

CNEN/SP**ipen** Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares

SÍNTESE DE DERIVADOS DO ÁCIDO IMINODIACÉTICO
ÁCIDO 2,6-DIISOPROPIL FENILCARBOMOILMETIL IMINODIACÉTICO
(DISIDA)
ÁCIDO 4-p-n-BUTILFENILCARBOILMETIL IMINODIACÉTICO (BUTIL-
-IDA)
PREPARAÇÃO DE CONJUNTOS DE REATIVOS LIOFILIZADOS PARA
MARCAÇÃO COM ^{99m}Tc E UTILIZAÇÃO EM DIAGNÓSTICO HEPATO-
-BILIAR

Elena Setuko Hamada, Marycel Figols de Barboza, Maria Aparecida Theodora
Marcilio de Almeida, Maria Thereza Colturato, Emiko Muramoto e
Constância Pagano Gonçalves da Silva

PUBLICAÇÃO IPEN 123

AGOSTO/1987

SÃO PAULO

**SÍNTESE DE DERIVADOS DO ÁCIDO IMINODIACÉTICO:
ÁCIDO 2,6-DIISOPROPIL FENILCARBAMOILMETIL IMINODIACÉTICO (DISIDA)
ÁCIDO 4-p-n-BUTILFENILCARBAMOILMETIL IMINODIACÉTICO (BUTIL-IDA)
PREPARAÇÃO DE CONJUNTOS DE REATIVOS LIOFILIZADOS PARA MARCAÇÃO
COM ^{99m}Tc E UTILIZAÇÃO EM DIAGNÓSTICO HEPATOBILIAR**

Elena Setuko Hamada, Marycel Figols de Barbosa, Maria Aparecida Theodora Marcilio de Almeida,
Maria Tereza Colturato, Emiko Muramoto e Constância Pagano Gonçalves da Silva

DEPARTAMENTO DE PROCESSAMENTO

**CNEN/SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
SÃO PAULO**

Série PUBLICAÇÃO IPEN

INIS Categories and Descriptors

B13

IMINES
LYOPHILIZATION
SYNTHESIS
LABELLING
QUALITY CONTROL

SÍNTESE DE DERIVADOS DO ÁCIDO IMINODIACÉTICO
ÁCIDO 2,6-DIISOPROPIL FENILCARBAMOILMETIL IMINODIACÉTICO (DISIDA)
ÁCIDO 4-p-n-BUTILFENILCARBAMOILMETIL IMINODIACÉTICO (BUTIL-IDA)
PREPARAÇÃO DE CONJUNTOS DE REATIVOS LIOFILIZADOS PARA MARCAÇÃO
COM ^{99m}Tc E UTILIZAÇÃO EM DIAGNÓSTICO HEPATOBILIAR

Elena Setuko Hamada, Marycel Figols de Barbosa, Maria Aparecida Theodora Marcilio de Almeida,
Maria Tereza Colturato, Emiko Muramoto e Constância Pagano Gonçalves da Silva

RESUMO

Neste trabalho descreve-se a preparação química dos ácidos: 2,6-diisopropil IDA (DISIDA) e 4-p-n-butyl-IDA (BUTIL-IDA) e posteriormente a preparação de conjuntos de reativos liofilizados para marcação com ^{99m}Tc .

Foram determinadas as propriedades químicas, espectroscópicas e radiofarmacêuticas dos produtos para serem utilizados em Medicina Nuclear na obtenção de imagens hepato-biliares.

SYNTHESIS OF 2,6 - DIISOPROPYL-PHENYLCARBAMOYLMETHYL-IMINODIACETIC
ACID (DISIDA) AND 4-n-BUTYL-PHENYLCARBAMOYLMETHYL-IMONODIACETIC
ACID (BUTIL-IDA). PREPARATION OF LYOPHILIZED KIT TO BE USED AS
 ^{99m}Tc AGENT IN HEPATOBILIARY SYSTEM.

ABSTRACT

This paper describes the synthesis of 2,6 diisopropyl IDA (DISIDA) and 4-n-butyl IDA (BUTIL-IDA).

Their spectroscopic properties, radiopharmaceutical preparation and their use as ^{99m}Tc complex agent in hepatobiliary studies, are also reported.

INTRODUÇÃO

O radiodiagnóstico do sistema hepato-biliar tem sido objeto de múltiplas investigações, desde há algumas décadas. Neste contexto tem se procurado a utilização de radiofármacos que permitam estudos dinâmicos do fígado, apresentando uma alta concentração na bile e baixa excreção urinária. Os trabalhos

pioneiros de Harvey e Col.⁽⁴⁾ seguidos por Chiotellis e Col.⁽¹⁾, permitiram a introdução de novos produtos radiofarmacêuticos conseguindo substituir com vantagens a Rosa Bengala ¹³¹I e Bromossulfaleína ¹³¹I em estudos de dinâmica hepato-biliar, em colecistite aguda e outras afecções biliares. Foram produzidos dessa forma os ácidos: 2,6 diisopropil-fenilcarbamoilmetil-iminodiacético (DISIDA) e o 4-p-n-butil-fenilcarbamoilmetil-iminodiacético (BUTIL-IDA).

O ^{99m}Tc substitui com vantagens o ¹³¹I em marcação de moléculas pois apresenta meia vida curta (T/2 = 6h), ausência de emissão Beta e energia Gama de 140 KeV, características que propiciam seu uso em Medicina Nuclear.

De acordo com os trabalhos de Wiston e Col.⁽⁸⁾, Green e Col.⁽²⁾, Weissman e Col.⁽⁶⁾, o DISIDA apresenta condições altamente desejáveis para radiodiagnóstico em colecintilografia e de acordo com Chiotellis e Col.⁽¹⁾ o emprego do BUTIL-IDA é vantajoso para a visualização do parênquima hepático, principalmente em pacientes com icterícia severa, pois, o produto apresenta menor excreção urinária em relação a outros produtos similares.

MATERIAIS E MÉTODOS:

Síntese dos Ácidos:

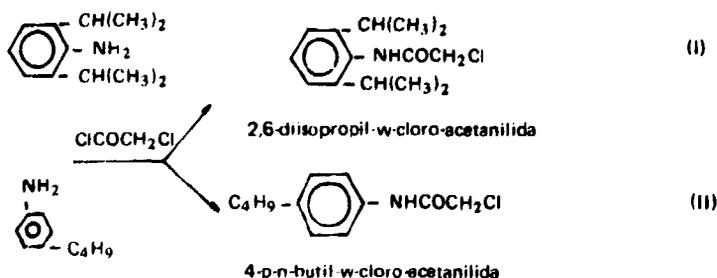
2,6 - Diisopropil-fenilcarbamoilmetil-iminodiacético (DISIDA).

4-p-n-Butil-fenilcarbamoilmetil-iminodiacético (BUTIL-IDA).

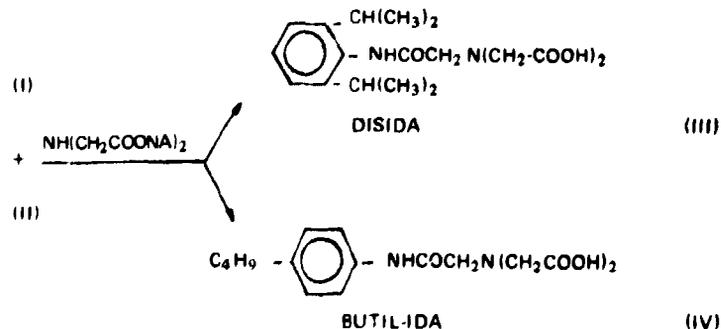
Ambos derivados foram preparados seguindo-se a técnica descrita por Chiotellis e col. modificada por Mitta e col.^{(1) (5)}. Baseia-se na reação de acetilação do 2,6-Diisopropilanilina e 4-p-n-Butilanilina com cloreto de cloroacetila dando dois derivados: o 2,6-Diisopropil-w-cloro-acetanilida e 4-p-n-Butil-w-cloro-acetanilida. Os dois derivados recristalizados em etanol 75% apresentam pontos de fusão: 147° C a 148° C e 141° C a 144° C respectivamente. Os rendimentos situam-se em torno de 75%. Ambos derivados acetilados reagem com quantidades equimoleculares de ácido iminodiacético em etanol a 65% sendo que os produtos finais (III) e (IV) são precipitados em meio ácido (HCl) e recristalizados em etanol/água 5: 1.

Esquema de Reações:

1ª fase:



2ª fase:



CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

Os produtos finais DISIDA e BUTIL-IDA foram caracterizados, adotando-se os seguintes critérios:

1. Determinação dos pontos de fusão. Foi utilizado um aparelho automático METTLER FP5 obtendo-se os seguintes valores:

DISIDA: 197° C a 198° C

BUTIL-IDA: 196° C.

2. Rendimentos obtidos após purificação:

DISIDA: 70%

BUTIL-IDA: 75 %

3. Análises elementares de C, H, e N. Realizadas em aparelho Perkin-Elmer, modelo 240. (Tabela 1).

4. Espectros de absorção em Infravermelho, utilizando-se um espectrofotômetro Perkin-Elmer modelo 710A (Tabela 2).

5. Espectros de Ressonância Nuclear Magnética protônica utilizando-se um aparelho VARIAN modelo T-60 com fonte de radiofrequência de 60 MHz (Tabela 3).

Tabela 1

Análises Elementares de DISIDA e BUTIL-IDA

Produto	% Calculada			% Encontrada		
	C	H	N	C	H	N
DISIDA $C_{18}H_{26}N_2O_5$ p.m. 350	61,70	7,43	8,00	61,84	7,68	7,70
BUTIL-IDA $C_{16}H_{17}N_2O_5$ p.m. 317	60,56	5,36	8,83	60,15	5,92	8,61

Tabela 2

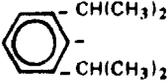
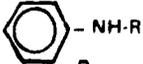
Espectros de Absorção em Infravermelho⁽⁵⁾⁽⁷⁾⁽³⁾

Produto	Bandas Características (cm ⁻¹)	Grupamento
DISIDA	3300 (m) 3150 (fr) 2400 a 2700 1580 1450 (fr) 810 e 750 (fr)	NH imino CONH OH em COOH COO ⁻ CH ₂ N anel benzênico tri-substituído
BUTIL-IDA	3300 (m) 3150 (fr) 2950 2875 2400 1520 1220 830	NH imino CONH CH ₂ CH ₃ COOH anel benz. mono-substituído CO anel benz. disubstituído

Nota: f - forte; m - média; fr - fraca.

Tabela 3

Espectros de Ressonância Nuclear Magnética Protônica. Solventes: CF₃/CDCl₃ - DISIDADimetil sulfóxido - BUTIL-IDA⁽⁵⁾⁽⁷⁾.

DISIDA		BUTIL-IDA	
δ (ppm)	Grupamento	δ (ppm)	Grupamento
1,12 (d)		0,90 (t)	CH ₃
2,85 (m)	idem	1,45 (m)	C ₄ H ₉
4,50 (s)		2,60 (t)	idem
7,25		3,50 (s)	COCH ₂ N
8,95 (s)	COOH	7,60 (d)	anel benzênico
		7,20 (d)	idem
		10,40 (s)	COOH

Nota: s - singuleto; d - duplete; m - multiplete.

PREPARAÇÃO DE CONJUNTOS DE REATIVOS LIOFILIZADOS PARA MARCAÇÃO COM ^{99m}Tc

Para um lote de 40 frascos destinados à marcação com ^{99m}Tc foram pesados 800mg de DISIDA ou BUTIL-IDA respectivamente. Cada um dos produtos foram dissolvidos em 20 ml de água bidestilada contendo 18 ml de NaOH 0,25N. As soluções foram nitrogenadas durante 15 minutos constituindo-se na solução A; paralelamente foi preparada uma solução aquosa contendo 20 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 4 ml de HCl 0,25N tendo sido nitrogenada durante 5 minutos (solução B). As soluções A e B foram reunidas, o pH acertado para valor 5,5 e imediatamente a solução final foi fracionada em alíquotas de 1 ml em frascos tipo penicilina e levados para congelamento durante 6 horas em temperatura de -34°C . A liofilização foi realizada em aparelho "EDWARDS" do Brasil por um período de 18 horas. Os frascos foram fechados a vácuo, lacrados e rotulados.

CONTROLE RADIOQUÍMICO:

Após a liofilização, uma amostra de cada produto foi submetida ao controle radioquímico para avaliação do rendimento de marcação com ^{99m}Tc .

Os controles radioquímicos foram realizados por cromatografia em papel Whatman nº 3 sistema ascendente em fitas de 8 x 1cm. Os solventes utilizados foram: metanol 85% e cloreto de sódio 30%, que separam adequadamente o ^{99m}Tc hidrolizado ou em coloide e o ^{99m}Tc sob forma de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ não complexado⁽³⁾. Utilizou-se a solução de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em volume não superior a 5ml eluido esterilmente de um gerador de ^{99m}Tc , produzido no IPEN-CNEN/SP. Após a solubilização dos produtos, as cromatografias foram desenvolvidas em intervalos de tempo de 15, 30, 60, 120 e 180 minutos a partir da adição da solução de $^{99m}\text{TcO}_4^-$.

Os controles foram realizados variando-se o volume de solução de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ adicionando (de 1 a 5ml), Tabelas I e IV. Estudou-se a estabilidade dos produtos liofilizados (Tabelas III e IV), bem como os rendimentos de marcação em diferentes atividades de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (Tabelas II e V).

Tabela I

Controle Radioquímico de DISIDA ^{99m}Tc .

Varição dos Volumes de Solução de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ Adicionadas.

Tempo (min.) Vol. $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (mCi)	15'	30'	60'	120'	180'
	Rendimentos de Marcação (%)				
1	98,20	98,40	98,30	97,80	97,60
2	95,40	95,00	97,40	98,00	97,50
3	96,80	96,40	95,70	97,00	96,30
5	97,70	96,20	94,90	93,80	93,70

Tabela II

Controle Radioquímico de DISIDA ^{99m}Tc .Variação das Atividades de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ Adicionadas.

Atividade $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (mCi)	Tempo (min.)	15'	30'	60'	120'	180'
	Rendimentos de Marcação (%)					
1		98,20	98,40	98,30	97,80	97,60
35		94,60	96,20	96,30	91,40	90,20
55		94,90	95,10	95,10	92,10	91,00

Tabela III

Controle Radioquímico de DISIDA ^{99m}Tc .

Estabilidade do Produto Armazenado a 5° C.

Tempo Armazenamento (meses)	Tempo (min.)	15'	30'	60'	120'	180'
	Rendimentos de Marcação (%)					
1		94,60	96,50	96,20	95,80	95,50
2		97,00	96,40	96,30	96,50	95,10
3		97,40	96,70	95,20	94,30	94,20

Tabela IV

Controle Radioquímico de BUTIL-IDA

Variação dos Volumes de Solução de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ Adicionados

Vol. $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (ml)	Tempo (min.)	15'	30'	60'	120'	180'
	Rendimentos de Marcação (%)					
1		97,30	97,70	97,90	98,00	94,90
2		97,50	97,60	97,20	97,90	95,70
3		97,10	97,50	97,80	97,20	92,80
5		96,30	96,40	96,70	97,40	97,00

Tabela V

Controle Radioquímico de BUTIL-IDA
 Variação das Atividades de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ Adicionadas

Atividade ^{99m}Tc (mCi)	Tempo (min.)	15'	30'	60'	120'	180'
	Rendimentos de Marcação (%)					
1		97,80	98,10	98,20	97,80	97,60
35		97,30	97,90	97,30	98,20	97,40
55		96,80	96,80	95,20	96,10	95,20

Tabela VI

Controle Radioquímico de BUTIL-IDA.
 Estabilidade do Produto Armazenado a 5° C.

Tempo Armazenamen- to (meses)	Tempo (min.)	15'	30'	60'	120'	180'
	Rendimentos de Marcação (%)					
1		94,60	96,20	95,30	94,30	94,20
2		94,20	94,60	96,90	96,30	95,40
3		94,00	97,50	96,30	96,20	96,00

CONTROLE BIOLÓGICO

Foi realizado controle da distribuição biológica em animais (rato Wistar), com peso médio de 250 gramas. A dose injetada por via endovenosa foi de $100\mu\text{Ci}$ e a captação nos diferentes órgãos foi avaliada por meio de cintilografia no cintilógrafo linear Nuclear Chicago (phot-dot Scanner).

As imagens foram obtidas aos 15, 20, 60 e 120 minutos após a dose (Figuras 1 e 2).

A aplicação clínica da diisopropil-IDA (DISIDA) foi avaliada em paciente que recebeu 3 mCi de DISIDA - ^{99m}Tc por via endovenosa. As imagens foram obtidas em Gama Cama (Nuclear Chicago) aos 2, 15 e 60 minutos após a administração da dose (Figura 3).

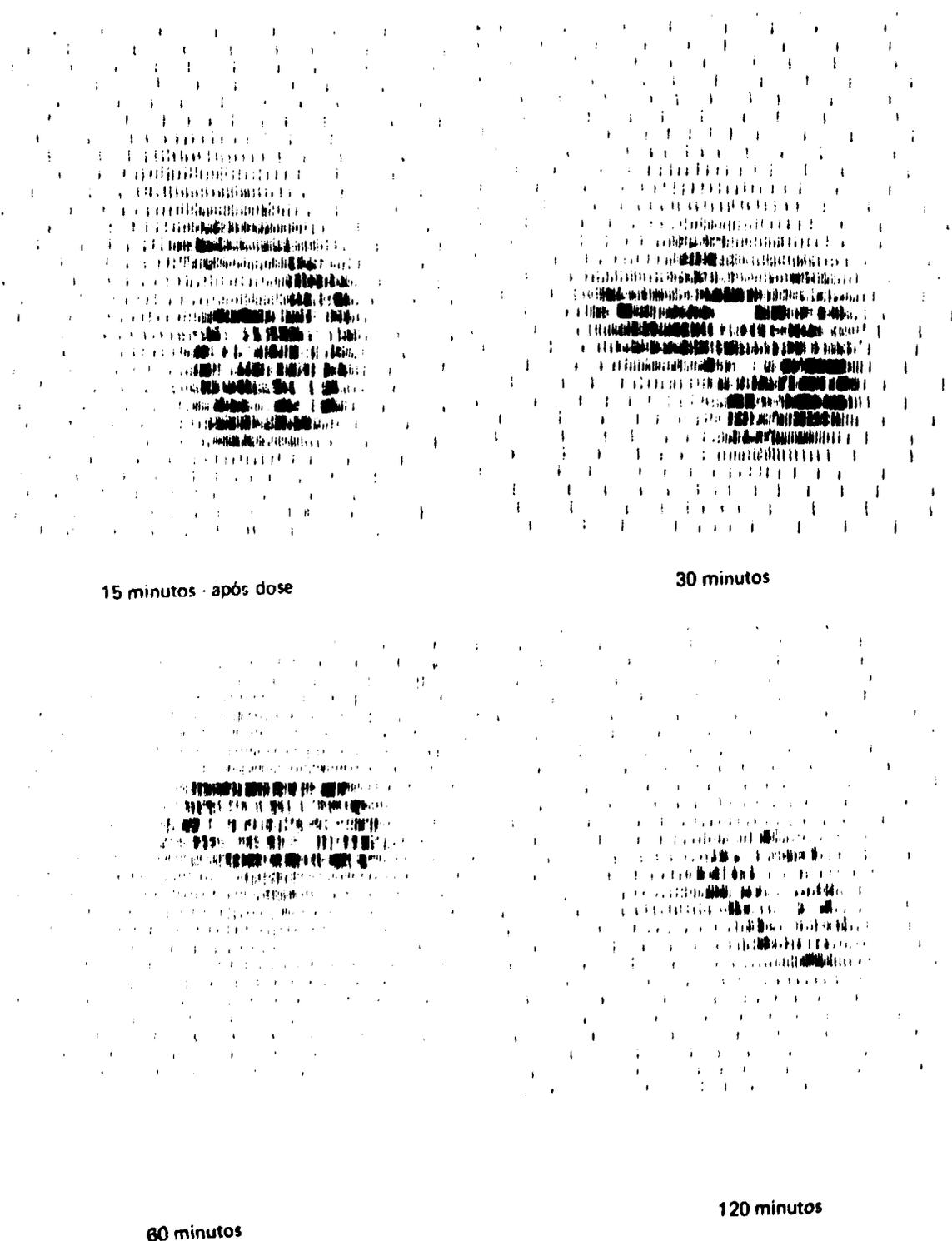


Figura 1 – Cintilografia hepato-biliar de DISIDA - ^{99m}Tc em rato Wistar - dose $100 \mu\text{Ci}$.

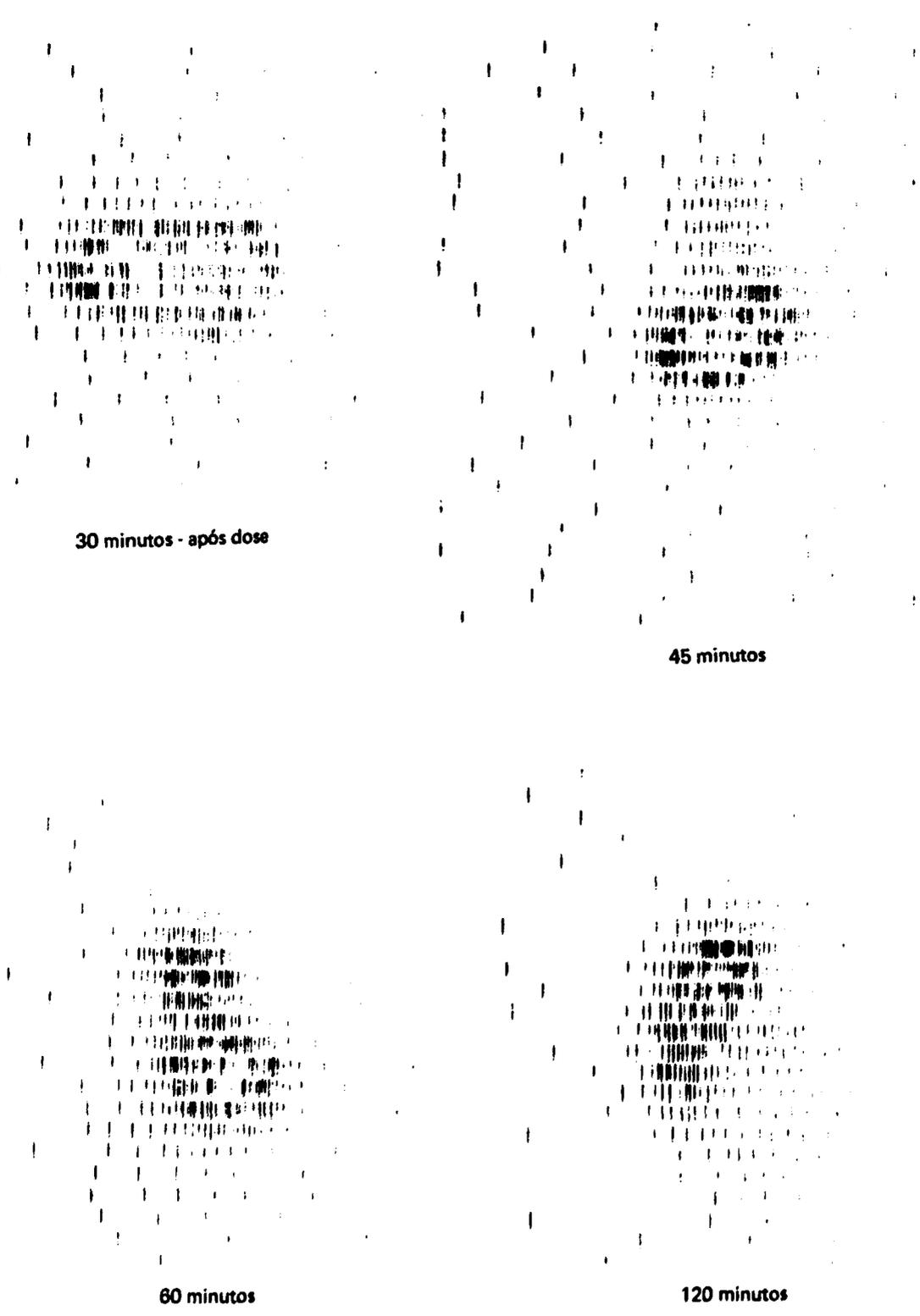


Figura 2 — Cintilografia hepato-biliar de BUTIL-IDA ^{99m}Tc em rato Wistar - dose 100 μ Ci.

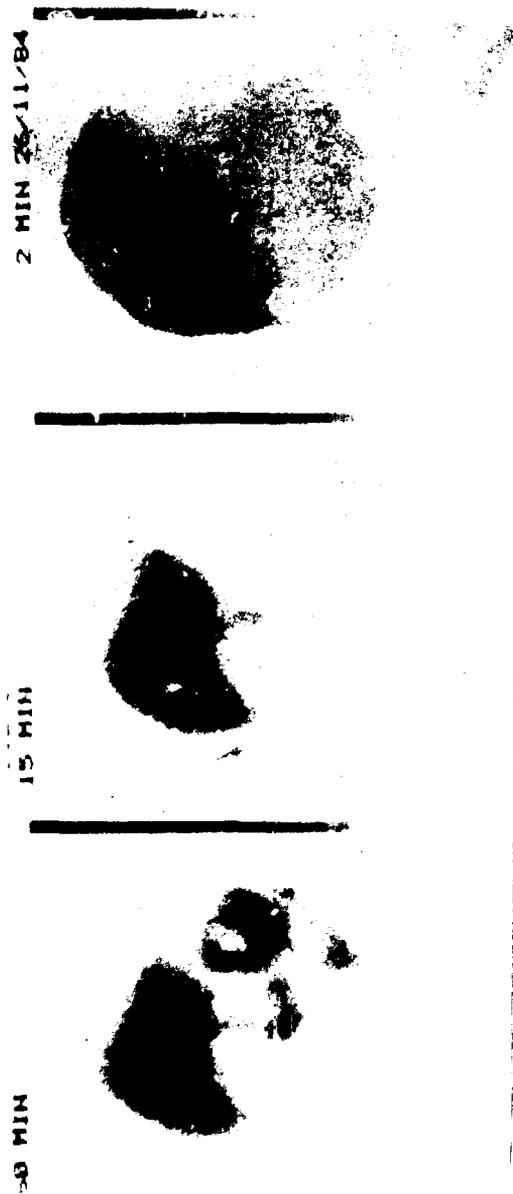


Figura 3 – Cintilografia hepato-biliar de DISIDA - ^{99m}Tc em paciente - dose 3 mCi

CONCLUSÃO

As preparações do DISIDA e do BUTIL-IDA, apresentaram rendimentos satisfatórios, sendo viáveis as sínteses em nossos laboratórios dada a técnica relativamente simples.

Os conjuntos de reativos liofilizados não apresentam problemas de preparação, dando rendimentos elevados de marcação e validade de até 6 meses após a sua fabricação.

Os produtos mostraram-se compatíveis para serem usados como injetáveis em Medicina Nuclear para estudos do sistema hepato-biliar.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Prof. Dr. Massayoshi Yoshida, do Instituto de Química da USP, pela realização das análises espectroscópicas por Ressonância Magnética Nuclear, Infra-Vermelho e Microanálises dos compostos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHIOTELLIS, E. ; SANWAS, C. ; DIMOPOULOU, C. ; CONSTANTINIDES, M. ^{99m}Tc -HIDA a gall-blader imaging agent. *Experimental aspects. Eur. J. Nucl. Med.*, 3: 41–6, 1978.
2. GREEN, A. ; ROSENBERG, M.; SHEAMAN, M. Multicenter trial of ^{99m}Tc disphenin (diisopropylphenyl-carbamoyl-methyliminodiacetic acid): a new hepatobiliary agent for imaging jaundiced and non jaundiced patients. *J. Nucl. Med.*, 21(6): P18, 1980.
3. HAMADA, E. ; BARBOZA, M. F. ; ALMEIDA, M. A. M. ; COLTURATO, M. T. ; SILVA, C. P.; MURAMOTO, E. Síntese do ácido 4-p-n-Butilfenil-carbamoyl etil iminodiacético. Preparação de conjuntos de reativos liofilizados para marcação com ^{99m}Tc e utilização em diagnósticos hepato-biliar. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ENERGIA NUCLEAR. *Energia Nuclear: anais do 1º congresso geral de . . . , realizado no Rio de Janeiro, mar. 1986.* Rio de Janeiro, 1986. v. 2, p. 134–7.
4. HARVEY, E.; LOBERG, M.; COOPER, M. ^{99m}Tc -HIDA a new radiopharmaceutical for hepatobiliary imaging. *J. Nucl. Med.*, 16: 533–7, 1975.
5. MITTA, A. ; ARCIPRETE, C. ; GROSS, E. Synthesis of ^{99m}Tc : 2,6-Dimethyl; 2,6-Diethyl; 2,6-Diisopropyl, and 4-n-Butylphenylcarbamoylmethyl Iminodiacetic Acid. *J. Labelled Compd.*, 19: 1602–5, 1982.
6. WEISSMAN, H. ; BADIA, J.; HALL, T. ; SUGARMAN, L. ; FREEMAN, L. ^{99m}Tc Diisopropyl Iminodiacetic Acid (DISIPA): The best overall cholescintigraphic radionuclide for the evaluation of hepatobiliary disorders. *J. Nucl. Med.*, 21(6): P18, 1980.
7. WILLIAN, D. & FLEMING, I. *Spectroscopy methods in organic chemistry.* 2. ed. London, McGraw-Hill, 1973. p. 35–72.
8. WISTON B.; SUBRAMANIAN, G.; HEERTUM, R. van; HENDERSON, R.; GAGNE, G.; HALL, R.; MC AFEE, J. An evaluation of ^{99m}Tc -labeled hepatobiliary agents. *J. Nucl. Med.*, 18: 455–61, 1977.