

ELABORACIÓN DE UN RADIOFÁRMACO (PARTE I): PREPARACIÓN DE UN LIGANDO DEL TIPO DIAMINODITIOL PARA USO EN MEDICINA NUCLEAR

López-Gabriel J.⁽¹⁾, Robles A.⁽²⁾ arobles@ipen.gob.pe

(1) *Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Química e Ingeniería Química / Lima, Perú*

(2) *Planta de Producción de Radioisótopos – IPEN / Lima, Perú*

Abstract: In the renal function study the diaminodithiol (DADT) complexes with Tc 99m have an advantage due to the great absorption in the kidneys and the fast removal by means of urine. Among this complexes, the N,N'-bis-L-(1-carboxi-2-mercaptoethyl) ethylenediamine (EC) which form a stable complex with technetium (V) of tetragonal structure exhibit better results. In this work a study about its preparation is presented.

Key words: Radiopharmaceuticals, Technetium 99m, ligands.

Resumen: En el estudio de la función renal los complejos del tipo Diaminoditiol (DADT) con tecnecio 99m presentan ventajas por su gran absorción en los riñones y rápida eliminación a través de la orina. De estos compuestos, el N,N'-bis-L-(1-carboxi-2-mercaptoetil) etilendiamina (EC), el cual forma un complejo estable con el oxotecnecio (V) de estructura tetragonal es el que presenta mejores resultados [1]. En el presente trabajo se presenta un estudio sobre el procedimiento de su preparación.

Palabras clave: Radiofármacos, tecnecio 99m, ligandos.

INTRODUCCIÓN

La medicina nuclear se define como la especialidad médica que emplea los isótopos radiactivos, las radiaciones electromagnéticas, los componentes del núcleo y técnicas biofísicas afines, para la prevención, el diagnóstico, tratamiento e investigación médica; tiene un carácter multidisciplinario, ya que junto a la medicina intervienen otras ciencias del saber humano, como física nuclear, química, radioquímica y electrónica [1].

Los radiofármacos son sustancias o compuestos radiactivos susceptibles de ser administrados al organismo vivo, con fines de diagnóstico y/o terapia. Un radiofármaco habitualmente se prepara de forma inmediata antes de su

utilización, dado que la mayoría de los radionucleídos utilizados en medicina nuclear poseen un período de semidesintegración muy corto [1].

En el caso de los radiofármacos que se utilizan para el estudio de la función renal, son dos los que se usan en el país; el Hipurán (OIH) y el MAG_3 . Ambos presentan algunas desventajas, el Hipurán (OIH) utiliza el Iodo-131 como radioisótopo de marcación; lo cual implica la irradiación del paciente con radiación gamma y beta de mayor energía y por mayor tiempo que utilizando un radiofármaco de tecnecio. El MAG_3 utiliza tecnecio para marcarse, pero su preparación se realiza en tres pasos y los productos intermediarios deben purificarse varias veces para utilizarlos en la obtención del producto final; el MAG_3 así obtenido debe también ser purificado para alcanzar la pureza necesaria que permita utilizarlo como radiofármaco. Todo esto hace que se tenga un bajo rendimiento sobre el producto final, por lo que, la preparación del MAG_3 debe realizarse una o dos veces al año.

Por todo esto, en el Perú es necesario contar con un radiofármaco para realizar estudios de la función renal, que sea de fácil preparación y marcación; estas características las cumple el N,N'-Bis-L-(1-carboxi-2-Mercaptoetil) etilendiamina (EC) que empezó a comercializarse en otros países a partir de los años 94 y 95. El objetivo del presente trabajo es preparar el Ligando N,N'-Bis-L-(1-carboxi-2-Mercaptoetil) etilendiamina (EC).

OBTENCIÓN DEL N,N'- BIS – L - (1 – CARBOXI –2- MERCAPTOETIL) ETILENDIAMINA (EC)

En 1992 Verbruggen [2] descubrió que el L,L-etilendicisteína (EC), marcado con Tc 99m, es un metabolito de una captación eficiente y rápida en los riñones y buena eliminación en la orina; por lo que, lo propuso

SÍNTESIS DE EC

La obtención del EC se basa en la reducción con sodio en amoníaco líquido del ácido tiazolidín-4-carboxílico. La síntesis de EC fue propuesta por Blondeau [4] y colaboradores en 1967. El procedimiento que publicaron es el siguiente:

A una solución en reflujo de ácido tiazolidín-4-carboxílico (22 g; 0,165 moles) en 200 mL de amoníaco líquido, se adiciona sodio hasta que aparece un persistente color azul. Luego de la adición de cloruro de amonio la solución se deja evaporar hasta sequedad. El residuo se disuelve en 200 mL de agua y se acidifica hasta pH 2,0. El precipitado es filtrado y lavado con 500 mL de agua. El producto, insoluble en los solventes orgánicos más frecuentes (etanol, éter etílico, acetona, etc.), fue purificado por precipitación sucesiva de sus sales de sodio con ácido diluido para rendir 11,1 g (50 %) del dímero, el cual funde con descomposición a 251-253 °C.

A partir de la unión de los residuos acuosos de los filtrados y lavados obtenidos durante el procedimiento anterior se obtuvo por evaporación un residuo sólido. La extracción de este residuo con dos porciones de etanol (2x50 mL) seguido por la evaporación del solvente rindió 8,6 g (30 %) de clorhidrato de N-metil-cisteína con punto de fusión de 127 °C.

Observamos que la obtención del EC se realiza en un medio no acuoso. La utilización de amoníaco líquido como solvente implica reacciones y también adoptar cuidados especiales que son poco frecuentes en nuestro medio.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Se ha dividido la parte experimental en dos secciones; la primera comprende la preparación del ácido tiazolidín-4-carboxílico y la segunda, la preparación del ligando EC.

PREPARACIÓN DEL ÁCIDO TIAZOLIDIN-4-CARBOXÍLICO

Se siguieron tres procedimientos en los cuales se hicieron variaciones en las proporciones de agua y etanol utilizados en cada experiencia. Todos los procedimientos se basan en el método publicado por Ratner [3].

PROCEDIMIENTO 1:

En un balón de 500 mL de base plana se

disolvió 39 g (0,25 moles) de clorhidrato de L-cisteína en 100 mL de agua. Luego, se adicionó lentamente 22,55 mL (0,30 moles) de formaldehído. La solución se dejó con agitación constante y a temperatura ambiente hasta el día siguiente. Se añadió 24,4 mL (0,30 moles) de piridina y luego 50 mL de etanol. El precipitado formado es filtrado y purificado por recristalización con agua caliente para rendir 26,65 g de producto (80%). El punto de fusión es de 197 °C con descomposición.

PROCEDIMIENTO 2:

En un balón de 500 mL de base plana se disolvió 56,29 g (0,35 moles) de clorhidrato de L-cisteína en 100 mL de agua. Luego, se adicionó lentamente 31,56 mL (0,42 moles) de formaldehído. La solución se dejó con agitación constante y a temperatura ambiente hasta el día siguiente. Se añadió 34,08 mL (0,42 moles) de piridina y luego 70 mL de etanol. El precipitado formado es filtrado y purificado por recristalización con agua caliente para rendir 38,2 g de producto (82 %). El punto de fusión es de 197 °C con descomposición.

PROCEDIMIENTO 3:

En un balón de 500 mL de base plana se disolvió 64,3 g (0,408 moles) de clorhidrato de L-cisteína en 80 mL de agua. Luego, se adicionó lentamente 37,57 mL (0,5 moles) de formaldehído. La solución se dejó con agitación constante y a temperatura ambiente hasta el día siguiente. Se añadió 40,19 mL (0,5 moles) de piridina y luego 100 mL de etanol. El precipitado formado es filtrado y purificado por recristalización con agua caliente para rendir 48,78 g de producto (89,83%). El punto de fusión es de 198 °C con descomposición.

PREPARACIÓN DEL N,N-L-BIS-(1-CARBOXI-2-MERCAPTOETIL) ETILENDIAMINA (EC)

Se realizó tres veces la preparación del EC según el procedimiento propuesto por Blondeau [4]. La primera vez se utilizó 33 g de ácido tiazolidín-4-carboxílico y en las otras dos veces se usaron 66 g.

PROCEDIMIENTO:

En un balón de tres bocas de un litro de capacidad adaptado con un condensador de amoníaco, una salida hacia una trampa de glicerina, un agitador magnético y un baño de alcohol y hielo seco se colocó 66 g (0,50 moles) de ácido tiazolidín-4-carboxílico.

Luego de recolectar 600 mL de amoníaco líquido en los cuales con ayuda de la agitación se disuelve el ácido tiazolidín-4-carboxílico se inició la adición lenta del sodio metálico en trozos pequeños, la adición terminó luego de que el color azul de la solución se mantuvo por más de 15 minutos. Se añadió cloruro de amonio anhidro hasta la desaparición del color azul y luego se dejó el balón a temperatura ambiente para eliminar el amoníaco. El residuo remanente fue disuelto en 600 mL de agua, filtrado y el pH del filtrado llevado a 2,0 con ácido clorhídrico concentrado. Luego de enfriar, el precipitado se filtró y lavó cuidadosamente con agua fría,

se secó y obtuvimos 25,5 g de producto total (38,32 %).

Para purificar, el producto se llevó a una suspensión en 500 mL de agua con agitación y se añadió hidróxido de sodio 3N hasta pH 9,0; luego se adicionó ácido clorhídrico concentrado hasta pH 2,0; se enfrió, filtró, lavó con agua helada y secó. El proceso de purificación se realizó por segunda vez y se obtuvo al final 21,63 g (32,50 %) de producto purificado. El punto de fusión es de 251-253 °C.

RESULTADOS

PREPARACIÓN DEL ÁCIDO TIAZOLIDÍN-4-CARBOXÍLICO

Se realizaron tres procedimientos diferentes para la preparación del ácido tiazolidín-4-carboxílico, en la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 1. Relación que existe entre las cantidades de cisteína, etanol y agua utilizados.

PROCEDIMIENTO	RELACIÓN AGUA/CISTEINA(*)	RELACIÓN ETANOL/AGUA(**)
1	2,56	0,5
2	1,78	0,7
3	1,24	1,25

(*) Relación [w/w]

(**) Relación [v/v]

Tabla 2. Rendimientos obtenidos.

PROCEDIMIENTO	RENDIMIENTO
Ratner	85,2 %
1	80 %
2	82 %
3	89,8 %

PREPARACIÓN DEL N, N – BIS – L - (1 – CARBOXI – 2 - MERCAPTOETIL) ETILENDIAMINA (EC)

Se obtienen los siguientes resultados:

Tabla 3. Peso de reactivos usados.

EXPERIENCIA	ÁCIDO TIAZOLIDIN 4-CARBOXÍLICO (g)	SODIO METÁLICO (g)	Tiempo de adición Na ^o (h)
1	33	7	0,5
2	66	29	1,5
3	66	45,5	2,5

Tabla 4. Rendimientos de EC y N-metil-cisteína obtenidos.

EXPERIENCIA	RENDIMIENTO de EC	RENDIMIENTO de N-METIL-CISTEÍNA
Blondeau	50 %	30 %
1	14,15 %	16 %
2	28,1 %	35,3 %
3	32,5 %	27,6 %

Tabla 5. Puntos de fusión obtenidos para el EC.

EXPERIENCIA	Pto. Fusión Teórico (°C)	Pto. Fusión Experim. (°C)
1		254 - 255
2	251 - 253	251 - 253
3		252 - 253

Tabla 6. Puntos de fusión obtenidos para la N-metil-cisteína.

EXPERIENCIA	Pto. Fusión Teórico (°C)	Pto. Fusión Experim. (°C)
1		125 - 126
2	127	124 - 125
3		126 - 127

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

PROPUESTA DE MECANISMOS DE REACCIÓN

A partir de los resultados y las observaciones experimentales es posible proponer los siguientes mecanismos de reacción para el ácido tiazolidín-4-carboxílico y el EC.

ÁCIDO TIAZOLIDÍN-4-CARBOXÍLICO

La reacción entre la L-cisteína y el formaldehído ocurre en dos etapas; primero la adición del formaldehído y luego la formación del anillo con la eliminación de una molécula de agua.

El ataque nucleofílico por parte de la molécula de la L-cisteína al formaldehído ocurre por medio del azufre ya que presenta mayor poder nucleofílico que el nitrógeno obteniéndose así un compuesto del tipo: R-S-CH₂-OH.

Luego de que el ión hidronio proveniente del medio ácido se adiciona al grupo -OH terminal, forma el ión oxonio (buen grupo saliente) y el nitrógeno ataca nucleofílicamente al carbono alfa respecto al azufre, cerrándose el anillo y eliminándose una molécula de agua. El ácido tiazolidín-4-carboxílico así formado es soluble en el medio ácido en el que ocurre la reacción.

El ácido tiazolidín-4-carboxílico es insoluble en alcohol, muy poco soluble en agua fría y bastante soluble en agua caliente. Se aprovechan estas propiedades para precipitarlo y purificarlo.

Para precipitarlo se añade piridina, la cual elimina el medio ácido atrapando los iones hidronio y formando el ión piridinio; permitiendo con ayuda del medio alcohólico, la precipitación del producto; se filtra al vacío y recristaliza en agua caliente.

Tabla 7. Estequiometría de la reacción para la obtención del ácido tiazolidín-4-carboxílico.

ESTEQUIOMETRÍA DE LA REACCIÓN

Reacción	Clorhidrato de L-cisteína	+ Formaldehído	----- Ac. Tiazolidín-4-Carboxílico	+ Agua
Relación de moles	1	1	1	1
Gramos en reacción	64,30 g.	15,1 g. (37,57 mL de solución al 37%)	54,305 g. (Teórico)	
Moles	0,408	0,50	0,408 (Teórico)	

Adicionalmente se utiliza :
 Piridina : 40,19 mL (0,50 moles)
 Etanol : 100 mL (1,16 moles)

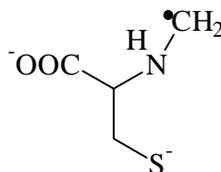
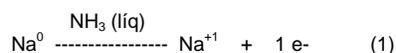
De la tabla 7 se observa en la reacción que 1 mol de clorhidrato de L-cisteína reacciona con 1 mol de formaldehído para producir 1 mol de ácido tiazolidín-4-carboxílico. En el procedimiento se utilizan 0,408 moles de clorhidrato de L-cisteína y 0,50 moles de formaldehído; por lo tanto el reactivo limitante es el clorhidrato de L-cisteína. También se utiliza 0,50 moles de piridina, una cantidad adecuada para precipitar el total de ácido tiazolidín-4-carboxílico que se puede formar. El etanol que se utiliza en exceso (1,16 moles) favorece la precipitación total del producto.

N,N'-BIS-L-(1-CARBOXI-2-MERCAPTOETIL) ETILENDIAMINA (EC)

De la reducción con sodio en amoníaco líquido del ácido tiazolidín-4-carboxílico se obtiene un mezcla de dos compuestos; el porcentaje de cada uno de ellos depende del procedimiento experimental seguido. Los compuestos obtenidos son la N-metil-cisteína y el N,N'-bis-

L-(1-carboxi-2-mercaptoetil) etilendiamina (EC); ambos se originan a partir de un radical dianión formado por el ataque nucleofílico de los electrones que libera el sodio metálico al disolverse en amoníaco líquido a la molécula del ácido tiazolidín-4-carboxílico. Si ocurre la dimerización de este radical se produce el EC de lo contrario se obtiene la N-metil-cisteína.

Primero, la solubilización del sodio metálico en amoníaco líquido produce iones sodio y electrones, los cuales se encuentran solvatados (reacción 1) y a los cuales se les asocia el color azul de la solución. Sin embargo, reaccionan con el amoníaco líquido para formar los iones amiduro los cuales son bases muy fuertes que pueden arrancar hidrógenos ácidos y son, por lo tanto perjudiciales para la reacción deseada; precipitando bajo la forma de amida de sodio; una sal extremadamente insoluble en amoníaco líquido. Las reacciones son:



Radical dianión

La reacción (2) produce hidrógeno atómico que, al unirse al radical dianión formado al principio da origen a la N-metil-cisteína. Aunque es imposible impedir que la reacción (2) ocurra, podemos minimizarla siguiendo el procedimiento experimental adecuado. En el proceso a seguir se disuelve el total del ácido tiazolidín-4-carboxílico en el amoníaco líquido antes de añadir el sodio metálico; de esta manera, cuando una pequeña porción de sodio se disuelve y genera electrones, éstos reaccionan inmediatamente con el ácido, abriendo el anillo y formando el radical dianión, el cual se dimeriza para formar el EC.

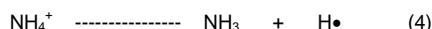
Blondeau menciona que para producir la N-metil-cisteína, se adiciona de manera sucesiva pequeñas porciones de sodio metálico y de ácido tiazolidín-4-carboxílico de manera que el

ácido se mantenga siempre en concentración diluida. Podemos deducir que con este procedimiento se favorece la reacción (2) ya que, al no existir concentración de ácido en gran cantidad, parte de los electrones reaccionan con el amoníaco líquido produciendo hidrógeno atómico y formando así la N-metil-cisteína.

En lo que respecta a la eliminación del color azul de la solución por adición de cloruro de amonio anhidro no se encontró información que explique la acción del cloruro de amonio pero se encontró que es un procedimiento comúnmente seguido al trabajar soluciones de sodio en amoníaco líquido. Según la literatura el color azul se asocia a los electrones solvatados por el amoníaco; de ser así y manteniendo la premisa de que la amida de

sodio es totalmente insoluble en el medio usado; el cloruro de amonio debe

necesariamente interactuar con los electrones, una probable reacción podría ser:



esto explicaría la eliminación de los electrones y por consiguiente el color azul.

De las reacciones (3) y (1) se observa la formación de cloruro de sodio, una sal insoluble en amoníaco líquido.

Como en el procedimiento a seguir se deja evaporar el amoníaco hasta que quede un residuo sólido, éste deberá contener la sal sódica del EC y N-metil-cisteína, además de las sales de sodio y otras impurezas sólidas. El residuo se disuelve en agua, eliminando la amida de sodio según la reacción:



la reacción (5) genera un medio básico.

El EC es un compuesto soluble sólo en bases y ácidos fuertes; en cambio, la N-metil-cisteína es un compuesto muy soluble en soluciones acuosas. Esta gran diferencia de solubilidades es la que se aprovecha para separarlas.

Al realizar la hidrólisis ácida hasta llegar a un pH de 2,0; se forma el EC el cual precipita y la N-metil-cisteína se mantiene en solución; el precipitado de EC se filtra y se lava completamente con abundante agua para eliminar los restos de N-metil-cisteína que puedan quedar. La purificación del EC se lleva a cabo disolviéndolo con NaOH 3N hasta llegar a un pH de 9,0 y reprecipitándolo con HCl concentrado hasta pH 2,0-2,5; este paso puede repetirse cuantas veces sea necesario.

Tabla 8. Estequiometría de la reacción para obtener el EC.

Reacción	ESTEQUIOMETRIA DE LA REACCIÓN			
	Ác. tiazolidín-4-carboxílico	+ Na ^o / NH ₃ (líq)	HCl / H ₂ O	EC
Relación de moles	2	2	-----	1
Gramos en reacción	66	45,5		66,548 (teórico)
Moles en reacción	0.496	1,97		0,248 (teórico)

De la tabla 8 se observa que 2 moles del ácido tiazolidín-4-carboxílico reaccionan con 2 moles de sodio metálico para producir 1 mol de EC. En este procedimiento se utiliza al ácido tiazolidín-4-carboxílico como reactivo limitante.

Nota: la estequiometría de la reacción de formación de la N-metil-cisteína es idéntica en sus requerimientos de sodio con la estequiometría del EC; es decir, en esta reacción la relación de moles de sodio y de ácido tiazolidín-4-carboxílico es también de 1 a 1. Por lo tanto, estequiométricamente, no compite con la reacción de formación del EC.

SOBRE LA PREPARACIÓN DEL ÁCIDO TIAZOLIDÍN-4-CARBOXÍLICO

El ácido tiazolidín-4-carboxílico se forma por una reacción de condensación entre la cisteína y el formaldehído. Sin embargo, no precipita por encontrarse en un medio ácido en el cual es soluble y debe de neutralizarse. Como el producto también es soluble en soluciones básicas; se prefiere adicionar piridina que por ser una base débil de origen orgánico, va a eliminar el medio ácido por formación del ion piridinio, permitiendo la precipitación del producto.

El ácido tiazolidín-4-carboxílico es insoluble en etanol y éter, ligeramente soluble en agua fría y muy soluble en agua caliente, ácidos y álcalis; por lo que, se decidió variar el procedimiento y disolver el clorhidrato de L-cisteína en una cantidad de agua menor que la

usada por Ratner y también utilizar una cantidad mayor de etanol para favorecer la total precipitación. El reactivo limitante en el procedimiento de Ratner es el clorhidrato de L-cisteína, los otros reactivos que participan directamente en la reacción como el formaldehído y la piridina se utiliza en un exceso del 20 %. Estas condiciones se mantuvieron en todos los procedimientos realizados.

En el procedimiento 1 se repitió la experiencia seguida por Ratner [3], obteniéndose un rendimiento menor de producto recristalizado. Al disminuir la relación agua/cisteína y aumentar la relación etanol/agua en los procedimientos 2 y 3, se obtiene una mejora en el rendimiento del ácido (Tablas 1 y 2).

Durante el proceso de purificación no se pierde mucho producto ya que la recristalización tiene un rendimiento mayor al 90 %. Los puntos de fusión obtenidos están de acuerdo con los reportados por la literatura.

El análisis infrarrojo indica la presencia de los grupos funcionales característicos al ácido tiazolidín-4-carboxílico.

SOBRE LA PREPARACIÓN DEL N,N'-BIS-L-(1-CARBOXI-2-MERCAPTOETIL)ETILENDIAMINA (EC)

Los resultados reportados en las tablas 3, 4, 5 y 6 nos indican que los factores que inciden directamente en la mejora del rendimiento del EC son la cantidad de amoníaco líquido usado para disolver el ácido tiazolidín-4-carboxílico, el tamaño de los trozos de sodio metálico añadidos y la velocidad de adición de los mismos.

De las tres experiencias realizadas, en las dos últimas se observa el color azul intenso que la literatura reporta como término de la reacción.

Con respecto al proceso de purificación, la adición del ácido clorhídrico concentrado para precipitar el EC debe hacerse muy lentamente y a baja temperatura utilizando un baño de agua y hielo; debido a que la adición rápida del ácido descompone al EC, lo cual se percibe por el olor a azufre que desprende la solución obteniéndose al final un producto con un punto de fusión por debajo del teórico. El rendimiento de la purificación por reprecipitación es mayor al 90 % en todos los casos.

El análisis infrarrojo indica la presencia de los grupos funcionales característicos del EC.

Es preferible tener todo el ácido tiazolidín-4-carboxílico disuelto en el amoníaco líquido, antes de empezar la adición del sodio metálico. Una vez que el sodio metálico se adiciona, se disuelve inmediatamente en el amoníaco líquido y los electrones que genera reducen el anillo del ácido tiazolidín, abriéndolo y formando el radical dianión; éste a su vez se dimeriza para formar el EC.

CONCLUSIONES

1. El EC es de fácil preparación, se obtiene con un buen rendimiento y con la pureza química necesaria para ser usado como radiofármaco.
2. Se logró mejorar el procedimiento publicado por Ratner para preparar el ácido tiazolidín-4-carboxílico, obteniéndose un rendimiento del 89,83 %.
3. El presente trabajo fue realizado en los laboratorios de Desarrollo del Área de Control de Calidad de la Planta de Producción de Radioisótopos del Centro Nuclear de Huarangal del IPEN en Puente Piedra.

BIBLIOGRAFÍA

- [1]. Sociedad Argentina de Radiofarmacia. SARF. Foro Permanente de Farmacia y Bioquímica. Radiofarmacia (1995).
- [2]. Verbruggen, A. M.; Nosco, D.L.; Van Nerom, C.G.; Bormans, G.M.; Adriaens, P.J.; De Roo, M.J. Technetium 99m – L,L-Ethylendicisteine: A renal Imaging Agent I. Labeling and Evaluation in Animals. J. Nucl. Med. 33, 551-557 (1992).
- [3]. Sarah Ratner and H.T. Clarke. The action of Formaldehyde upon Cisteyne. J. Am. Chem. Soc. 59, 200 (1937).
- [4]. Blondeau P. Berse C, Gracel D. Dimerization of an Intermediate during the Sodium in Liquid Ammonia Reduction of L-Thiazolidine-4-Carboxylic Acid. Can. J. Chem, 45, 49-52 (1967).