











Estabilidad de la [¹⁸F] fludesoxiglucosa cubana

 Lissett Gutiérrez Hernández,  Yurilma González Valdés,  Aily Caridad Aguiar Agramonte,  Leonardo García Reyes,  Henry Reyes Pérez,  Wendy Delis Millares,  Dianisleydis Gómez García,  Hortensia Morales Arranz,  Yordanka Martínez Almaguer,  Mayka Guerrero Cancio
Centro Especializado en Diagnóstico y Terapia (CEDT), La Habana, Cuba
lgutierrez@cimeq.sld.cu

Resumen

El Centro Especializado de Diagnóstico y Terapia, del Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas, produce [¹⁸F]FDG para su uso en la obtención de imágenes mediante Tomografía por Emisión de Positrones en Cuba. El objetivo del trabajo fue definir la estabilidad del producto en diferentes intervalos de tiempo en condiciones ambientales. Se evaluaron los parámetros físico-químicos y microbiológicos establecidos por la especificación de calidad: pH, identidad y pureza radionuclídica, pureza química, solventes residuales, endotoxinas y esterilidad. Los resultados mostraron que la [¹⁸F]FDG cubana fue estable durante 12 horas de almacenamiento después de la dispensación del producto en condiciones de temperatura entre 22-25°C.

Palabras clave: flúor 18; fluorodeoxiglucosa; control de calidad; estabilidad; tomografía computerizada con positrón; radiofármacos.

Cuban [¹⁸F]Fluorodeoxyglucose stability

Abstract

The Specialized Center for Diagnosis and Therapy of the Center for Medical Surgical Research, produce [¹⁸F]FDG for using in medical imaging technology of Positron Emission Tomography in Cuba. The aim of this work was to evaluate the stability of the product at different time intervals under environmental conditions. [¹⁸F]FDG pH, radionuclidic identity and purity, chemical purity, residual solvents, bacterial endotoxins and sterility were evaluated. The results showed that Cuban [¹⁸F]FDG was stable in stored conditions, during twelve hours after delivering, between 22 and 25°C of temperature.

Key words: fluorine 18; fluorodeoxyglucose; quality control; stability; positron computed tomography; radiopharmaceuticals.

Introducción

En el Centro Especializado de Diagnóstico y Terapia (CEDT-CIMEQ) se produce mediante síntesis química la molécula de 2-[¹⁸F]Fluoro-2-desoxi-D-glucosa ([¹⁸F]Fluorodesoxiglucosa o [¹⁸F]FDG). Este radiofármaco se emplea, en la propia instalación, para la obtención de imágenes por Tomografía por Emisión de Positrones (PET, por sus siglas en inglés), en el diagnóstico de diferentes enfermedades, en las que se destacan las de origen oncológico.

Para el permiso de uso clínico se cuenta con el autorizo del Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED). Cada lote se transporta con su certificado de calidad, como garantía de que el producto cumple con las especificaciones establecidas en la farmacopea vigente [1].

Para la comercialización interhospitalaria es necesario definir las condiciones de almacenamiento, transportación y validez del producto, según las propias normativas del CECMED [2, 3]. Muchas son las variables que pueden in-

cidir en la pérdida de la estabilidad de un radiofármaco [4], por lo que se hace necesario realizar estos estudios para conocer su comportamiento en el tiempo bajo determinadas condiciones.

El trabajo consistió en estudiar la estabilidad, en condiciones ambientales, de tres lotes de producción consecutivos de [¹⁸F]FDG, a través de la evaluación de los indicadores de calidad establecidos para el producto.

Materiales y métodos

En el Departamento de Producción de Radiofármacos se desarrolla la producción de [¹⁸F]fludesoxiglucosa, mediante síntesis química por sustitución bimolecular. Una vez concluida, una muestra del radiofármaco pasa al laboratorio de control de la calidad donde se realizan los ensayos establecidos. El estudio de estabilidad se realizó a tres lotes consecutivos de producción: A, B y C. Las muestras se presentaron en bulbos de geometría 10 R, etiquetados con la información específica de cada

uno de ellos. El estudio se desarrolló durante los tiempos 0; 3; 6; 8; 10 y 12 horas. El tiempo cero corresponde al momento de la dispensación de la muestra inicial y los restantes tiempos coinciden con el tiempo de almacenamiento de las muestras a partir de la dispensación referida. Las seis muestras de cada lote se almacenaron a temperatura ambiente en contenedores plomados, como los que se usarán en la distribución del radiofármaco. La temperatura de almacenamiento se controló con el termohigrómetro calibrado Opus 20.

A todas las muestras se le realizaron los ensayos físico-químicos que garantizan la calidad del producto según lo descrito en la farmacopea americana (USP 40) [1]. Los mismos contemplan la apariencia, la pureza química mediante la determinación de la concentración de kryptofix y de los solventes residuales etanol y acetonitrilo, el pH, la pureza radioquímica, la pureza radionuclídica a través del tiempo de vida media del isótopo radiactivo y la determinación de la correspondencia entre la actividad de la muestra y la emisión gamma de los picos emitidos a 511 y 1022 keV [1], en cada uno de los tiempos establecidos. Los ensayos microbiológicos de determinación de la concentración de endotoxinas se realizaron a las muestras de los puntos de 0; 3; 10 y 12 horas y la respuesta a la esterilidad microbiológica se realizó en el punto inicial de cada lote en estudio, dado que en el ensayo se reportan los resultados pasados 14 días de la producción.

Las determinaciones del tiempo de vida media se realizaron en calibrador de dosis, con sus controles diarios ejecutados y con la calibración vigente.

Las mediciones potenciométricas se realizaron posterior a la calibración previa con las soluciones tampones correspondientes, según el intervalo de pH definido en la farmacopea [1].

Para la determinación de la pureza radionuclídica se utilizó el espectrómetro gamma con detector de germanio hiperpuro y analizador multicanal (HPGe). En el ensayo se reportó el porcentaje de la actividad de los picos alrededor de los 511 y 1 022 keV, asociados a la aniquilación de la desintegración β^+ del ^{18}F y a la suma de dos fotones detectados, con respecto a la actividad del espectro total de la muestra.

La determinación de la concentración de los solventes residuales de etanol y acetonitrilo, se realizó mediante cromatografía gaseosa. La concentración se determinó semicuantitativamente al comparar los picos correspondientes de etanol y acetonitrilo, con un patrón que contiene las concentraciones límites permisibles de estos solventes, para el etanol 5 mg/mL y para el acetonitrilo 0,41 mg/mL. [5].

La pureza radioquímica de ^{18}F FDG se identificó utilizando la técnica de cromatografía de placa delgada. Se usaron láminas de sílica gel sobre soporte de aluminio. La detección de las impurezas se realizó en el escáner TLC (β^+). Se utilizó un software específico para la cuantificación de la pureza del producto terminado ^{18}F FDG y sus impurezas.

La determinación semicuantitativa de la concentración de kryptofix se realizó mediante la comparación de la coloración del revelado, en cámara de iodo, de la

mancha de la muestra con la mancha del patrón, que corresponde a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. [1]. Las evidencias se registraron a través de fotos.

Las determinaciones de la concentración de endotoxinas se realizaron en un espectrofotómetro. En la técnica se determinó la absorbancia de un cromóforo liberado en la cascada de reacciones causada por la interacción de endotoxinas bacterianas con el reactivo LAL, que contiene amebocitos (leucocitos) del cangrejo herradura (*Limulus polyphemus* o *Tachypleus tridentatus*). Para la cuantificación de la concentración de endotoxinas se utilizó el software Spectro Star Nano.

La esterilidad del radiofármaco se realizó mediante inoculación directa en los medios de cultivo caldo tioglicolato y triptona soya. Las muestras se mantuvieron en incubación a temperaturas de 30-35°C y 20-25°C respectivamente durante 14 días.

Los resultados se procesaron con el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurion XV.II

Resultados

La temperatura en las condiciones de almacenamiento osciló entre 22 y 25°C, durante el desarrollo de los ensayos.

La apariencia de cada una de las muestras en los lotes estudiados y en los diferentes momentos cumple con la especificación de calidad, todas fueron muestras transparentes e incoloras.

En todos los casos la detección visual de la tonalidad de la muestra estuvo por debajo de la coloración de la mancha correspondiente al patrón de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados del comportamiento de la concentración de kryptofix en el tiempo 0 y 12 horas después de la dispensación en los tres lotes se presentan en la figura 1.







Como puede observarse en la tabla 1, el pH tuvo un comportamiento muy estable en cada uno de los lotes estudiados. Se comprobó estadísticamente que los lotes son homogéneos, no existen diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% entre los valores de pH encontrados en el tiempo, según el método de las diferencias mínimas significativas de Fisher.

Tabla 1. Comportamiento del pH en los diferentes lotes en estudio de estabilidad de ^{18}F FDG

Lotes	A	B	C
Promedio pH	6,38	6,45	6,24
Desv. est.	0,19	0,39	0,29
C.V. (%)	2,99	6,00	4,62

Desv. est.- Desviación estándar y C.V.-coeficiente de variación

En la tabla 2 se presentan los resultados de la comparación de los valores de pH entre los lotes A, B y C. Se encontró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las tres variables con un nivel del 95% de confianza.

Determinación de la concentración de kryptofix		
Lotes	Tiempo	
	0 h	12 h
A		
B		
C		

* P- Punteo de 2 µL de patrón de kryptofix de concentración 50 µg/mL y M- punteo de 2 µL de la muestra.

Figura 1. Evidencias de la determinación de la concentración de kryptofix en los lotes A, B y C, durante los tiempos de 0 y 12 horas.

El comportamiento de la pureza radioquímica en los lotes A, B y C, durante el desarrollo del estudio de estabilidad se presenta en la tabla 3. Los valores medios oscilan entre 95 y más de 97%, determinados con un coeficiente de variación menor del 3%.

Tabla 2. Resultados del ANOVA en el estudio de estabilidad del pH, entre los valores obtenidos durante los tiempos 0; 3; 6; 8; 10 y 12 horas después de la dispensación para cada uno de los lotes (A, B y C) y entre ellos.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,133	2	0,066	0,74	0,49
Intra grupos	1,348	15	0,090		
Total	1,480	17			

Tabla 3. Comportamiento de la pureza radioquímica (%) en los diferentes lotes durante el estudio de estabilidad de [¹⁸F]FDG.

Lotes	A	B	C
Promedio (%)	95,52	96,94	97,19
Desv. Est. (%)	2,69	1,90	0,43
C.V. (%)	2,82	1,96	0,44

Desv. est.- Desviación estándar y C.V.-coeficiente de variación

Este indicador mostró igual comportamiento en el tiempo en cada uno de los lotes estudiados. En las pruebas de múltiples rangos, mediante el procedimiento de diferencia mínima significativa de Fisher, se encontró que no hay diferencias estadísticamente significativas entre cualquier par de medias, con un nivel del 95% de confianza.

El comportamiento del tiempo de vida media en las muestras se presenta en la tabla 4. La media de los valores osciló entre 107,92 y 110,55 minutos, con un coeficiente de variación menor del 3%.

Tabla 2. Resultados del ANOVA en el estudio de estabilidad del pH, entre los valores obtenidos durante los tiempos 0; 3; 6; 8; 10 y 12 horas después de la dispensación para cada uno de los lotes (A, B y C) y entre ellos.

	Recuento	Promedio (min.)	Desviación estándar (min.)	Coefficiente de variación (%)
Tiempo de vida media lote A	6	110,55	1,26	1,14
Tiempo de vida media lote B	6	107,92	3,16	2,93
Tiempo de vida media lote C	6	110,12	3,07	2,79
Total	18	109,53	2,75	2,51

En el estudio estadístico del comportamiento del tiempo de vida media en un lote y la interacción entre los tres lotes del estudio, se encontró que no hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las variables con un nivel del 95% de confianza, según el ANOVA de los datos y las pruebas de múltiples rangos. Estos resultados se corroboran con los obtenidos en el HPGe, donde en todos los casos el 100% de la actividad corresponde con la energía de emisión y aniquilación positrónica.

En la determinación de los solventes residuales en los tres lotes del producto terminado de [¹⁸F]FDG la concentración de etanol en los diferentes tiempos fue inferior al límite establecido para este solvente de 5 mg/mL [1]. Siempre se encontraron, en el cromatograma, los picos por debajo de la muestra patrón. En el caso del acetonitrilo no se detectaron picos, por lo que su concentración resultó por debajo al límite de detección del método para este solvente (0,41 mg/mL). En la figura 2 se presenta el conjunto de cromatogramas obtenidos en el estudio del lote C.

Tabla 3. Comportamiento de la pureza radioquímica (%) en los diferentes lotes durante el estudio de estabilidad de [¹⁸F]FDG.

Lote evaluado	0 horas	3 horas	10 horas	12 horas
A	1,74	2,15	1,91	1,74
B	1,88	2,37	2,01	1,88
C	2,22	2,31	1,24	1,17

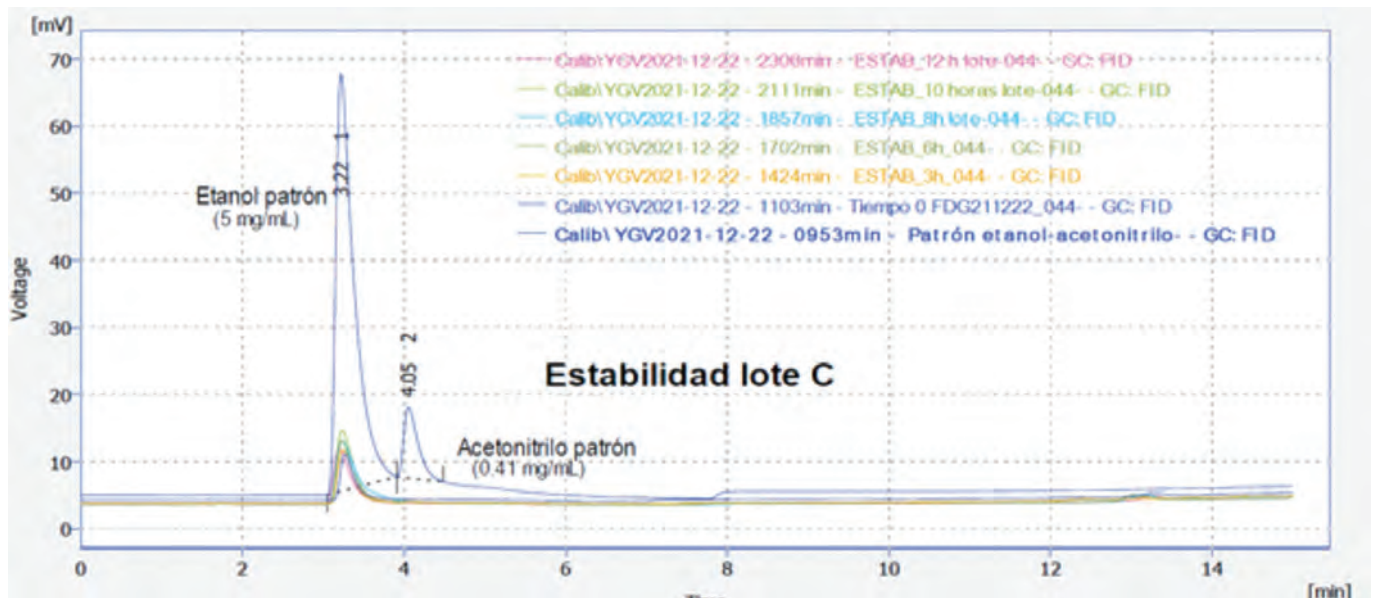


Figura 2. Comportamiento de la concentración de los solventes residuales (etanol y acetonitrilo) durante los tiempos de 0; 3; 6; 8; 10 y 12 horas después de la dispensación del lote C.

Discusión

Los lotes A, B y C, cumplieron los indicadores de calidad del producto exigidos en la farmacopea USP 40 [1], durante los tiempos 0; 3; 6; 8; 10 y 12 horas después de dispensación del radiofármaco. Las muestras en todo momento mantuvieron su apariencia transparente e incolora. La pureza química se mantuvo dentro de los parámetros establecidos de concentración de kryptofix (menor que 50 µg/mL), etanol (menor que 5 mg/mL) y acetonitrilo (menor que 0,41 mg/mL). [5].

Los valores de pH se encontraron en el rango de 4.5 – 7.5 y se cumplió con la especificidad de este parámetro [1]. Existió estabilidad en el comportamiento de los valores de pH. Los valores se comportaron iguales para cada uno de los lotes en el tiempo y entre ellos, con un nivel de confianza del 95%. La estabilidad en los valores de pH del producto terminado representa una garantía del desarrollo del proceso de síntesis química, ya que permite contar con una solución inyectable de [¹⁸F]FDG sin alteraciones del pH en, al menos, 12 horas después de la dispensación del mismo.

Por otra parte, al demostrar que la pureza radioquímica cumple con la especificación de calidad en el período de estudio, sirve además como indicador de la efectividad con que se logró la sustitución nucleofílica durante el proceso de síntesis. Esto indica que el porcentaje de marcaje de la molécula de FDG durante este proceso, es muy superior a las posibles impurezas acetiladas y fluoradas que se pueden obtener en el mismo.

El tiempo de vida media es un parámetro muy importante en la determinación de la calidad del producto final. Este ofrece la seguridad de que la radioactividad

de la muestra, corresponda al isótopo positrónico Flúor -18, con el objetivo de garantizar un certero diagnóstico en los pacientes a través del PET. Todas las muestras cumplieron este indicador, los valores se encuentran entre 105 y 115 minutos, especificación que corresponde al Flúor-18 [1].

Los resultados obtenidos durante el estudio de la molécula de [¹⁸F]FDG cubana son comparables con estudios similares. Ferreira y colaboradores reportan como tiempo de validez de [¹⁸F]FDG, 10 horas después de producida la molécula [6].

Conclusiones

La molécula de [¹⁸F]fludesoxiglucosa cubana es estable durante 12 horas en condiciones de almacenamiento entre 22 y 25°C.

Referencias bibliográficas

- [1]. United States Pharmacopeia. USP 40. Fludeoxyglucosa F 18 injection. The NF. 35 edition, 2017.
- [2]. Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED). Directrices sobre Buenas prácticas de fabricación de productos farmacéuticos. Regulación No. 16-2012. La Habana: CECMED, 2012.
- [3]. Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED). Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de productos farmacéuticos nuevos y conocidos. Regulación No. 23-2000. La Habana: CECMED, 2000.
- [4]. RAHMANI S, SHAHJOSEINI S, MOHAMADI R, VOJDANI M. Synthesis, quality control and stability studies of 2-[¹⁸F]Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose(18F-FDG) at different conditions of temperature by physicochemical and microbiological assays. Iran J Pharm Res. 2017. 16 (2): 602-610.
- [5]. European Medicines Agency (EMA). Science Medicines Health. ICH guideline Q3C (R6) on impurities: guideline for residual sol-

vents. EMA/CHMP/ICH/82260/2006. Committee for Human Medicinal Products, 2018.

- [6]. FERREIRA SZ, DA SILVA JB, WAQUIL SS AND CORREIA RF. Stability study of 2-[¹⁸F]Fluoruro-2-deoxy-D-glucose (¹⁸FDG) stored at room temperature by physicochemical and microbiological assays. International Nuclear Atlantic Conference - INAC. Rio de Janeiro, RJ, Brazil. September 27 -October 2, 2009. ISBN: 978-85-99141-03-8.

Recibido: 12 de enero de 2022

Aceptado: 24 de febrero de 2022

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses en la realización, ni la comunicación del presente trabajo.

CRedit / Conceptualización: Lissett Gutiérrez Hernández, Yurilma González Valdés y Aily C. Aguiar Agramonte. **Fuentes:** Lissett Gutiérrez Hernández, Yurilma González Valdés y Aily C. Aguiar Agramonte. **Curación de datos:** Lissett Gutiérrez Hernández, Yurilma González Valdés y Aily C. Aguiar Agramonte. **Software:** Lissett Gutiérrez Hernández, Yurilma González Valdés, Aily C. Aguiar Agramonte, Leonardo García Reyes, Henry Reyes Pérez, Wendy Delis Millares y Dianisleidys Gómez García. **Análisis formal:** Lissett Gutiérrez Hernández, Yurilma González Valdés y Aily C. Aguiar Agramonte. **Supervisión:** Leonardo García Reyes, Henry Reyes Pérez, Wendy Delis Millares, Dianisleidys Gómez García, Hortensia Morales Arranz, Yordanka Martínez Almaguer y Mayka Guerrero Cancio. **Adquisición de fondos:** Mayka Guerrero Cancio. **Validación:** Lissett Gutiérrez Hernández, Yurilma González Valdés y Aily C. Aguiar Agramonte. **Investigación:** Lissett Gutiérrez Hernández, Yurilma González Valdés y Aily C. Aguiar Agramonte. **Visualización:** Lissett Gutiérrez Hernández, Yurilma González Valdés y Aily C. Aguiar Agramonte. **Metodología:** Lissett Gutiérrez Hernández, Yurilma González Valdés y Aily C. Aguiar Agramonte. **Administración de proyecto:** Leonardo García Reyes y Mayka Guerrero Cancio. **Escritura – borrador original:** Lissett Gutiérrez Hernández. **Redacción: revisión y edición:** Leonardo García Reyes, Dianisleidys Gómez García, Yordanka Martínez Almaguer.