A chromatographic method for the measurement of the lipophilicity of lipophilic technetium complexes. **J. Labell. Compd. Radiopharm.**, 26: 274-6, 1989.
86. OLDENDORF, W.H. Need for new radiopharmaceuticals. **J. Nucl. Med.**, 19(10): 1182, 1978.
87. ÖZKER, K.; ÖNSEL, C.; KABASAKAL, L.; SAYMAN, H.B.; USLU, I.; BOZLUOLÇAY, S.; CANSIZ, T.; KAPICIOGLU, T.; URGANCIOGLU, I. Technetium-99m-N,N-Ethylenedicysteine - A comparative study of renal scintigraphy with Technetium-99m-MAG₃ and Iodine-131-OIH in patients with obstructive renal disease. **J. Nucl. Med.**, 35: 840-5, 1994.

88. PAUWELS, E.K.J.; ASKIENAZY, S.; VAN KROONENBURGH, M.J.P.G.; BOK, R.
Radiopharmaceuticals for brain perfusion imaging In: NICOLINI, M.; BANDOLI,
G.; MAZZI, U. (eds.) **Technetium and Rhenium in Chemistry and Nuclear
Medicine**. New York, Cortine International Verona and Raven Press, 1990, V.3, p.
687-98.
89. RAICHLE, M.E.; EICHLING, J.O.; STRAATMANN, M.G. Blood-brain barrier
permeability of ¹¹C-labeled alcohols and ¹⁵O-labeled water. **Am. J. Physiol.**, 230:
543-52, 1976.
90. RENNICK, B.R. Renal excretion of drugs: tubular transport and metabolism. **Ann.
Rev. Pharmacol.**, 12: 141-55, 1972.
91. ROBERTSON, J.S. Basic Principles. In: ROBERT, J.S. **Compartmental
distribution of radiotracers**. Boca Raton, CRC Press, 1983. p. 11-28.
92. SANYAL, S. & BANERJEE, S. Cysteine, a chelating moiety for synthesis of
Technetium-99m Radiopharmaceuticals: II. Attempt to synthesize renal tubular
radiopharmaceuticals. **Nucl. Med. Biol.**, 17 (8): 757-62, 1990.
93. SCHAAP, G.H.; ALFERINK, T.H.R.; DE JONG, R.B.J. Tc-99m-
Mercaptoacetyltriglycine in patients with renal diseases. **Eur. J. Nucl. Med.**, 14: 28-
31, 1988.
94. SCHNEIDER, R.F. **The preparation of N,N'-bis-L-dihydrochloride - "ECD"**.
Syracuse, N.Y., Sunny Health Science Center at Syracuse (unpublished paper).
95. SCHWOCHAN, K. & PLEGER, U. Basic coordination chemistry of Technetium.
Radiochim. Acta, 63: 103-10, 1993.

96. SEYDEL, J.K. Structure-pharmacokinetics relationships in drug design. In: BUISMAN, J.A.K. (ed) **Strategy in Drug Research**, Elsevier Scientific Publishing Company, 1982. V.4, p. 179-99.
97. SEYDEL, J.K.; VELASCO, M.A.; COATS, E.A.; CORDES, H.P.; KUNG, B.C; WIESE, M. The importance of drug-membrane interaction in drug research and development. **Quant. Struct.-Act. Relat.**, 11: 205-10, 1992.
98. SHARP, P.; GEMMELL, H.; CHERRYMAN, G.; BERSON, J.; CRAWFORD, J.; SMITH, F. Application of Iodine-123-labeled Isopropylamphetamine imaging to the study of Dementia. **J. Nucl. Med.**, 27: 761-8, 1986.
99. SHARP, P.F.; SMITH, F.W.; GEMMELL, H.G. LYALL, D.; EVANS, N.T.S.; GVOZDANOVIC, D.; DAVIDSON, J.; TYRRELL, D.A.; PICKETT, R.D.; NEIRINCKX, R.D. Technetium-99m-HM-PAO stereoisomers as potential agents for imaging regional cerebral blood flow: Human volunteer studies. **J. Nucl. Med.**, 27: 171-7, 1986.
100. SILIPO, C. & VITTORIA, A. Three-dimensional structure of drugs. In: HANSCH, C.; SAMMES, P.G.; TAYLOR, J.B. **Comprehensive medicinal chemistry: The rational design, mechanistic study & therapeutic application of chemical compounds**. Oxford. Pergamon Press, 1990, V.4 p. 153-204.
101. SUMMERVILE, D.A.; PACKARD, A.B.; BARTYNSKI, B.; LIM, K.S.; CHERVU, L.R.; TREVES, S.T. Evaluation of the renal clearance of technetium-99m PAHIDA in dogs. **J. Nucl. Med.**, 28: 907-9, 1987.

102. TAKIKAWA, S.; DHAWAN, V.; CHALY, T.; ROBESON, W.; DAHL, R.; ZANZI, I.; MANDEL, F.; SPETSIERIS, P.; EIDELBERG, D. Input functions for 6-[Fluorine-18]Fluorodopa quantitation in Parkinsonism: Comparative studies and clinical correlations. **J. Nucl. Med.**, 35: 955-63, 1994.
103. TAUXE, W.N. Nefro Urologia. In: ROCHA, A.F.G. & HARBERT, J.C. **Medicina Nuclear - Aplicações Clínicas**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1979. p. 278-99.
104. TAVARES, L.C. **Relações quantitativas entre a estrutura química e a atividade antimicrobiana de análogos de nifuroxazida**. São Paulo, 1993. (Tese de doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo).
105. TAYLOR, A.; ESHIMA, D.; CHRISTIAN, P.E. Evaluation of Tc- 99m-Mercaptoacetyltriglycine in patients with impaired renal fuction. **Radiology**, 162: 365-70, 1987.
106. TAYLOR, A.; ESHIMA, D.; FRITZBERG, A.R.; CHRISTIAN, P.E.; KASINA, S. Comparative of Iodine-131 OIH and Technetium-99m MAG₃ renal imaging in volunteers. **J. Nucl. Med.**, 27: 795-803, 1986.
107. TAYLOR, J.B. & KINNEWELL, P.D. **Introductory Medicinal Chemistry**, Ellis Horwood Limited, 1981, p. 47-183.
108. TAYLOR, P.J. Hydrophobic properties of drugs. In: HANSCH,C.; SAMMES, P.G.; TAYLOR, J.B. **Comprehensive medicinal chemistry. A biochemical approach**. Oxford, Oxford University Press, 1990, p. 241-294.

109. TAYLOR, S.F.; FREY, K.A.; BALDWIN, R.M.; PAPADOPOULOS, S.M.; PETRY, N.A.; ROGERS, W.L.; McBRIDE, B.J.; KERR, J.M.; KUHL, D.E. Technetium-99m-N1-(2-Mercapto-2-methylpropyl)1,2-Benzenediamine (T691): Preclinical studies of a potential new tracer of regional cerebral perfusion. **J. Nucl. Med.**, 33: 1836-42, 1992.
110. TOZER, T.N. Pharmacokinetics aspects of drug administration and metabolism In: HANSCH, C.; SAMMES, P.G.; TAYLOR, J.B. **Comprehensive Medicinal Chemistry: the rational design, mechanistic study & therapeutic application of chemical compounds**, Oxford, Pergamon Press, 1990. V5, p. 45-69.
111. TSUCHIDA, T.; NISHIZAWA, S.; YONEKURA, Y.; SADATO, N.; IWASAKI, Y.; FUKITA, T.; MATOBA, N.; MAGATA, Y.; TAMAKI, N.; KONISHI, J. SPECT images of Technetium-99m-Ethyl-cysteinate dimer in cerebrovascular diseases: comparison with other cerebral perfusion tracers and PET. **J. Nucl. Med.**, 35: 27-31, 1994.
112. TUTE, M.S. History and objectives of quantitative drug design, In: HANSCH, C.; SAMMES, G.P.; TAYLOR, J.B. **Comprehensive medical chemistry: the rational design, mechanistic study and therapeutic application of chemical compounds**. Oxford, Pergamon Press, 1990. V4. p. 1-31.
113. VALLABHAJOSULA, S.; ZIMMERMAN, R.E.; PICARD, M.; STRITZKE, P.; MENA, I.; HELLMAN, A.R.S.; TIKOFSKY, R.S.; STABIN, M.G.; MORGAN, R.A.; GOLDSMITH, S.J. Technetium-99m ECD: a new brain imaging agent. In vivo kinetics and biodistribution studies in normal human subjects. **J. Nucl. Med.**, 30: 599 - 604, 1989.

114. VAN NERON, C.; BORMANS, G.; CROMBY, D.; DE ROO, M.; VERBRUGGEN, A. Radiochemical analysis of ^{99m}Tc -ECD by TLC and HPLC In: NICOLINI, M.; BANDOLI, G.; MAZZI, U. (eds.). **Technetium and Rhenium in chemistry and nuclear medicine**. New York, Cortine International Verona and Raven Press, 1990, V.3, p.525-9.
115. VAN NERON, C.; BORMANS, G.; BAUWENS, J.; VANDECRUYS, A.; DE ROO, M.; VERBRUGGEN, A. Comparative evaluation of ^{99m}Tc -Ethylenedicysteine and ^{99m}Tc -MAG3 in volunteers. In: **Nuclear Medicine in Europe**, Medicine Congress, Amsterdam, 1990, p.290-2, Stuttgart, 1991.
116. VAN NERON, C.; OSIADACZ, D.; CLEYNHENS, B.; NOSCO, D.; DE ROO, M.; VERBRUGGEN, A.M. Optimization of the labelling of Ethylenedicysteina (EC) with Technetium-99m. **J. Labell. Comp. and Radiopharm.**, 30: 37-9, 1991.
117. VERBRUGGEN, A.; BORMANS, G.; CLEYNHEUS, B.; HOOGMARTERS, M.; VANDECRUYS, A.; DE ROO, M. Separation of the enantiomers of ^{99m}Tc -MAG3 and their renal excretion in a baboon. **Eur. J. Nucl. Med.**, 14: 256, 1989.
118. VERBRUGGEN, A.M.; BORMANS, G.; VAN NERON, C.; CLEYNHENS, B.; CROMBEZ, D.; DE ROO, M. Isolation of the mono-ester mono-acid derivatives of ^{99m}Tc -ECD and their biodistribution in mice In: NICOLINI.; BANDOLI, G.; MAZZI, U. (eds.) **Technetium and Rhenium in chemistry and nuclear medicine**. New York, Cortine International Verona and Raven Press, 1990. V.3, p. 445-2.

119. VERBRUGGEN, A.; NOSCO, D.; VAN NEROM, C.; BORMANS, G.; ADRIAENS, P.; DE ROO, M. Evaluation of Tc-99m L,L-Ethylenedicysteine as a potential alternative to Tc-99m MAG3. In: **Nuclear Medicine in Europe**, Medicine Congress, Amsterdam, 1990, p. 124-126, Stuttgart, 1991.
120. VERBRUGGEN, A.M.; NOSCO, D.L.; VAN NERON, C.G.; BORMAN, G.M.; ADRIAENS, P.J.; DE ROO, M.J. Technetium-99m-L,L-Ethylenedicysteine: a new renal imaging agent. I. Labelling and evaluation in animals. **J. Nucl. Med.**, 33: 551-7, 1992.
121. VERBRUGGEN, A.; MORTELMANS, L.; DE BACKKER, C.; VAN NEROM, C.; DE ROO, M. Evaluation of 99mTc-ECD as a blood cell labeling agent. **J. Labell. Comp. and Radiopharm.**, 26: 415-7, 1989.
122. VOLKERT, W.A. Stereoactivity of 99mTc-chelates at chemical and physiological levels. In: NICOLINI; BANDOLLI, G.; MAZZI, U. (eds.) **Technetium and Rhenium in chemistry and nuclear medicine**. New York, Cortine International Verona and Raven Press, 1990. V.3, p. 525-9.
123. VOLKERT, W.A.; HOFFMAN, T.J.; SEGER, R.M.; TROUTNER, D.E.; HOLMES, R.A. 99mTc-propylene amine oxime (99mTc-PnAo): a potential brain radiopharmaceutical. **Eur. J. Nucl. Med.**, 9:511-6, 1984.
124. VOLKERT, W.A.; HOFFMAN, T.J.; ROTH, C.; CORLIJA, M.; HOLMES, R.A. The design and properties of 99mTc chelates for brain perfusion imaging. **Radiochim. Acta** 63: 205-8, 1993.

125. WALOVITCH, R.C.; HALL, K.M.; O'TOOLE, J.J.; WILLIAMS, S.J. Metabolism of Tc-99m-ECD in normal volunteers. **J. Nucl. Med.**, 29(5): 747, 1988 (Abstract n° 27).
126. WALOVITCH, R.C.; HALL, K.M.; O'TOOLE, J.J.; WILLIAMS, S.J.; PICARD, M.; FRANCESCHI, M.; ZIMMERMAN, R.E.; HOLMAN, B.L. Tc99m ECD metabolism in normal volunteer. **Eur. J. Nucl. Med.**, 14(5/6), 1988 (Abstract n° 174).
127. WALOVITCH, R.C.; HILL, T.C.; GARRITY, S.T.; CHEESMAN, E.H.; BURGESS, B.A.; O'LEARY, D.H.; WATSON, A.D.; GANEY, M.V.; MORGAN, R.A.; WILLIAMS, S.J. Characterization of Technetium-99m-L,L-ECD for brain perfusion imaging, Part 1: Pharmacology of Technetium-99m ECD in nonhuman primates. **J. Nucl. Med.**, 30: 1892-1901, 1989.
128. WALOVITCH, R.C.; MAKUCH, J.; KNAPIK, G.; WATSON, A.D.; WILLIAMS, S.J. Brain retention of Tc99m-ECD is related to in vivo metabolism. **J. Nucl. Med.**, 29(5): 747, 1988 (Abstract n° 26).
129. WINCHELL, H.S.; BALDWIN, R.M.; LIN, T.H. Development of I-123-labeled amines for brain studies: localization of I-123 Iodophenylalkyl amines in rat brain. **J. Nucl. Med.**, 21: 940-6, 1980.
130. WINCHELL, H.S.; HORST, W.D.; BRAUN, L.; OLDENDORF, W.H.; HATTNER, R.; PARKER, H. N-Isopropyl-[123I]p-iodoamphetamine: single-pass brain uptake and washout; binding to brain synaptosomes; and localization in dog and monkey brain. **J. Nucl. Med.**, 21: 940-6, 1980.

131. ZMBOVA, B.; DJOKIC, D.; BOGDANOVA, V.; TADZER, I.; AJDINOVIC, B.; RASTOVA, C.M. Synthesis of p-aminohippuric acid analog and its labelling by Technetium-99m. **Int. J. Radiat. Appl. Instrum., Part A: Appl. Radiat. Isot.**, 40(3): 225-34, 1989.