

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

**USO DE ANTIOXIDANTES EN LA FORMULACION
DE METILENDIFOSFONATO LIOFILIZADO**



Guatemala, Julio de 1994.

**PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central**

**JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

DECANA	LICDA. CLEMENCIA DEL PILAR GALVEZ DE AVILA
SECRETARIO	LIC. JOSE FRANCISCO MONTERROSO SALINAS
VOCAL I	LIC. MIGUEL ANGEL HERRERA GALVEZ
VOCAL II	LIC. GERARDO LEONEL ARROYO CATALAN
VOCAL III	LIC. MIGUEL ORLANDO GARZA SAGASTUME
VOCAL IV	Br. JORGE LUIS GALINDO AREVALO
VOCAL V	Br. EDGAR ANTONIO GARCIA DEL POZO

**JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

DECANA	LICDA. CLEMENCIA DEL PILAR GALVEZ DE AVILA
SECRETARIO	LIC. JOSE FRANCISCO MONTERROSO SALINAS
VOCAL I	LIC. MIGUEL ANGEL HERRERA GALVEZ
VOCAL II	LIC. GERARDO LEONEL ARROYO CATALAN
VOCAL III	LIC. MIGUEL ORLANDO GARZA SAGASTUME
VOCAL IV	Br. JORGE LUIS GALINDO AREVALO
VOCAL V	Br. EDGAR ANTONIO GARCIA DEL POZO

DEDICO ESTE ACTO

- A DIOS** Esencia de todo el Universo.
- A MIS PADRES** Anibal Juárez López y
Dra. Irma Yolanda Pernillo de Juárez
Por el amor, el estímulo y la dedicación que me
brindaron y por el esfuerzo de ambos que hizo
posible mi superación.
- A MIS HERMANOS** Julio Roberto, Sergio Fernando y Jorge Rodrigo
- A MI ABUELA** Carlota López vda. de Juárez, por sus poemas.
- A MIS FAMILIARES** En especial a la Fam. Juárez Pineda, Fam.
Victores Pernillo, Fam. Codoñer Pernillo, y a
mi tía Martha Pernillo.
- A MI MADRINA** Licda. Clemencia Gálvez de Avila, por su
cariño incondicional y su orientación.
- EN ESPECIAL** Licda. Diana Freire de Nave por su paciencia,
colaboración y comprensión.
Licda. Lillian Raquel Irving de Aguilera por su
amistad, sus consejos y su apoyo.
Licda. Vivian Gillet Scheel por su amistad.
- A MIS AMIGOS** Carlos Alvarado, Luis Emilio Morales, Karol
Izquierdo, Rolando Santizo, Norma Bautista,
Yani Echeverría, Pablo Palomo, Jeanneth Gramajo
Silvia Chávez, Eva Arango, Edmundo Dominguez y
Jorge Luis Hidalgo.

DEDICO ESTA TESIS

A mi patria Guatemala

Al Instituto Normal Centro America

A la Universidad de San Carlos de Guatemala

A mi Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

AGRADECIMIENTOS

A la Licda. Diana Yolanda Freire de Nave por su amistad, paciencia, colaboración, conocimientos científicos y asesoría en la realización de la tesis.

Al Lic. Federico Nave por las acertadas recomendaciones en la revisión de la tesis.

A la Dirección General de Energía Nuclear.

A la Licda. Claudia Quintero por su ayuda.

A los técnicos del laboratorio de Radiofarmacia Fabiano y Mauricio Telón.

INDICE

	TEMA	PAGINA
I.	RESUMEN.....	1
II.	INTRODUCCION.....	3
III.	ANTECEDENTES.....	5
IV.	JUSTIFICACION.....	32
V.	OBJETIVOS.....	33
VI.	HIPOTESIS.....	34
VII.	MATERIALES Y METODOS.....	35
VIII.	RESULTADOS.....	44
IX.	DISCUSION DE RESULTADOS.....	46
X.	CONCLUSIONES.....	49
XI.	RECOMENDACIONES.....	50
XII.	REFERENCIAS.....	51
XIII.	ANEXOS.....	55

I. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de investigación es incorporar el uso de agentes antioxidantes como el Acido Ascórbico y el Acido Gentísico, en la formulación de Metilendifosfonato sódico manufacturado en la Dirección General de Energía Nuclear, para aumentar su estabilidad y prolongar su vida útil, debido a que dicho radiofármaco es muy costoso. Para ello se realizaron pruebas de envejecimiento acelerado, almacenando los radiofármacos con diferentes antioxidantes, a cuatro temperaturas diferentes, (4°C, 25°C, 37°C y 45°C), durante tres meses.

La respuesta se evaluó en base al porcentaje de marcación del Tecnecio 99 metaestable (^{99m}Tc), con los tres radiofármacos, con los diferentes antioxidantes.

Los resultados obtenidos muestran porcentajes de marcación del radionucléido ^{99m}Tc con el Metilendifosfonato sódico (MDP), arriba de 98%. También muestran leves variaciones en dichos porcentajes, que van de 98% a 99.9%, en las tres diferentes formulaciones del MDP, a las cuatro temperaturas y a través de los tres meses que duró el estudio, lo que demuestra que no existe diferencia entre el radiofármaco control, y las formulaciones que incluyen ácido ascórbico y ácido gentísico como agentes antioxidantes.

Se observa también que a 45°C hay una leve elevación en el porcentaje de marcación, lo que indica que a dicha temperatura el

MDP es estable por tres meses, información que puede ser muy importante para las condiciones de almacenamiento y transporte.

Se recomienda que se realicen pruebas de envejecimiento acelerado, prolongando el tiempo de estudio, y de envejecimiento no acelerado, para determinar la cinética de degradación del MDP, ya que durante los tres meses que duró el presente estudio, el MDP liofilizado con y sin antioxidante, permaneció estable.

II. INTRODUCCION

Desde la fecha del descubrimiento del radio hasta nuestros días, los radioisótopos incorporados a medicamentos o radiofármacos tienen cada vez mayores aplicaciones médicas, tanto en el diagnóstico y terapéutica como en la investigación.

Los radiofármacos se usan en Medicina de dos modos diferentes: como fuentes de radiación y como trazadores radiactivos. Como fuentes de radiación, los radiofármacos se administran con propósito terapéutico e irradian tejidos internos del organismo. Como trazadores radiactivos, se administran para diferenciar una bioquímica, fisiología o anatomía anormal de la normal.

En Guatemala, actualmente se cuenta con un Laboratorio de Radiofarmacia Centralizada, ubicado en la Dirección General de Energía Nuclear, en donde se producen diferentes radiofármacos con distintas aplicaciones, entre los que sobresale el Metilendifosfato sódico (MDP) marcado con Tecnecio 99m (^{99m}Tc), que es un radiofármaco de tipo trazador, usado para obtener imágenes óseas principalmente, ya que tiene una gran facilidad para ser fijado a los cristales de hidroxapatita de los huesos. Como a todos los radiofármacos marcados con ^{99m}Tc , se le incorpora un agente reductor como Cloruro estannoso (SnCl_2), para reducir el Tc^{+7} a Tc^{+4} que es la forma activa. Pero el SnCl_2 es muy susceptible a la oxidación, que puede evitarse incluyendo agentes antioxidantes como el ácido ascórbico y el ácido gentísico en la formulación del

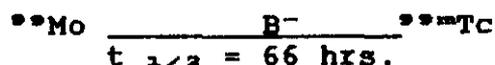
radiofármaco. Dicho radiofármaco es muy utilizado actualmente, y su precio es muy elevado por lo que se pretende, mediante la incorporación de los agentes antioxidantes ya mencionados mejorar la estabilidad del Metilendifosfonato (MDP) liofilizado, aumentando así su vida útil.

III. ANTECEDENTES

A. Radionucleido Tecnecio 99m (^{99m}Tc)

1. Características físicas del ^{99m}Tc:

- a. El periodo de semidesintegración es de 6.04 horas.
- b. El modo de decaimiento por transición isomérica.
- c. Su energía de radiación gamma: es de 140 Kev.
- d. Se obtiene a partir de producto de fisión de ²³⁵U de



Su periodo de semidesintegración de 6.04 horas y la ausencia de emisión beta permite la administración de cantidades del orden de milicuries (mCi), sin que ésto signifique una dosis de radiación significativa para el paciente. Por decaimiento pasa a ^{99m}Tc que es un emisor beta que no tiene un periodo de semidesintegración muy largo, de 2.12×10^6 años (1 mCi de ^{99m}Tc, corresponde a $3,3 \times 10^{-6}$ mCi de ⁹⁹Tc). Sus fotones gamma de 140 kev, presentan una adecuada penetración de los tejidos, pueden ser detectados con alta eficiencia con detectores de NaI (TI) Ioduro de sodio y facilitan la obtención de imágenes centellográficas con una buena resolución utilizando colimadores de bajo espesor (1).

Todas estas características, son la razón de que un alto porcentaje de los radiofármacos utilizados actualmente en Medicina Nuclear, son compuestos marcados con ^{99m}Tc, ya que sus propiedades

son altamente favorables en aplicaciones clínicas tanto en la obtención de imágenes como para estudios dinámicos (2,3).

Otra gran ventaja que presenta el ^{99m}Tc es que puede ser obtenido fácilmente a nivel de los servicios de Medicina Nuclear en forma estéril, libre de pirógenos y sin portador, por elución de generadores de $^{99}\text{Mo}-^{99m}\text{Tc}$ (3).

2. Características Químicas del ^{99}Tc

El tecnecio es el elemento número 43 de la tabla periódica, es un metal de la segunda serie de transición, perteneciente al grupo VII B. Se encuentra ubicado entre los elementos Mn (Primera serie) y Re (Tercera serie), presentando propiedades comunes con ellos, especialmente con el Re (4).

Todos los nucleidos del Tc son radiactivos, con periodos de semidesintegración desde 5 segundos (^{102}Tc) hasta 2.3×10^6 años (^{97}Tc). Toda la aplicación biomédica del Tc se basa en el empleo del isótopo ^{99m}Tc (5).

Posee estados de oxidación que van de -1 a +7. Los estados inorgánicos más estables son como ión pertecnectato (TcO_4^-) con valencia +7 de dióxido de tecnecio (TcO_2) con valencia +4. Los restantes estados de oxidación son más inestables y difíciles de obtener, presentándose principalmente bajo forma de complejos de coordinación (6).

B. Equipo para radiofármacos con ^{99m}Tc :

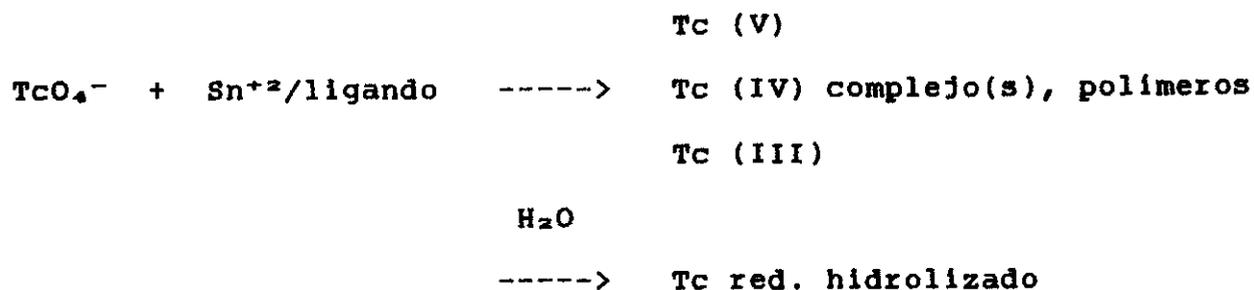
1. Química básica

La materia prima para la preparación de radiofármacos de ^{99m}Tc es el ^{99m}Tc pertecnectato obtenido de generadores de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, y las sales básicas para preparar y producir el equipo. Las especificaciones del pertecnetato ^{99m}Tc obtenido mediante diferentes procesos, son descritos en muchas farmacopeas, como la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), Farmacopea Británica (BF), Farmacopea Europea (EP), y en otros documentos. La pureza química y radioquímica del pertecnectato ^{99m}Tc puede tener una influencia directa en las reacciones de marcación. Variaciones en la calidad de pertecnectato ^{99m}Tc proveniente de diferentes fuentes fue un problema encontrado algunas veces hace una década. Este ha sido superado con los generadores de ^{99m}Tc de hoy. De cualquier modo, la compatibilidad de ^{99m}Tc de diferentes fuentes para la marcación de equipos, no puede presuponerse, y debe de probarse su compatibilidad con los diferentes equipos (7).

En esencia, la preparación de radiofármacos con ^{99m}Tc es una formación compleja de un ligando específico con ^{99m}Tc , el Tc con un estado de oxidación menor que +7, generalmente +4. La composición exacta y la estructura de los complejos formados no se conoce con certeza. En coloides o partículas, las especies reducidas de ^{99m}Tc están menos definidas. Dependiendo de las condiciones de reacción, en algunos sistemas de ligandos/ ^{99m}Tc , varios complejos con diferente comportamiento biológico pueden ser formados. Por tanto, en todos los procedimientos de marcación con ^{99m}Tc , el

pertecnectato es reducido con un agente reductor, generalmente cloruro estannoso (SnCl_2), seguido de la formación de un quelato, complejo estable, o un enlace a partículas apropiadas. La oxidación del SnCl_2 puede evitarse incluyendo agentes antioxidantes como el ácido ascórbico o el ácido gentísico en la formulación del radiofármaco, viéndose un mejoramiento en la eficiencia de marcación, facilidad de manejo y baja toxicidad (8).

El esquema general de reacción que tiene lugar en la preparación de compuestos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ es el siguiente:



La cantidad del ligando usada para la formación del complejo $^{99\text{m}}\text{Tc}$ es escogida de forma equimolecular y se basa en el dato de baja toxicidad.

2. Preparación del equipo

El equipo contiene, el radiofármaco sin el radionucleido de $^{99\text{m}}\text{Tc}$, estériles y preanalizados los componentes esenciales para la simple y conveniente preparación de radiofármaco en un sistema cerrado. La forma más popular de equipos está basada en la estabilización del complejo ligando estannoso por liofilización en ambiente de nitrógeno antes de una oxidación por el aire o hidrólisis. Aun cuando otras formas de equipos, como líquidos o

soluciones congeladas bajo una atmosfera inerte, han sido usadas también, los equipos liofilizados tienen la ventaja de que su vida media es larga, la confiabilidad y seguridad del procedimiento de reconstitución en una solución clara, o suspensión en el caso de coloides o partículas marcadas, adecuado para una administración parenteral. La larga vida media del equipo, del orden de los 6 meses a 1 año. La composición de los equipos para cualquier preparación particular descrita en la literatura, varia un poco con respecto a las cantidades de las sales básicas, pH y otros vehiculos (8).

C. Quelatos de ^{99m}Tc para centellografia osea

Desde la introducción del polifosfato marcado con ^{99m}Tc , en 1971, en un constante esfuerzo por encontrar mejores agentes para imagen del hueso, se ha estudiado una amplia variedad de compuestos fosforados (9).

En general, estos agentes para centellografia ósea pueden clasificarse en cuatro grupos, según el tipo de unión que presenten entre los átomos de fósforo:



(9)

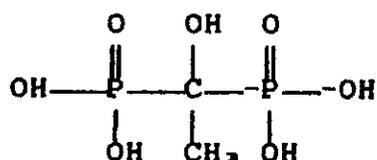
Dentro del grupo de los polifosfatos, con unión $-\text{P}-\text{O}-\text{P}$, el que presenta mayor concentración en tejido óseo es el pirofosfato (que contiene sólomente 2 átomos de P) (7).

El segundo grupo, constituido por los difosfonatos, se caracteriza por presentar una unión química más fuerte por la presencia de un átomo de C entre los dos de P. La unión P-C-P es más resistente a la hidrólisis enzimática *in vivo* que la unión P-O-P (10,11)

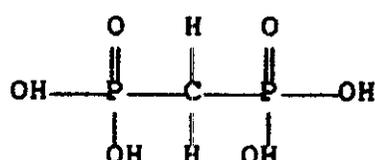
El IDP, perteneciente al tercer grupo, con unión P-N-P, presenta los más altos niveles de concentración en hueso, pero también es captado en tejido blando (11).

Los compuestos pertenecientes al cuarto grupo, son análogos de los agentes quelantes EDTA y DTPA. Estos compuestos son químicamente más estables que los restantes compuestos fosforados, pero no presentan ventajas desde el punto de vista de la captación en tejido óseo (12).

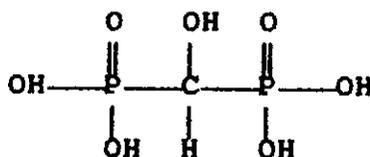
Entre los compuestos que más se usan para centellografía ósea están: etilendihidroxidifosfonato (EHDP), el metilendifosfonato (MDP), y el hidroximetilendifosfonato (HMDP) (13).



Etilendihidroxidifosfonato
(EHDP)



Metilendifosfonato
(MDP)



Hidroximetilendifosfonato
(HMDP)

1. Preparación:

Los agentes para imágenes óseas son abastecidos en viales que contienen una mezcla estéril, libre de pirógenos y liofilizada, de fosfato/fosfonato, sales estannosas (cloruro, fluoruro, tartrato, etc), bajo una atmósfera de nitrógeno. Previo a la liofilización, el pH es ajustado con HCl o NaOH.

Cuando el pertecnectato sódico ^{99m}Tc estéril y libre de pirógenos, es adicionado al vial de reacción, se forma el complejo ^{99m}Tc -estaño-fosfato/fosfonato. $^{99m}\text{Tc}(+7)$ se reduce a $^{99m}\text{Tc}(+4)$, puede complejarse con uno o más grupos de PO_3H_2^- , dependiendo de las condiciones de reacción.

2. Pureza radioquímica:

Los agentes de ^{99m}Tc para evaluación ósea, contienen ^{99m}Tc fosfato/fosfonato, ^{99m}Tc libre de pertecnectato y coloides de estaño- ^{99m}Tc como impurezas. Por medio de cromatografía en capa fina (ITLC-SG) y empleando acetona como solvente, pueden separarse las diferentes formas químicas de acuerdo a su polaridad, así el ^{99m}Tc fosfato/fosfonato y coloides de estaño- ^{99m}Tc quedan en el origen con R_f 0-0.3, mientras el pertecnectato ^{99m}Tc se mueve con el frente del disolvente R_f 1.0. Con ITLC-SG y usando NaCl 0.9% como solvente, el coloide de $^{99m}\text{Tc-Sn(II)}$ se queda mientras el complejo ^{99m}Tc fosfato/fosfonato y el ^{99m}Tc libre de pertecnectato se mueve con el frente del solvente a R_f 1.0. El compuesto deberá contener más que 90% en ^{99m}Tc fosfato/fosfonato, y menos que 10% en coloide $^{99m}\text{Tc-Sn(II)}$ o ^{99m}Tc libre de pertecnectato (13).

3. Comportamiento biológico:

a. *Localización ósea:* Seguidamente de la inyección intravenosa, el ^{99m}Tc fosfato/fosfonato es eliminado rápidamente de la sangre hacia el fluido extracelular y hacia la superficie del hueso. Por el proceso de quimiosorción el radiofármaco es fijado a los cristales de hidroxapatita de la superficie de los huesos. Aproximadamente 40-50% (50-60% para MDP) de la dosis inyectada, es distribuida en el esqueleto en 3 hrs en un sujeto normal, con el residuo excretado por el riñón.

El rastreo depende en alta medida del fluido sanguíneo; por consiguiente, si el fluido sanguíneo se ve alterado (como en un infarto óseo o en una metástasis ósea), la captación ósea se verá altamente disminuida. Un aumento de la captación del radiofármaco se da en metástasis óseas, debido al incremento de actividad celular.

b. *Infarto al miocardio:* El ^{99m}Tc fosfato/fosfonato también reacciona con los cristales de calcio mitocondriales producidos en el interior de células miocárdicas con infarto. El infarto del miocardio es mejor visualizado en 1 a 6 días después de su inicio. Los exámenes falsos negativos pueden ocurrir si la imagen es realizada, en la fase evolutiva, o muy tarde, en la fase resolutive del infarto. Exámenes positivos pueden también ocurrir seguidamente de una cirugía de desviación de arterias coronarias, en una angina de pecho inestable, infartos al miocardio anteriores, y en contusiones cardíacas.

c. Marcación de globulos rojos: Por su contenido de estaño, los agentes óseos de ^{99m}Tc tienen una afinidad por los glóbulos rojos (GR). Si el contenido de un vial frío sin marcar de fosfato/fosfonato reconstruido con solución salina es administrado por vía intravenosa, y 30 min. después, se le inyecta el pertecnectato ^{99m}Tc , el 80% de la actividad podría ser marcada a GR en 30 min después de inyectada (13).

Los ^{99m}Tc fosfato/fosfonatos son corrientemente usados para imágenes óseas, para delinear áreas de osteogénesis alterada, y para imágenes de infarto agudo de miocardio. Para imágenes óseas el pirofosfato, EHDP, MDP y HMDP son satisfactorios. El HMDP tiene la más rápida eliminación sanguínea. Para imágenes de infarto agudo del miocardio, el pirofosfato es más extensamente usado, pero algunos prefieren trabajar con MDP o HMDP.

d. Tiempo óptimo para resultado de imágenes: La exposición de radiación al paciente, puede ser reducida por una favorable absorción máxima del fluido y frecuente vaciado seguidamente a la inyección del agente óseo de ^{99m}Tc . La dosis recomendada para adultos es 20 mCi para imágenes óseas y de infarto del miocardio. Para óptimos resultados en imágenes óseas, deberá ser realizado en 2-6 horas después de la inyección, el tiempo de elevación en infarto del miocardio es máximo en 60-90 min. El infarto agudo del miocardio muestra un pico máximo en 2-3 días seguidamente del inicio de los síntomas.

e. Reconstitución y vida útil después de reconstitución: La solución de pertecnectato ^{99m}Tc que contiene agentes oxidantes no son adecuadas para usar con compuestos de fosfato/fosfonato. Sólo inyecciones de cloruro de sodio USP (sin preservantes) deberán ser usados. Los agentes óseos de ^{99m}Tc son muy sensibles al oxígeno; nada de aire deberá ser inyectado al vial durante la mezcla del radiofármaco con el TcO_4^- . La preparación deberá ser formulada dentro de un período de 6 horas antes de su uso clínico, si se practica. Si éste es inyectado muy tarde después de la formulación, puede ocurrir reoxidación y liberación de pertecnectato ^{99m}Tc libre. Esto puede ser prevenido por el uso de ácido ascórbico como antioxidante (13-20).

f. Coloides contaminantes: (descritos como coloides de $^{99m}\text{Tc-Sn}$ (II) reducidos-hidrolizados), pueden ser producidos cuando el TcO_4^- reducido forma radioquelatos con fosfato/fosfonatos. Los coloides contaminantes son captados por en el hígado y bazo cuando su proporción en compuestos de ^{99m}Tc fosfato/fosfonato es mayor que 10%. Hidrólisis, la cual produce coloides contaminantes, ocurre también por envejecimiento.

g. La humedad residual: en el vial proveniente del proceso de liofilización contribuye a la calidad variable dentro de los viales del mismo lote.

h. Radiodosimetría: dosis de radiación para huesos o imágenes cardíacas en un paciente de 70 kg, de 20 mCi de agentes óseos de ^{99m}Tc son:

Organos	Huesos	Médula Osea	Riñón	Hígado	Vejiga	Testic.	Ovarios	Todo Cuerpo
Rads/ 20mCi	0.70	0.56	0.80	0.06	2.60	0.16	0.24	0.13

i. Interacciones con cationes: Los agentes para imágenes óseas son conocidos por complejar cationes como el calcio. Deberá tenerse precaución al usarlo con paciente con predisposición a hipocalcemia (alcalosis).

j. Pruebas falso positiva o falso negativas: Un examen de huesos anterior, puede interferir con exámenes cerebrales usando ^{99m}Tc pertecnectato sódico y resultar en exámenes falsos positivos o falsos negativos. Se recomienda que exámenes cerebrales precedan a exámenes de huesos. Alternativamente puede usarse ^{99m}Tc DTPA (13-20).

D. Control de calidad de los equipos de radiofármacos

1. Controles Rutinarios

a. Controles Físicos

1. Características Organolépticas

La apariencia física de una preparación radiofarmacéutica es muy importante, ya que su alteración puede reflejar cambios que influyen en su comportamiento biológico (21).

Todo radiofármaco inyectable debe ser claro, limpio y libre de partículas visibles, excepto las suspensiones coloidales, macroagregados y microagregados de albúmina y microesferas.

ii. Determinación de actividad

Es la medida de la actividad total presente en una muestra. La unidad comúnmente empleada es el Curie (Ci) o submúltiplos, definiéndose 1 Ci como 3.7×10^{10} desintegraciones por segundo (dps) (22).

La determinación de actividad se realiza mediante el uso de equipo de detección seleccionado en base al tipo y energía de la radiación emitida, siendo práctica común el empleo de cámara de ionización para la medición de radiofármacos marcados con emisores gamma (23).

Siendo la actividad variable en función del tiempo, el resultado de tal determinación deberá acompañarse en la etiqueta de la fecha y hora de calibración, volumen total, concentración específica. Se define concentración específica o radiactiva a la relación de actividad y el volumen de solución en que está presente y se expresa en mCi/mL (24).

iii. Identidad y pureza radionucleídica:

La identificación del radionucleído en una preparación farmacéutica, es parte integral de la determinación de pureza del sistema.

Se define como la proporción de la actividad total en relación a la actividad del radionucleido con respecto a la actividad total de la muestra (25).

Las impurezas radionucleidas pueden ser resultado del proceso de producción como:

- impurezas presentes en el blanco a irradiar.
- reacciones secundarias producidas por el blanco.
- productos originados por desintegración radiactiva o por una purificación ineficiente en el proceso de separación del producto de fisión.

El control de la pureza radionucleida es importante para asegurar que la biodistribución es característica del nucleido en cuestión y no influenciada por alguna impureza y para minimizar la radiación absorbida por el paciente (26,27).

Los valores de pureza radionucléidica exigidos normalmente, se sitúan en un 90% al momento de utilización del material radiactivo (28).

iv. Tamaño y número de partículas:

Cuando un radiofármaco se presenta bajo forma farmacéutica de soluciones coloidales o de suspensiones, es necesario controlar el tamaño de micelas, a fin de verificar una distribución acorde a las especificaciones (24).

La distribución del tamaño de partículas es dependiente de la formulación y condiciones de preparación. Su evaluación en prepa-

raciones coloidales puede realizarse por filtración en gel, pasaje a través de membrana o microscopía electrónica (29).

v. pH:

El concepto y la importancia del valor del pH en radiofarmacia, está directamente relacionada con la estabilidad del producto. Si bien el valor ideal de un preparado a ser administrado por vía intravenosa es el pH sanguíneo, grandes diferencias pueden ser toleradas por los pequeños volúmenes de inyección y la gran capacidad tampón de la sangre (30).

vi. Isotonicidad:

Isotonicidad es la igualdad entre las presiones osmóticas de una solución con respecto a otra. Debido a los pequeños volúmenes de administración de los radiofármacos, no se exige que éstos sean isotónicos con los fluidos orgánicos con los que van a estar en contacto (31).

b. Controles químicos:

i. Pureza química:

Se define como la fracción de masa total presente en una forma química establecida. Puede referirse tanto a las materias primas del radionucleido y/o radiofármaco como el producto final (20).

El control del material inactivo se efectúa según especificaciones de las farmacopeas. En el caso de radionucleidos y/o radiofármacos se debe determinar en forma cuali y cuantitativa la

presencia de productos químicos (no radiactivos) que no forman parte de su composición, especialmente de aquellos posibles contaminantes tóxicos o de sustancias que alteren el comportamiento fisicoquímico y/o biológico del preparado (32).

11. Pureza radioquímica:

Pureza radioquímica de un preparado es el porcentaje de actividad del radionucleido en la forma química establecida en relación a la actividad total presente de dicho radionucleido. Y constituye un factor determinante de la reproducibilidad de un procedimiento diagnóstico, ya que si bien las impurezas radioquímicas raramente ocasionan series de reacciones tóxicas, pueden alterar la biodistribución de la preparación radiofarmacéutica (24, 29, 32).

Su determinación puede realizarse por métodos tales como precipitación, extracción por solventes, destilación, electroforesis y cromatografía, siendo los dos últimos los de elección por su versatilidad, facilidad y rapidez de realización. Cromatografía en papel, incluyendo instantánea en capa fina, son extensamente usados en el control de radiofármacos marcados con radionucleidos de corto periodo (30).

Los límites de pureza radioquímica no deben ser tratados en términos abstractos, su establecimiento depende del uso específico de la preparación radiofarmacéutica y del comportamiento biológico de las impurezas, siendo en algunos suficiente un criterio del 90% y en otros no aceptable un nivel menor al 97% (33).

c. Controles Biológicos:

i. Esterilidad:

La producción de un inyectable debe realizarse tendiendo a evitar la posible contaminación con microorganismos más que a destruirlos posteriormente (28,33).

Los métodos más utilizados en el área radiofarmacéutica, son aquellos que emplean métodos físicos tales como calor seco o húmedo, filtración e irradiación gamma, así como la realización de procedimientos asépticos, a partir de reactivos estériles (28).

El control de esterilidad se realiza según lo indicado en las diferentes farmacopeas; con volúmenes de inoculación reducidos en cada medio de cultivo (0.1 - 0.2 mL) (33).

ii. Apirogenicidad:

Los pirógenos son sustancias hipertermizantes y su ausencia en una preparación inyectable es condición necesaria si el volumen de la misma supera los 20 mL o si se utiliza una vía especial de administración (por ejemplo: intratecal). Por tanto, apirogenicidad no constituye una exigencia para la mayoría de los radiofármacos.

Debido a que una de las fuentes principales la constituyen los productos del metabolismo, el mejor recurso para prevenir contaminación por pirógenos es usar soluciones estériles recientemente preparadas, material depirogenizado (viales, jeringas, etc) y emplear una metodología aséptica de trabajo (29).

El método oficial de control de pirógenos se basa en la respuesta febril obtenida en conejos por administración de las sustancias a ensayar (24).

Existe un método in vitro para la determinación de endotoxinas bacterianas. Se basa en la gelificación del lisado de amebocitos del líquido circulante de un artrópodo, el Limulus polyphemus, en presencia de pequeñas cantidades de endotoxinas bacterianas (del orden de mg/mL) llamado Limulus test (32).

Las ventajas que ofrece este test frente al convencional en conejos son: mayor sensibilidad, rapidez y de fácil realización, así como posibilidad de determinación de pirógenos en medicamentos hiper o hipotermizantes, en productos radiactivos de corta vida. Por ello su empleo en radiofarmacia está muy generalizado (28).

2. Controles no rutinarios

a. Biodistribución en animales de experimentación

El estudio de distribución biológica de un nuevo agente diagnóstico es esencial para el establecimiento de su eficacia y utilidad. Permite investigar el comportamiento del compuesto marcado desde el momento de su administración, determinar su eficacia, así como obtener datos cuantitativos farmacocinéticos que constituyen una parte de la radiofarmacología básica, una nueva disciplina en Medicina Nuclear (29).

El objetivo de esta evaluación preclínica es estimar cuál será la potencial utilidad diagnóstica en humanos, a partir de los resultados obtenidos en un modelo animal. Por tanto, es evidente

que la elección del modelo es de gran importancia. Diferencias entre especies, anatómicas y/o funcionales, pueden interferir en las etapas de absorción, distribución, metabolismo, excreción y/o interacción del compuesto marcado con el receptor (29).

Las técnicas empleadas pueden ser no invasivas o invasivas. En el primer caso, se procede de forma similar a la de un estudio en humanos, previa sedación o anestesia. Presenta la ventaja de brindar un resultado clínico (visualización o no del área de interés); disminuir el costo del experimento por utilización de un mismo animal a diferentes tiempos postinyección; determinar curva de actividad versus tiempo en regiones específicas si se posee instrumentación computarizada (34).

Las técnicas invasivas involucran el sacrificio del animal a tiempos variables post administración del compuesto marcado y medida de la radiactividad en órganos y tejidos disectados o autorradiografía de cuerpo entero. El método de muerte puede ser físico (desnucamiento) o químico (sobredosis de anestésico) (31).

La medida de radiactividad en las partes disectadas debe ser precedida de una toma de muestras representativa y de un tratamiento (no siempre necesario), que permita un control adecuado (31).

La utilidad del estudio de biodistribución en animales de experimentación, no se limita a la etapa de investigación y desarrollo. Constituye un control de rutina para centros de producción de juegos de reactivos; contribuye a la determinación de la vida útil de los mismos, ya que muchas veces, técnicas fisicoquímicas conven-

cionales no son capaces de detectar degradación de estos precursores, especialmente en etapas tempranas de descomposición; representan un control de pureza radioquímica si las impurezas poseen una biodistribución diferente a la del radiofármaco reportada inicialmente (35).

b. Atoxicidad:

Ausencia de sustancias que por su acción directa o indirecta sobre un órgano o sistema, o sobre un tejido pueden producir alteraciones que resulten nocivas para el paciente. Por ejemplo, cuando se administra un radiofármaco se pueden producir efectos tóxicos en el paciente, como consecuencias de variaciones en la cantidad de drogas utilizadas en la preparación del mismo o por la introducción accidental de sustancias ajenas a su composición.

El control de toxicidad se realiza en las etapas de investigación, previa a la liberación de un radiofármaco y se determina generalmente sólo la dosis letal 50 (DL-50). Esta se define como la dosis expresada en masa que inyectada a un lote de ratones, mata el 50% de los animales. Se expresa en mg/kg de peso. Una vez establecida la DL-50 se debe establecer un factor de seguridad (DL-50/dosis a administrar en un humano) que será tenido en cuenta cuando se determina la formulación de un radiofármaco (36).

3. Control de condiciones ambientales:

Periódicamente deberán inspeccionarse las áreas de trabajo desde el punto de vista microbiológico y polvo en suspensión, principalmente en aquellos lugares destinados a la preparación de materiales estériles, verificándose la efectividad de los filtros (37).

En el caso de campanas de flujo laminar y/o laboratorios asépticos, deberá controlarse la velocidad de intercambio de aire de acuerdo a las especificaciones que correspondan en cada paso (35).

Controles diarios de posibles contaminaciones radiactivas se realizarán en superficies de trabajo, ropas y equipo, registrándose las situaciones anormales, así como los procedimientos de descontaminación (37).

4. Control de equipo:

El uso de un calibrador de dosis para medir la actividad de un radiofármaco que se administra a un paciente en un procedimiento de Medicina Nuclear, es en sí mismo, un componente de garantía de calidad, que influye en la protección del paciente. El funcionamiento incorrecto de un calibrador de dosis, conduce a la administración de dosis diferentes a las establecidas para cada estudio (36).

Los procedimientos más importantes para efectuar el control periódico, son:

- a. La verificación diaria del nivel de fondo de radiación.
- b. La exactitud y precisión de la actividad para todos los radionucleidos de uso corriente.
- c. Calibración con una fuente patrón de Cs^{137} (Cesio)

d. La linealidad de la respuesta (trimestral).

Las calibraciones periódicas y trimestrales que se realicen, deben registrarse en planillas especiales que se archivarán, de esta manera se podrá apreciar variaciones mínimas, comparando con las calibraciones efectuadas anteriormente (38).

E. Estabilidad acelerada de los radiofármacos

Para decidir respecto al tipo de control de estabilidad a desarrollar, es preciso tener en cuenta que las pruebas aceleradas tienen sus limitaciones derivadas de las propiedades físicas y químicas de las drogas y de las características de las formas farmacéuticas (12).

Estas pruebas se hacen para determinar el efecto del calor, aire, humedad y luz. Ocurre a veces que el deterioro de un producto no se produce en forma lógica o químicamente explicable. En tal caso, resulta difícil o imposible determinar el orden de la reacción que se produce y por ende, la aplicación cinética para determinar el periodo de vigencia. Se acude entonces a métodos empíricos que sirven sólo de orientación y por lo tanto, los resultados sólo pueden aplicarse con sentido provisorio. Por ejemplo, someter las muestras (en cantidad suficiente para permitir su control periódico), durante algunos meses a temperatura constante (12).

La humedad desempeña una función importante sobre la estabilidad de las formas sólidas y su conservación en los envases (12).

En este caso, el agua que aparece, posiblemente por el almacenamiento en una atmósfera húmeda, se adhiere a la superficie sólida de la muestra. Hay poca dificultad para determinar este tipo de agua.

El secado por calentamiento es el método más antiguo para la determinación del agua, a primera vista el más simple. Sin embargo, es un proceso altamente complejo y se corre el riesgo de la pérdida de otros materiales volátiles (39).

Incluso con sus limitaciones, el método de Karl Fischer es el más empleado para la determinación en productos farmacéuticos, tiene gran especificidad por el agua, buena precisión y para la clase de compuestos que es aplicable, un alto grado de exactitud (39).

El lugar o ambiente en que serán controladas las muestras deberá regularse a una temperatura definida; además contendrá un peso determinado de agua en forma de vapor. Estos dos criterios caracterizan y permiten dar valor a la humedad relativa del aire. Generalmente el problema de la humedad se trata en relación a la temperatura. Ambas condiciones se pueden variar según los autores (12).

Las que se usan con más frecuencia son las que siguen:

Temperatura	Humedad
45°C	95% H.R
40°C	90% H.R.
37°C	65% H.R.
20°C	65% H.R.

Los resultados se valoran a los 8 días en un primer examen y después cada 8 días en los dos primeros casos; al cabo de un mes en los otros tres. También se recomienda efectuar un examen organoléptico todos los días durante la primera semana (12).

Las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) también establecen requisitos relacionados con la fecha de expiración del producto final y los ensayos de estabilidad. Cada producto es único en términos de las propiedades físicas y químicas de sus ingredientes activos y excipientes, porcedimientos de manufactura, formulaciones, sistema de envase y cierre, condiciones de almacenaje y la estabilidad del producto para mantener su calidad o pureza (40).

Las BPM recomiendan para llevar a cabo las pruebas de estudios acelerados los siguientes requerimientos:

1. El propósito de estudios acelerados es evaluar la degradación cinética, no para determinar uniformidad.
2. El análisis de un lote puede ser aceptable para establecer fechas de expiración tentativas.
3. Se requiere datos de estabilidad de por lo menos 3 meses a 37°C-40°C y 75% o más de humedad relativa para justificar una fecha tentativa de dos años.
4. Los estudios acelerados deben ser seguidos por estudios controlados a temperaturas y condiciones ambientales. La combinación de ambos puede justificar una fecha de expiración de más de dos años.
5. No es razonable hacer estudios acelerados a temperaturas altas por tiempos limitados para justificar una fecha de expiración

prolongada, ya que los mecanismos de degradación a temperaturas altas son diferentes a los que ocurren a temperaturas ambientales.

6. Las condiciones de almacenaje (temperatura y humedad relativa) deben ser definidas y registradas.
7. Los análisis de estabilidad deben hacerse en el mismo sistema de envase/cierre utilizado en la distribución y venta del producto.

La administración de drogas y alimentos (FDA) establece que los estudios de estabilidad en las drogas son necesarias cuando no hay disponible adecuada información sobre la estabilidad de las mismas, ya sea proveniente de estudios anteriores o de la bibliografía. El programa para el estudio de estabilidad incluye almacenamiento a temperatura ambiente y bajo condiciones aceleradas (41).

Las condiciones de estabilidad acelerada ordinariamente incluyen diferentes temperaturas (por ejemplo: 5°C, 50°C y 75°C); humedad, donde sea apropiado (por ejemplo: 75% o mayor), y la exposición a varias longitudes de onda de radiaciones electromagnéticas.

Es importante detectar, aislar e identificar los productos de degradación. Los productos de degradación deberán ser cuantificados para establecer las reacciones cinéticas, cuando sea practicable (41).

El estudio acelerado de las drogas se utiliza para identificar problemas de potencia que pudieran encontrarse durante el al-

macenamiento y transporte y para proveer una estimación de la fecha de expiración (41).

F. Principios de la cinética de degradación

La cinética de reacción o de las reacciones es el estudio de la velocidad de los cambios químicos y la forma en que dicha velocidad depende de condiciones de concentración de reactivos, productos y otras especies químicas que puedan estar presentes, de factores como solvente y temperatura.

La velocidad de una reacción es aquella a la que uno o más reactivos experimentan cambios químicos. El término orden de reacción química indica la forma en que la concentración de un reactivo o varios influye en la velocidad de una reacción química (42).

1. *Reacciones de orden cero.* Cuando la velocidad de reacción es independiente de la concentración de la sustancia reactiva. En este tipo de reacción, el factor limitante no es la concentración, sino por ejemplo, solubilidad o reacciones fotoquímicas (43).

2. *Reacciones de primer orden.* Cuando la velocidad de reacción depende de la primera potencia de la concentración de un reactivo, se le considera de primer orden. En este tipo de reacción, la sustancia se descompone directamente en uno o más productos (43).

3. *Reacciones de segundo orden.* Si la velocidad de reacción depende de la concentración de dos reactivos, será de segundo orden (43).

4. *Reacciones de pseudo-primer orden.* Se puede definir como de segundo orden o reacción bimolecular que se comporta como reacción de primer orden. Esta se encuentra en el caso en que un reactivo

está presente en exceso o se mantiene a una concentración constante comparada con el otro reactivo. Es estas circunstancias, la velocidad de reacción se determina por un reactivo, a pesar de que dos están presentes, ya que el segundo reactivo no exhibe un cambio significativo en su concentración durante la reacción de degradación (43).

5. Reacciones de tercer orden. Una reacción de tercer orden es aquella en la cual la velocidad de reacción determinada experimentalmente es proporcional a la concentración de cada uno de tres reactivos o de uno de dos reactivos y la segunda potencia de la concentración del otro, o la tercera potencia de la concentración de un solo reactivo. Las reacciones de tercer orden son muy raras (42).

Para que la velocidad de degradación sea útil en la formulación de productos farmacéuticos, es necesario evaluar la dependencia de la temperatura en la reacción. Esto permite la predicción de la estabilidad del producto a temperatura ordinaria de almacenamiento con base en datos obtenidos por pruebas realizadas bajo condiciones exageradas. De acuerdo a las reglas, la velocidad de reacción se duplica por cada diez grados de aumento en la temperatura, aunque no es generalmente aplicable. El procedimiento que se recomienda es elaborar un plan de pruebas aceleradas para cada formulación para poder asegurar la dependencia de la temperatura de los cambios químicos en el producto que se está evaluando.

El método más satisfactorio para expresar la influencia de la temperatura en la velocidad de reacción es la relación cuantitativa propuesta por Arrhenius:

$$k = Se^{-Ha/RT} \quad (\text{formula 1})$$

donde k = velocidad de degradación

R = constante de los gases

T = temperatura absoluta

S = factor de frecuencia

La constante de integración en la ecuación de Arrhenius se ha designado como factor de frecuencia. Este valor es la medida de la frecuencia de colisiones que pueden esperarse entre las moléculas de una reacción en específico. Logarítmicamente se puede expresar de la manera siguiente:

$$\ln k = -Ha/RT + \ln S \quad (\text{fórmula 2})$$

Ya que la mayoría de preparaciones farmacéuticas son complejas, la reacción de degradación puede ser complicada por posible interacción de varios ingredientes en la formulación. Se vuelve impráctico y usualmente innecesario desarrollar estudios de cinética profundos en la formulación final para obtener una fecha de vencimiento estimada del producto. Usualmente es suficiente seguir la degradación o alguna propiedad de la degradación como una función del tiempo a elevadas temperaturas; se usan las expresiones ya establecidas de cinética para luego extrapolar los datos a las condiciones de almacenamiento adecuadas y obtener la fecha estimada de expiración del producto en estudio (43).

IV. JUSTIFICACION

En Guatemala, en el Departamento de Radiofarmacia Centralizada de la Dirección General de Energía Nuclear (DGEN), se vienen produciendo Radiofármacos desde 1985; en un inicio, en forma líquida, y a partir de 1987 se inició con la liofilización de doce diferentes radiofármacos; mediante este trabajo de investigación, se pretende incorporar el uso de agentes antioxidantes en la formulación de uno de ellos, el Metilendifosfonato de Sodio (MDP), para aumentar su estabilidad y mejorar de esta manera el servicio al usuario, de esta manera se podrá continuar el estudio de la reformulación de los otros radiofármacos con estos agentes antioxidantes.

Se seleccionó este Radiofármaco para iniciar el estudio de agentes antioxidantes debido a que la materia prima es sumamente onerosa por lo que se hace necesario aumentar su estabilidad; además éste es el Radiofármaco de elección utilizado en Medicina Nuclear en la obtención de imágenes óseas para el diagnóstico de metástasis, osteomielitis, celulitis, necrosis, etc.

Aproximadamente el 40% de los exámenes que se realizan en el Departamento de Medicina Nuclear del Hospital General San Juan de Dios, son centellogramas óseos que utilizan este radiofármaco.

V. OBJETIVOS

A. GENERAL

Contribuir con el Departamento de Radiofarmacia de la Dirección General de Energía Nuclear al introducir un agente antioxidante en la formulación de Metilendifosfonato de sodio liofilizado, que utiliza cloruro estannoso como agente reductor del radionucleido con el que se marca, para aumentar la estabilidad de dicho radiofármaco.

B. ESPECIFICOS

1. Introducir ácido ascórbico y ácido gentísico como agentes antioxidantes, en la formulación de radiofármacos con Metilendifosfonato de sodio (MDP) liofilizado.
2. Comprobar su estabilidad frente a MDP sin agente antioxidante, mediante pruebas de estabilidad acelerada.

VI. HIPOTESIS

El uso de ácido ascórbico y ácido gentísico como agentes antioxidantes en la formulación del Metilendifosfonado sódico (MDP), mejoran su estabilidad.

VII. MATERIALES Y METODOS

A. UNIVERSO DE TRABAJO:

1. Un lote de dieciseis unidades de MDP liofilizado, para el control.
2. Un lote de dieciseis unidades de MDP liofilizado, conteniendo ácido ascórbico como antioxidante.
3. Un lote de dieciseis unidades de MDP liofilizado, conteniendo ácido gentísico como antioxidante.

B. MEDIOS:

1. RECURSOS HUMANOS:

Responsable: Br. Claudia Deyanira Juárez Pernillo

Asesor: Licda. Diana Yolanda Freire de Nave.

2. RECURSOS INSTITUCIONALES:

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Radiofarmacia Centralizada de la DGEN, con el apoyo de Profesionales y Técnicos.

a. Equipo:

Liofilizadora marca Lab-Conco (cap. para 300 fcos)

Autoclave marca Handyclave Rexall 23cm x 40cm L

Hornos marca Lab-Line

Balanza analítica marca Precisa

Campana de flujo laminar horizontal marca

Lab-Conco

Medidor de pH marca Fisher

Refrigeradora

Contador tipo poso de centelleo sólido marca

Ortec

Calibrador de dosis de centelleo gaseoso marca

Ortec

Incubadora

b. Materiales:

Pipetas volumétricas

Frascos de vidrio de borosilicato tipo I de 10 mL

Tapones para liofilizar

Arandelas de aluminio

Selladora de viales

Filtros de 0.22 μm (micrómetros)

Papel cromatográfico para cromatografía en capa

fina instantánea (ITLC)

Cubetas cromatográficas

Pinzas

Lápiz graso

c. Reactivos:

Metilendifosfonato sódico
Cloruro estannoso dihidratado
Acido clorhidrico
Hidroxido de sodio
Agua para inyección
Acido ascórbico
Acido gentísico
Generador de ⁹⁹Molibdeno-^{99m}Tecnecio
(⁹⁹Mo-^{99m}Tc)
Acetona
Cloruro de sodio 0.9%

C. PROCEDIMIENTOS:

1. FORMULACIONES DE LOS RADIOFARMACOS:

a. Formulación del radiofármaco control:

Tamaño del lote: 100 viales (100 mL de solución)

Los reactivos químicos utilizados, deben llenar las especificaciones de la USP XXII.

Preparación de las soluciones stock: Estas soluciones deben ser preparadas antes de preparar el equipo.

Solución de cloruro de estaño 8% (w/v): 400 mg de cloruro de estaño dihidratado se disuelve en 0.5 mL de HCl concentrado y calentado si es necesario para obtener una solución clara. El volumen final debe ser llevado a 5mL con agua para inyección.

Control en-proceso: Por Análisis Fotométrico:

Preparar las siguientes soluciones:

- i. Solución de molibdato de sodio (0.1 mg Mo/ml).
21.46 mg de Na_2MoO_4 p.a. en 100 mL de agua destilada.
- ii. Solución de tiocianato de potasio 1.5 M:
14.5776 g de KSCN en 100 mL de agua.
- iii. Solución estándar de Sn(II) (1mg Sn(II)/mL):
190.1 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ p.a. en 100 mL de HCl 0.2N.
- iv. Acido Clorhídrico (HCl) 3M:
128 mL de HCl conc. (36%) diluido a 500 mL con agua destilada.
- v. Muestra:
Disolver en contenido de un vial del equipo a analizar en 5 mL de solución salina.
- vi. Solución blanco:
Combinar 3.5 mL de HCl 3M, 0.5 mL de solución de Na_2MoO_4 y 0.5 mL de solución KSCN 1.5M, ajuste el volumen a 5 mL con agua destilada.

Procedimiento: combinar 3.5 mL de HCl 3M, 0.5 mL de solución de Na_2MoO_4 , 0.5 mL de solución KSCN 1.5M y 0.5 mL de muestra, ó 5, 10, 15, 20 y 25 μm de solución estándar de Sn(II) para obtener la curva estándar, ajustar el volumen a 5 mL con agua destilada. Agitar hasta que la solución se torne anaranjada. Después de 15 minutos, registrar la desaparición del color a 460nm (cubeta de 1 cm) comparado con la solución blanco.

Solución de hidróxido de sodio 2N:

Pesar rápidamente 2g de hidróxido de sodio y disolver en 25 mL de agua para inyección.

PREPARACION DEL EQUIPO:

- i. Disolver 500 mg de MDP en aproximadamente 80 mL de agua para inyección. La solución de hidróxido de sodio 2N se agregará para obtener una solución clara, si es necesario.
- ii. Agregar 0.62 mL de solución de cloruro de estaño gota a gota.
- iii. Ajustar el pH de la solución alrededor de 6 ó 7 por adición de gotas de solución de hidróxido de sodio 2N.
- iv. Ajustar el volumen final a 110 mL con agua para inyección.
- v. Esterilizar la solución por filtración.
- vi. Dispensar en cantidades de 1 mL la solución filtrada dentro de viales esterilizados y tapar con tapones de hule esterilizados y secos.
- vii. Transferir los viales a una liofilizadora y liofilizarlos por 24 horas (condiciones: -40°C y $10\ \mu\text{m}$ de vacío).
- viii. Sellar los viales bajo vacío o bajo una atmósfera de nitrógeno seco.
- ix. Almacenar los viales a $2-10^{\circ}\text{C}$, con la siguiente etiqueta:

Equipo para $^{99\text{m}}\text{Tc}$ MDP inyección

Clave: Código: Cons. No.

5 mg MDP

0.5 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Almacenar a $2-10^{\circ}\text{C}$

Fecha de expiración:

x. Documentar adecuadamente los detalles de la historia completa del lote en un libro. Mantener el lote en cuarentena hasta que se los ensayos analíticos y biológicos, y el lote sea declarado adecuado para uso en humanos.

b. Formulación del Radiofármaco con ácido ascórbico:

El tamaño del batch, las especificaciones de los reactivos y la preparación de las soluciones stock son las mismas que para el Radiofármaco control.

PREPARACION DEL EQUIPO:

i. Disolver 500 mg de MDP y 50 mg de ácido ascórbico en aproximadamente 80 mL de agua para inyección. Agregar la solución de hidróxido de sodio para obtener una solución clara si es necesario.

La preparación se sigue igual a los pasos de ii a viii, y x, de la formulación del radiofármaco control.

ix. Almacenar los viales a 2-10°C, con la siguiente etiqueta:

Equipo para ^{99m}Tc MDP inyección

Clave: Código: Cons.No

5 mg MDP

0.5 mg de ácido ascórbico

0.5 mg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Almacenar a 2-10°C

Fecha de expiración:

c. Formulación del Radiofármaco con ácido gentísico:

El tamaño del lote, las especificaciones de los reactivos y la preparación de las soluciones stock son las mismas que para el radiofármaco control.

PREPARACION DEL EQUIPO:

1. Disolver 500 mg de MDP y 50 mg de ácido gentísico en aproximadamente 80 mL de agua para inyección. Agregar la solución de hidróxido de sodio para obtener una solución clara si es necesario.

La preparación se sigue igual a los pasos de ii a viii y el x, de la formulación del radiofármaco control.

- ix. Almacenar los viales a 2-10°C, con la siguiente etiqueta:

Equipo para ^{99m}Tc MDP inyección

Clave: Código: Cons.No

5 mg MDP

0.5 mg de ácido gentísico

0.5 mg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Almacenar a 2-10°C

Fecha de expiración:

b. ALMACENAMIENTO:

Como se dijo anteriormente, se realizó un lote de dieciseis unidades de MDP control, un lote de dieciseis unidades de MDP con ácido ascórbico y un lote de dieciseis unidades de MDP con ácido gentísico. Cada lote se dividió en cuatro grupos de cuatro unidades cada uno, y se nombró cada grupo como a, b, c y d, que

representan respectivamente los tiempos de cero, uno, dos y tres meses de almacenamiento . Se almacenó, cada unidad de cada grupo (a, b, c y d), del MDPcontrol, MDP con Acido Ascórbico y MDP con ácido gentísico, a cuatro temperaturas diferentes, que fueron: T1 = 4°C, T2 = 25°C, T3 = 37°C y T4 = 45°C, y se distribuyeron de la siguiente forma:

T I E M P O	MDP Control				MDP con Ac. Asc.				MDP con Ac. Gent.			
	T1 4°C	T2 25°C	T3 37°C	T4 45°C	T1 4°C	T2 25°C	T3 37°C	T4 45°C	T1 4°C	T2 25°C	T3 37°C	T4 45°C
a	a1	a2	a3	a4	a1	a2	a3	a4	a1	a2	a3	a4
b	b1	b2	b3	b4	b1	b2	b3	b4	b1	b2	b3	b4
c	c1	c2	c3	c4	c1	c2	c3	c4	c1	c2	c3	c4
d	d1	d2	d3	d4	d1	d2	d3	d4	d1	d2	d3	d4

D. ANALISIS DE RESULTADOS:

1. DISEÑO EXPERIMENTAL:

El diseño experimental consistió en un Diseño Factorial

3 x 4 x 4

a. Factores:

A. Radiofármacos: Niveles: 1.- Control

2.- Ac. Ascórbico

3.- Ac. Gentísico

B. Temperatura: Niveles: 1.- 4°C
2.- 25°C
3.- 37°C
4.- 45°C

C.- Tiempo: Niveles: 1.- 0 mes
2.- 1 mes
3.- 2 meses
4.- 3 meses

b. *Respuesta:* Se determinará el % de marcación del radioisótopo.

2. ANALISIS ESTADISTICO:

Se utilizó Estadística Descriptiva para analizar los datos obtenidos, mediante gráficas donde se interrelacionaron los tres diferentes radiofármacos (Control, Acido Ascórbico y Acido Gentisico), con los cuatro diferentes tiempos (0, 1, 2 y 3 meses), a las cuatro diferentes temperaturas (4°C, 25°C, 37°C y 45°C).

VIII. RESULTADOS

En la tabla No.1 se observan los resultados del porcentaje de marcación, obtenidos por los tres diferentes radiofarmacos (Control, Acido Ascórbico y Acido Gentisico), a cuatro diferentes tiempos (0, 1, 2 y 3 meses) y a cuatro diferentes temperaturas (4°C, 25°C, 37°C y 45°C), donde se observa que dicho porcentaje de marcación es muy elevado para todos los casos (entre 98 y 99.9% de marcación), y que se encuentra en los límites permitidos por la Farmacopea Nacional Argentina, en su sección de Radiofármacos (44), y que entre sus valores no existe diferencia.

Se observa también que al promediar los tres radiofármacos a cada uno de los cuatro tiempos y a las cuatro temperaturas, el resultado es muy elevado, dando valores de 98.3 % a 99.9%.

En la tabla No.2 se presenta la relación de los promedios de los tres radiofármacos en los cuatro tiempos, respecto a la temperatura, y se observa que en los tres radiofármacos, dichos valores sobrepasan el 99%, exceptuando al radiofármaco con ácido ascórbico a 25°C observándose una variación mínima en los porcentajes.

En la tabla No.3 se presenta la relación de los promedios de los tres radiofármacos en las cuatro temperaturas, respecto al tiempo. Se observa que en el radiofármaco control todos los porcentajes están arriba del 99.3% exceptuando al tiempo de 2 meses donde presenta una leve disminución a 98.715%. En los radiofármacos con ácido ascórbico y con ácido gentisico, los porcentajes están

arriba del 99.2%, exceptuando al segundo mes donde presentan también una leve disminución a 98.673% y 98.655% respectivamente. Los promedios de los tres radiofármacos a cada uno de los cuatro diferentes tiempos, no muestran variación sus valores.

La tabla No.4 muestra una relación tiempo/temperatura. Se promediaron los valores de los tres radiofármacos, correspondiendo a cada tiempo una temperatura; los porcentajes mantuvieron la homogenidad en sus valores, pero se observa la misma disminución leve a 98%, en los valores del segundo mes, en las temperaturas de 4°C, 25°C y 37°C, únicamente el porcentaje a 45°C se mantuvo arriba de 99% (99.163%). Los promedios totales de las cuatro temperaturas a cada uno de los tiempos, muestran una leve variación en sus valores, ya que se mantienen entre 98.6% a 99.6%.

IX. DISCUSION DE RESULTADOS

Al analizar los porcentajes de marcación del radiofármaco control, el radiofármaco con ácido ascórbico y el radiofármaco con ácido gentísico se observa que fueron superiores al 98% en los tres casos, como se observa en la gráfica No.1 lo cual es aceptable, ya que en la Farmacopea Argentina se reporta que el porcentaje de marcación es aceptable siempre y cuando contenga no menos de 90% y no más de 110% de la cantidad de ^{99m}Tc como quelato, expresado en becquerel o millicuries en la fecha y hora indicados (44).

Al realizar las pruebas aceleradas para determinar el efecto del tiempo en los porcentajes de marcación de los radiofármacos se observó que inmediatamente después de su producción o sea en el tiempo 0, y a 1, 2 y 3 meses después, el porcentaje de marcación fue superior al 99% en la unión del fármaco con el radionucléido. Se encontró un ligero descenso de dicho porcentaje a 98% en el segundo mes, el cual no es significativo, lo cual pudo deberse a que en esa oportunidad el Contador Gamma de Centelleo de Pozo presentó problemas en su componente electrónico, disminuyendo su eficiencia de conteo (gráfica 2).

Al efectuar la comparación entre el radiofármaco control y los radiofármacos con ácido ascórbico y ácido gentísico a los diferentes tiempos, se observó que los porcentajes eran superiores al 98%, repitiéndose el fenómeno descrito anteriormente, al segundo mes, consistente en una disminución del porcentaje de marcación de 99.618% a 98.715 en el Metilendifosfonato (MDP) control, de 99.205%

a 98.673% en el MDP con ácido ascórbico y de 99.553% a 98.655% en el MDP con ácido gentísico, los cuales volvieron a subir en el tercer mes a 99.693%, 99.875 y 99.202% respectivamente; se piensa que ésto es debido a problemas en el equipo, descritos en el párrafo anterior, debido a que el procedimiento, materiales y recurso humano fue el mismo (ver tabla No.3 y gráfica No.3).

Al estudiar el efecto de la temperatura en los porcentajes de marcación, se observó que todos fueron superiores al 99% a 4°C, 25°C y 37°C, encontrándose porcentajes ligeramente mayores a 45°C, lo que puede ser debido a que a esta temperatura, el porcentaje de humedad disminuye, estos resultados son de gran importancia ya que proveen información sobre su almacenamiento, el cual no es tan rígido como se pensaba, y como no se produce degradación del fármaco por la acción de la temperatura, puede ser un dato de gran importancia para cuando se deba transportar, importar o comercializar (ver tabla No.4 y gráfica No.4).

Al comparar los radiofármacos a diferentes temperaturas, se observa que el porcentaje de marcación es siempre superior al 98.5% ocurriendo el mismo comportamiento anteriormente descrito: a 45°C el porcentaje de marcación es mayor a 99% en los tres casos, probablemente por la poca humedad a esta temperatura, como se indicó anteriormente (gráfica No.5)

Al hacer el estudio de la relación del tiempo y la temperatura en el porcentaje de marcación, en todos los casos se encontraron porcentajes de marcación superiores a 98%, de donde se observa que a 45°C se obtiene un mejor porcentaje de marcación a través del

tiempo, pero este fenómeno ya se discutió anteriormente (ver gráfica No. 6).

Al comparar los porcentajes de marcación de los radiofármacos Control, con ácido ascórbico y con ácido gentísico, a través del tiempo y la temperatura se observa que sus valores difieren ligeramente unos de otros y no son diferentes, por lo que se rechaza la hipótesis planteada.

X. CONCLUSIONES

- A. Utilizando Metilendifosfonato con agentes antioxidantes y compararlos al Metilendifosfonato control, se obtienen porcentajes de marcación superiores al 98%.

- B. Se observa que se obtiene un porcentaje de marcación semejante en los tres radiofármacos, durante los tres meses que duró el estudio, como los valores de los porcentajes de marcación no muestran marcada diferencia, se rechaza la hipótesis planteada.

- C. El porcentaje de marcación se mantiene a las diferentes temperaturas de estudio (4°C, 25°C, 37°C y 45°C), observándose un incremento en dicho porcentaje a los 45°C, lo que da una nueva perspectiva en las indicaciones de almacenamiento, que en algún momento facilitaría la forma de transportarlo por largas distancias, ya que los resultados indican que el MDP es estable por tres meses, a temperaturas de 45°C, inclusive.

XI. RECOMENDACIONES

- A. Realizar análisis de porcentaje de humedad de las muestras, ya que la humedad es importante en la estabilidad del radiofármaco.
- B. Hacer Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de los diferentes radiofármacos, para determinar posibles fracciones como subproductos de degradación.
- C. Prolongar por más tiempo el estudio, ya que se observa estabilidad por tres meses, en condiciones de envejecimiento acelerado, pero no se pudo estudiar la cinética de degradación, porque el producto no envejeció en el lapso de tres meses de estudio.
- D. Hacer un análisis de estabilidad no acelerada, para estudiar el proceso de envejecimiento del metilendifosfonato sódico, en condiciones normales.

IX. REFERENCIAS

1. Noto MG, et al. Química Descriptiva. Buenos Aires: Latinoamericana, 1971. X + 612p. (p.64-66).
2. Mitta AE. La Radiofarmacia en la República de Argentina. J. Marp Soc Arg Bioq Med Nucl 1981;5:145-148.
3. Pliego OH, et al. Equipo para extracción de $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$. Buenos Aires: Comisión Nacional de Energía Atómica, Doc. Tec. No.460, 1980. 12p. (p.9).
4. Saucedo T, et al. Concentración de Tecnecio 99m del eluido del Generador de ^{99}Mo - ^{99m}Tc . Buenos Aires: Comisión Nacional de Energía Atómica, Doc. Tec. No. 45, 1976. 269p. (p,34-37).
5. Steigman J, et al. Chemistry of Technetium 99m. Sem Nucl Med 1974; 4:269-279.
6. Colombetti LG. Performance of ^{99m}Tc generatin systems. p.183-194. (In Rhodes BA. Quality Control in Nuclear Medicine. Saint Lois: The CV Mosty Company, 1977. XII + 508p.).
7. Perez R, et al. A new Radiopharmaceutical for ^{99m}Tc bone scanning. J Nucl Med 1972;13;783.
8. Johannsen B, Narasimhan DVS. Preparation of kitss for ^{99m}Tc radiopharmaceuticals. Austria: International Atomic Energy Agency, Doc. Tec. No. 649, 1992. 94p. (p.7-9,31-32,50-51).
9. Subramanian G, et al. ^{99m}Tc -polyphosphate: A new Radiopharmaceutical for skeletal Imaging. J Nucl Med 1971:12:399.
10. Alazraki N, et al. Assessment of skin ulcer healing lapability by technetium 99m phosphonate angiogram and blood-pool images. J Nucl Med 1985;26:586-591.
11. Krish Numurthy GT, et al. Kinetien of ^{99m}Tc -labelled pirophosphate and poliphosphate in man. J Nucl Med 1975;16:109-115.
12. Helman J. Farmacotecnia Teorica y Práctica. Tomo VII. México: Compañia Editorial Continental, S.A., 1981. (p.2331)
13. Hossain L, et al. Comparation of ^{18}F , ^{67}Ga and ^{99m}Tc -Labelled polyphosphate, diphosphate and pyrophosphate for bone scanning. J Nucl Med 1973;14:410.
14. Trent P, et al. Practical Nuclear Pharmacy. 3 ed. Hawaii: Banyan Press, 1981. (p.49-53)

15. Bassett LW, et al. Radionuclide bone imaging. Radiol Clin North Amer 1981;19:675.
16. Bevan JA, et al. ^{99m}Tc hydromymethylene diphosphonate HMDP: a new skeletal imaging agent. Radiopharmaceuticals II, New York: Society of Nuclear Medicine, 1979).
17. Davis MA, Jones AG. Comparison of ^{99m}Tc labeled phosphate and phasphonate agentes for skeletal imaging. Sem Nucl Med 6:1976 :19.
18. Pavel DG, et al. In vivo labeling of red blood cells with ^{99m}Tc. J Nucl Med 18:1977:305.
19. Subramanian G, et al. ^{99m}Tc methylene diphosphonate, a superior agent for skeletal imaging: comparison with other ^{99m}Tc complexes. J Nucl Med 16:1975:744.
20. Subramanian G, et al. Evaluation of ^{99m}Tc labeled phosphate compounds as bone agents. Radiopharmaceuticals New York: Society of Nuclear Medicine, 1975)
21. Nicolín JO, Radicella R. Radioisótopos y sus formas farmacéuticas. 2163-2208. (En Helman J. Farmacotecnia Teórica y Práctica. México: Continental. Vol. 7, 1981. (p.2331).
22. Notto MY, et al. Control de calidad de los radiofármacos. Act Biog Clin L ar 1979;12:69.
23. Beck RN, Harper PV. Criterios for evaluatin radioisotope imaging systems. p.348-384. (In Gottschal K, Beck RN. Funda-
mention problems in scanning. E.E.U.U.: Apring field, 1969, IX + 542p.).
24. Verdera ES. Control de calidad en radiofarmacia. J Nucl Med 1983;15;183.
25. Kristensen K. The Quality of radiopharmaceuticals: A review of corrent problem XIII International. Annual Muting Society of Nucl Med Denmark 1975;15:134-136.
26. Rodriguez S, et al. Handbook of radiofarmaceutical Quality Control. Montevideo: Latinoamerican Association of nuclear Biology Medicine Societies. (Alasbism), Doc. Tec. 1989. 154p. (p.13-23).
27. Pauwels E, Feitsma R. Radiochemical Quality Control of ^{99m}Tc labeled Radiopharmaceuticals. Eur J Nucl Med. 1977;2:97-103.
28. Bruch CW. Levels of sterility: Probabilities of survivors vrs biological indicators, developments in industrial microbiology. Bullet of the parent drug assoc 1976;14(13):105-121.

29. Mclean JR, et al. Analytical techniques for the determination of radiochemical purity of radiopharmaceuticals prepared from kits. Canada, Ottawa: Department of National Health and welfare, Doc. Tec. No. 1. 1977, 189 p. (p.89).
30. Eckelman WC, Levenson SM. Radiochemical purity of ^{99m}Tc radiopharmaceuticals. *Appl Radiol Nucl Med* 1977;6:211-214.
31. Zimmer AM, Pavel DG. Rapid miniaturized chromatographic quality-control produces for ^{99m}Tc radiopharmaceutical. *J Nucl Med* 1977;18:1230-1233.
32. Loberg MD. Radioisotopes. *Int J Appl Radiat* 1978;29:167.
33. Hesslewood SR. Quality control procedures for ^{99m}Tc -complexes *J Nucl Med* 1981;20:3-6.
34. Vivian A, et al. Procedure Manual Radiochemical purity of radiopharmaceuticals. *J Nucl Med* 1975;16:510-517.
35. Lovegrone F, et al. Quality control in Nuclear Medicine procedures. *J Nucl Med* 1974;2:44-45.
36. Rollo PD. Nuclear Medicine physics, instrumentation and agents. Saint Louis: The CV Mosby Company, 1977;X+689p. (p.322-324).
37. Servian JL. Report of an International Atomic Energy Agency. Meeting on Quality Control of Radiopharmaceuticals. *Int. J of Appl Rad an Isot* 1977;28:653-658.
38. Manual de Controles Radiofarmaceuticos. Santiago de Chile: Comisión Chilena de Energía Nuclear, 1981. 182p. (32-49).
39. Johnson C. Apuntes sobre Determinación de la Humedad y su significado en la Práctica Farmacéutica. *Advances in Pharmaceutical sciences* 1967. (p.1-19).
40. Santich I. Buenas Practicas de Manufactura. Inspección y Auditoría. Curso Teórico-Práctico. Vol I. Organización Panamericana de la Salud. Oficina Registros de la Organización Mundial de la Salud (OMS).
41. Guideline for Submitting Documentation for the Stability of Human Drugs and Biologics. Food and Drug Administration (FDA), Department of Health and Human Services. February 1987. 56pp.
42. Martin R. Remington's Pharmaceutical Sciences. 17th Ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company 1985. (p.615-676)

43. Lachman L, et al. The Teory and Practice of Industrial Pharmacy
2nd Ed. USA: Prentice-Hall, 1976.
44. Farmacopea Nacional Argentina. Codex Medicamentarius Argentino.
Suplemento 1982. Sexta edición. Buenos Aires: Imprenta Central
del Ministerio de Salud Pública y Medio Ambiente. 1983. (p.54).

XIII. ANEXOS

TABLA No. 1
PORCENTAJES DE MARCACION DE LOS RADIOFARMACOS
Relación Radiofarmaco-Temperatura-Tiempo

TEMPERATURA TIEMPO	CUATRO				VEINTICINCO				TREINTISIETE				CUARENTICINCO				Promed Total
	Cero	Uno	Dos	Tres	Cero	Uno	Dos	Tres	Cero	Uno	Dos	Tres	Cero	Uno	Dos	Tres	
Control	99.180	99.990	97.860	99.870	99.600	99.610	98.610	99.270	99.230	99.050	98.900	99.930	99.840	99.820	99.490	99.700	99.372
A. Ascorbico	99.900	99.610	99.680	98.860	99.190	99.410	98.160	99.990	99.070	98.690	98.680	99.840	99.940	99.110	99.170	99.900	99.257
A. Gentisico	99.850	99.950	99.090	97.320	99.410	99.730	98.390	99.750	99.210	99.400	98.310	99.940	99.970	99.130	98.830	99.800	99.255
Promedio Total	99.643	99.850	98.543	99.017	99.067	99.583	98.387	99.640	99.170	99.047	98.630	99.903	99.917	99.353	99.163	99.800	99.295

TABLA No. 2
PROMEDIOS DEL PORCENTAJE DE MARCACION DE LOS RADIOFARMACOS
 Relación Radiofármaco-Temperatura

TEMPERATURA	Cuatro	Veinticinco	Treintisiete	Cuarenticinco	Promedios
Control	99.225	99.272	99.277	99.713	99.372
A. Ascorbico	99.512	99.915	99.070	99.530	99.257
A. Gentisico	99.053	99.320	99.215	99.432	99.255
Promedios Totales	99.263	99.169	98.188	99.558	99.295

TABLA No. 3
PROMEDIOS DEL PORCENTAJE DE MARCACION DE LOS RADIOFARMACOS
 Relación Radiofármaco-Tiempo

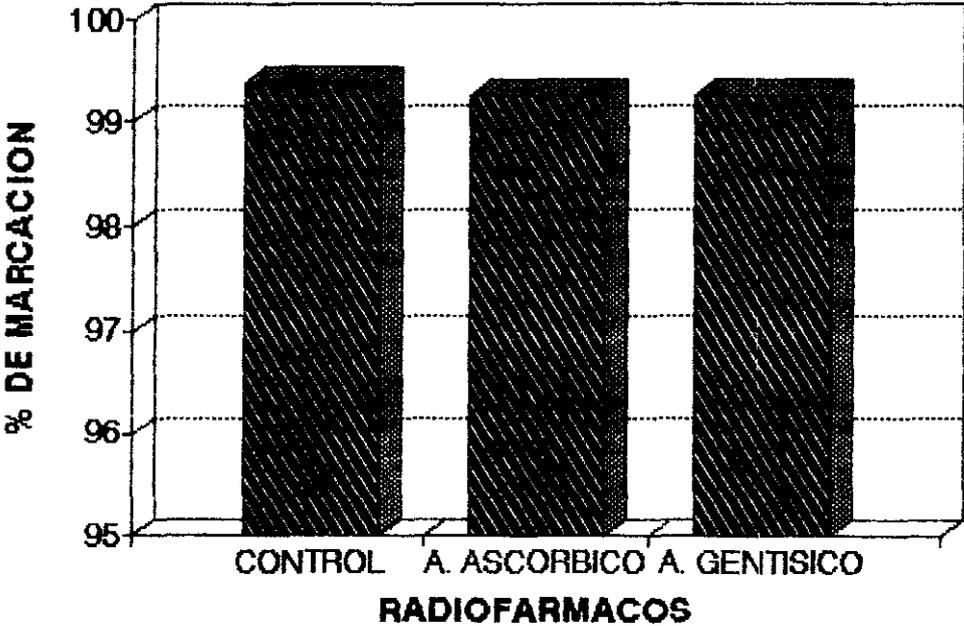
TIEMPO	Cero	Uno	Dos	Tres	Totales
Control	99.463	99.618	99.715	99.699	99.372
A. Ascorbico	99.275	99.205	99.673	99.875	99.257
A. Gentisico	99.610	99.553	99.655	99.202	99.255
Promedios Totales	99.449	99.458	98.681	99.590	99.295

TABLA No. 4
PROMEDIOS DEL PORCENTAJE DE MARCACION DE LOS RADIOFARMACOS
Relación Temperatura-Tiempo

TIEMPO	Cero	Uno	Dos	Tres	Promedios
Cuatro	99.643	99.850	98.543	99.017	99.263
Veinticinco	99.057	99.583	98.387	99.640	99.159
Treintisiet	99.170	99.047	98.630	99.903	99.188
Cuarenticin	99.917	99.353	99.163	99.800	99.553
Promedios Totales	99.449	99.458	98.681	99.590	99.295

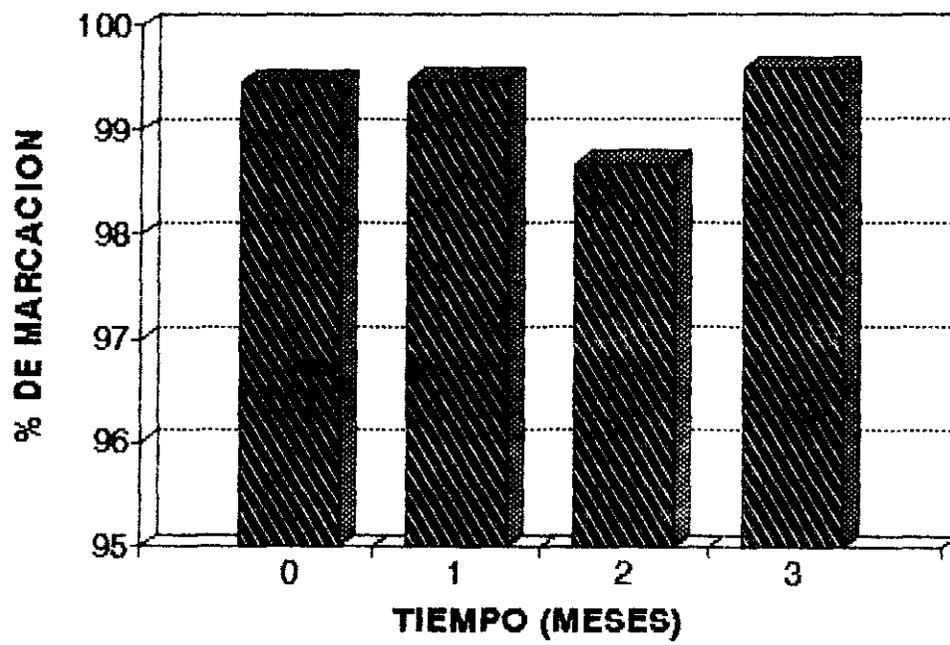
GRAFICA No. 1

PORCENTAJES DE MARCACION DE LOS TRES RADIOFARMACOS ENSAYADOS



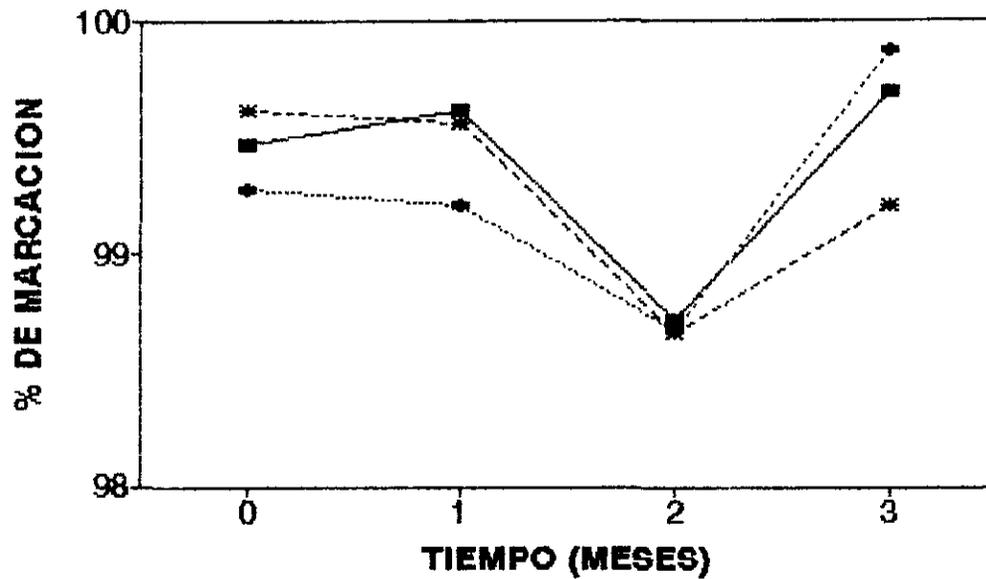
GRAFICA No. 2

EFFECTO DEL TIEMPO EN LOS PORCENTAJES DE MARCACION



GRAFICA No. 3

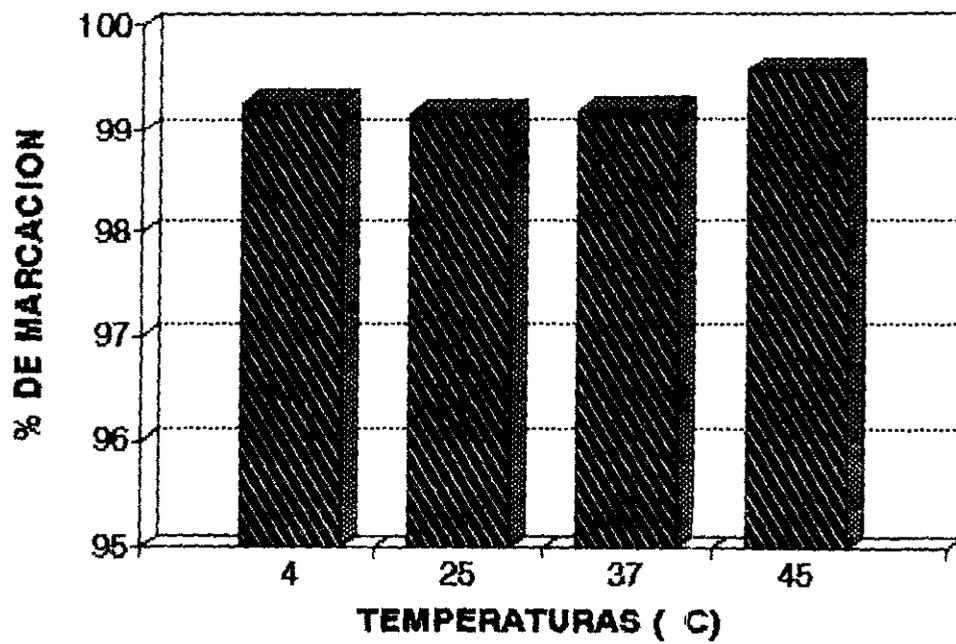
COMPARACION DE LOS RADIOFARMACOS A DIFERENTES TIEMPOS



—■— CONTROL ···◆··· A. ASCORBICO - - * - - A. GENTISICO

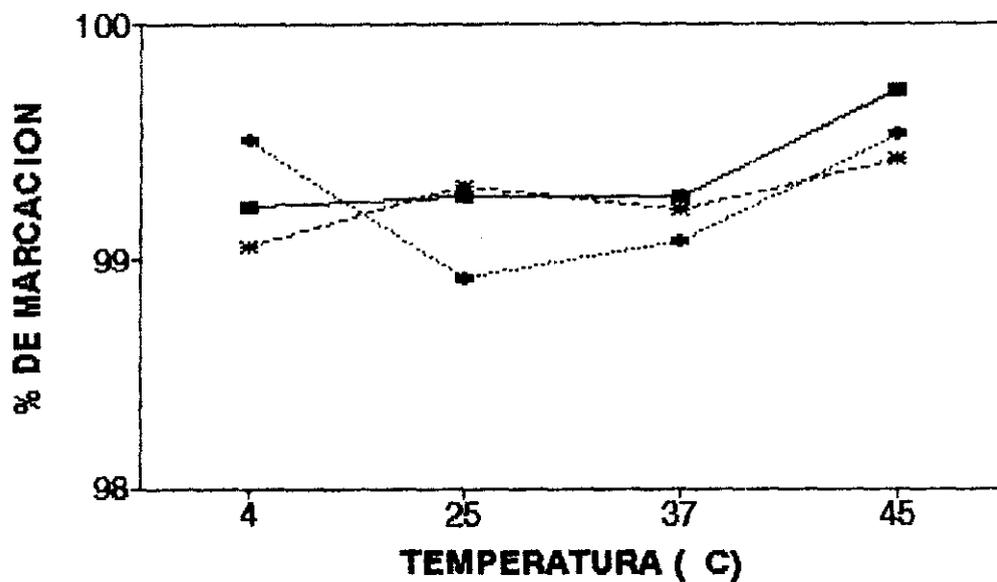
GRAFICA No. 4

EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LOS PORCENTAJES DE MARCACION



GRAFICA No. 5

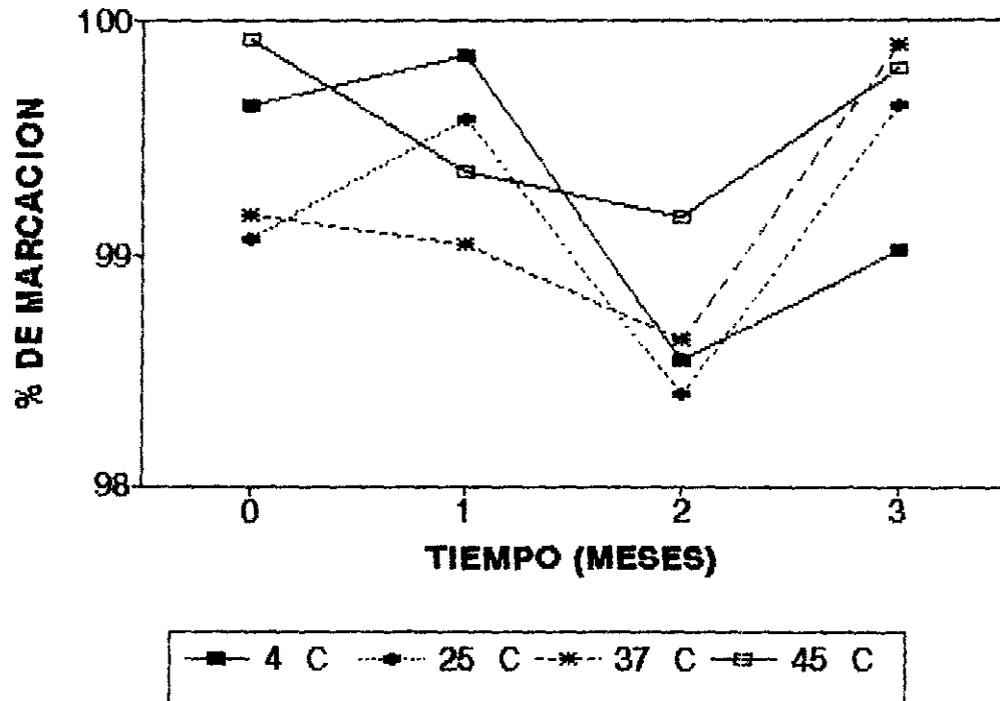
COMPARACION DE LOS RADIOFARMACOS A DIFERENTES TEMPERATURAS

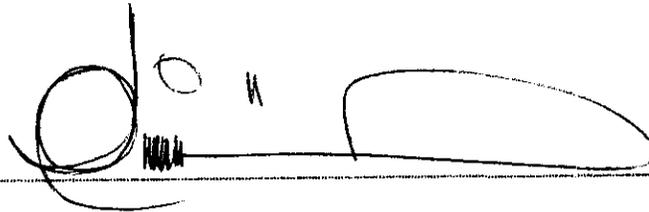


—■— CONTROL ···◆··· A. ASCORBICO -*- A. GENTISICO

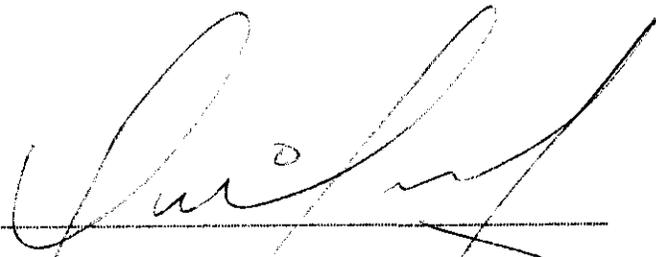
GRAFICA No. 6

RELACION DEL TIEMPO Y TEMPERATURA EN EL PORCENTAJE DE MARCACION

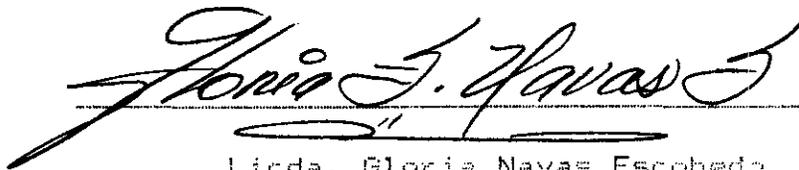




Claudia Deyanira Juárez Pernillo
Autora



Licda. Diana Freire de Nave
Asesora



Licda. Gloria Navas Escobedo
Directora Escuela de Química Farmacéutica.



Licda. Clemencia Gálvez de Avila
Decana

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUAYAMA
Biblioteca Central