

**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS**  
**Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais**

**AMANDA DE PAULA OLIVEIRA**

**SÍNTESE, DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS**  
**ANALÍTICAS PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DO RADIOFÁRMACO**

**<sup>18</sup>F PSMA – 1007**

**BELO HORIZONTE**

**2022**

**AMANDA DE PAULA OLIVEIRA**

**SÍNTESE, DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS  
ANALÍTICAS PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DO RADIOFÁRMACO  
<sup>18</sup>F PSMA – 1007**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Ildelfonso Binatti

Coorientadora: Dra. Marina Bicalho Silveira

BELO HORIZONTE

2022

Oliveira, Amanda de Paula.  
O48s Síntese, desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para o controle de qualidade do radiofármaco  $^{18}\text{F}$  PSMA - 1007 / Amanda de Paula Oliveira. – 2022.  
118 f. : il.  
Orientador: Ildfonso Binatti.  
Coorientadora: Marina Bicalho Silveira.

Dissertação (mestrado) – Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2022.  
Bibliografia.

1. Radiofármacos. 2. Medicina nuclear. 3. Próstata - Câncer. 4. Fluordesoxiglucose F18. 5. Antígeno prostático específico. I. Binatti, Ildfonso. II. Silveira, Marina Bicalho. III. Título.

CDD: 615.8424

**AMANDA DE PAULA OLIVEIRA**

**SÍNTESE, DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS  
ANALÍTICAS PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DO RADIOFÁRMACO  
<sup>18</sup>F PSMA – 1007**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química.

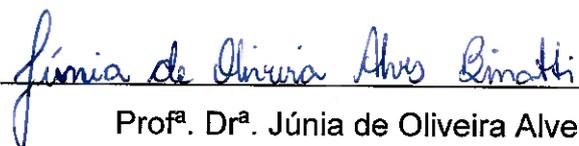
Belo Horizonte, 20 de julho de 2022.

Aprovada pela Banca Examinadora:



---

Prof. Dr. Ildfonso Binatti (Orientador)



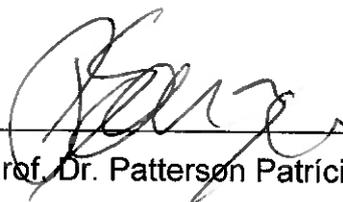
---

Profª. Drª. Júnia de Oliveira Alves Binatti



---

Profª. Drª. Patrícia Sueli de Rezende



---

Prof. Dr. Patterson Patrício de Souza

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela graça em cumprir mais essa etapa.

Ao meu orientador, professor Ildelfonso Binatti, pela paciência, apoio, dedicação e todo ensinamento. Agradeço o empenho em finalizarmos esse trabalho, por acreditar em mim e me incentivar a ser melhor.

A coorientadora, Marina Bicalho, pelo apoio, dedicação e por nos receber para execução prática desse trabalho no CDTN.

Aos colaboradores do CDTN, Leonardo, Ana Clara, Cassiano, Nelson e Zacarias que contribuíram para execução prática desse trabalho.

Aos professores do CEFET-MG, em especial aos professores do Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Química, que contribuíram para o cumprimento dessa etapa.

Aos meus pais, familiares e amigos que me apoiaram e incentivaram em cada momento.

## RESUMO

O câncer de próstata é o segundo tipo de câncer mais comum entre os homens, se detectado precocemente a taxa de cura é de quase 100%. Nos últimos anos a medicina nuclear tornou-se uma ferramenta importante no diagnóstico e estadiamento do câncer de próstata, utilizando técnicas como a Tomografia por Emissão de Pósitrons e Tomografia Computadorizada (do inglês *Positron Emission Tomography and Computed Tomography*, PET/CT). O uso da tomografia PET permite mapear a distribuição de emissores de pósitrons administrados ao paciente, possibilitando o diagnóstico precoce de alterações fisiológicas. Para isso, é necessário que seja administrado ao paciente um radiofármaco cujo radionuclídeo que o constitui seja um emissor de pósitrons. O radiofármaco Antígeno de Membrana Específico da Próstata marcado com  $^{18}\text{F}$  (do inglês *Prostate Specific Membrane Antigen  $^{18}\text{F}$  PSMA-1007*), cujo radionuclídeo emissor de pósitrons é o  $^{18}\text{F}$ , tornou-se um alvo viável para imagens de próstata. A intensidade do acúmulo de  $^{18}\text{F}$  PSMA-1007 em tumores da próstata correlaciona-se positivamente com outras formas de avaliação e detecção do câncer de próstata, tornando o diagnóstico mais assertivo. O  $^{18}\text{F}$  PSMA-1007 pode ser obtido por uma reação de substituição nucleofílica, em que o  $^{18}\text{F}$  reage com um precursor. Seu uso como preparação farmacêutica requer que sejam realizados testes de controle de qualidade, que atendam às Boas Práticas de Fabricação estabelecidas pelo órgão regulador, no Brasil a ANVISA.

Visando a implementação da produção e comercialização desse radiofármaco no CDTN, buscou-se estabelecer a síntese para esse produto e desenvolver metodologias analíticas para seu controle de qualidade.

Foi implementado um procedimento de síntese do radiofármaco  $^{18}\text{F}$  PSMA-1007 no equipamento TRACERlab FX viável e capaz de ser executado segundo as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Desenvolveu-se e validou-se metodologias analíticas para atestar que o produto cumpre com as especificações do controle de qualidade. As metodologias analíticas desenvolvidas neste trabalho em relação a outras metodologias já descritas, apresentam com principal vantagem o menor tempo de execução das análises, reduzindo custos e possibilitando que o radiofármaco tenha sua qualidade atestada e seja liberado para uso em pacientes em menor intervalo de tempo.

Palavras – chave: radiofármaco, medicina nuclear, próstata, flúor-18, PSMA

## **ABSTRACT**

Prostate cancer is the second most common type of cancer among men. If early detected, the healing rate is almost 100%. Lately, nuclear medicine has become an important tool in the diagnosis and staging of prostate cancer, by using techniques such as Positron Emission Tomography and Computed Tomography (PET/CT). The use of PET tomography allows mapping the distribution of positron emitters administered to the patient, enabling early diagnosis of physiological changes. For that, it must be administered to a radiopharmaceutical whose radionuclide that constitutes it is a positron emitter. The radiopharmaceutical  $^{18}\text{F}$  PSMA-1007 ( $^{18}\text{F}$ -labeled Prostate Specific Membrane Antigen), whose positron-emitting radionuclide is  $^{18}\text{F}$ , has become a viable target for prostate imaging. The intensity of the accumulation of  $^{18}\text{F}$  PSMA-1007 in prostate tumors is positively correlated with other ways of evaluating and detecting prostate cancer, making the diagnosis more assertive.  $^{18}\text{F}$  PSMA-1007 can be obtained by a nucleophilic substitution reaction, where  $^{18}\text{F}$  reacts with a precursor. Its use as a pharmaceutical preparation requires that quality control tests are carried out, which comply with the Good Manufacturing Practices established by the regulatory body, in Brazil, ANVISA.

Aiming the implementation of the production and commercialization of this radiopharmaceutical in the CDTN, an attempt was made to establish the synthesis for this product and to develop analytical methodologies for its quality control.

A procedure for the synthesis of the radiopharmaceutical  $^{18}\text{F}$  PSMA-1007 was implemented in the TRACERlab FX equipment, viable and capable of being performed according to the Good Manufacturing Practices of Medicines. Analytical methodologies were developed and validated to certify that the product complies with the quality control specifications. The analytical methodologies developed in this work in relation to other methodologies already described, have the main advantage of the shorter execution time of the analyses, allowing the radiopharmaceutical to have its quality attested and to be released for use in patients in a shorter period.

**Keywords:** radiopharmaceutical, nuclear medicine, prostate, fluor-18, PSMA

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estruturas do sistema reprodutor masculino.....	19
Figura 2 - Zonas da próstata .....	20
Figura 3 - Estruturas química da testosterona e da 5- $\alpha$ - diidrotestosterona.....	21
Figura 4 - A Próstata em tamanho normal sem obstrução do canal da uretra. B Próstata aumentada causando obstrução da uretra. ....	23
Figura 5 - Molécula de $^{18}\text{F}$ fluorodesoxiglicose .....	27
Figura 6 - Representação da estrutura do PSMA-1007 .....	28
Figura 7 - (a) Estrutura do $^{18}\text{F}$ -DCFBC; (b) Estrutura do $^{18}\text{F}$ -DCFPyL e (c) $^{18}\text{F}$ -PSMA-1007 .....	30
Figura 8 -Regiões de captação de $^{18}\text{F}$ -PSMA-1007 em pacientes com câncer de próstata .....	31
Figura 9 - Mecanismo da reação entre o precursor e o ânion fluoreto levando a obtenção de $^{18}\text{F}$ PSMA.....	32
Figura 10 - Módulo de síntese TracerLab Mx.....	43
Figura 11 - Célula quente .....	43
Figura 12 - Desenho esquemático do módulo de síntese TracerLab Mx .....	44
Figura 13 - Aplicação de padrões e amostra para avaliação de pureza química .....	46
Figura 14 - Impurezas conhecidas para $^{18}\text{F}$ PSMA-1007.....	47
Figura 15 - Esquema para preparação das soluções utilizadas para avaliação da linearidade nos métodos de pureza radioquímica e determinação de solventes .....	50
Figura 16 - Resultados obtidos para teste realizado com método farmacopeico .....	58
Figura 17 - Resultados obtidos para a aplicação de 1,0 $\mu\text{L}$ de padrão 260 g/L + 1,0 $\mu\text{L}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ / aplicação de 1,0 $\mu\text{L}$ de amostra + 1,0 $\mu\text{L}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ .....	59
Figura 18 - Resultados obtidos para aplicação de 1,0 $\mu\text{L}$ de amostra + 1,0 $\mu\text{L}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ / aplicação de 1,0 $\mu\text{L}$ de amostra contaminada com padrão + 1,0 $\mu\text{L}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ / aplicação de 1,0 $\mu\text{L}$ de padrão + 1,0 $\mu\text{L}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ .....	60
Figura 19 - Aplicação de 1 $\mu\text{L}$ de matriz, 1 $\mu\text{L}$ de padrão 260 g/L, 1 $\mu\text{L}$ de amostra e 1 $\mu\text{L}$ de amostra + padrão .....	60
Figura 20 - Aplicação de padrão de TBA em diferentes concentrações para avaliação de LD.....	61
Figura 21 - Injeções de padrão e amostra conforme metodologia farmacopeica. Em (b) o cromatograma superior corresponde ao detector ultravioleta a 225 nm e o inferior, ao de radioatividade .....	62

Figura 22 - Cromatograma obtido da injeção dos padrões de impureza C, impureza D e PSMA-1007.....	63
Figura 23 - Cromatograma obtido da amostra do produto 18F PSMA-1007. Cromatograma superior corresponde ao detector ultravioleta a 225 nm e o inferior, ao de radioatividade.....	64
Figura 24 - Gráfico gerado para os dados de linearidade do método de avaliação de pureza radioquímica.....	65
Figura 25 - Gráfico para avaliação de outlier.....	68
Figura 26 - Gráfico de probabilidade normal para avaliação de normalidade de dados .....	69
Figura 27 - Gráfico de resíduos x valores preditos para avaliação de homocedasticidade .....	69
Figura 28 - Gráfico de resíduos x ordem de coleta dos dados para avaliação de independência.....	70
Figura 29 - Cromatograma obtido com o registro de gradiente de fase móvel.....	70
Figura 30 - Cromatograma obtido com a injeção de diluente .....	71
Figura 31 - Cromatograma obtido com a injeção de solução matriz .....	71
Figura 32 - Cromatograma obtido em detector ultravioleta a 225 nm com a solução padrão de PSMA-1007 10 g/L preparada em diluente .....	73
Figura 33 - Cromatograma obtido em detector ultravioleta a 225 nm com a solução padrão de PSMA-1007 10 g/L preparada em solução matriz.....	73
Figura 34 - Cromatograma obtido em detector ultravioleta a 225 nm com a solução padrão de PSMA-1007 8 g/L preparada em solução matriz.....	74
Figura 35 - Cromatograma obtido em detector ultravioleta a 225 nm com a solução padrão de PSMA-1007 10 g/L preparada em solução matriz.....	75
Figura 36 - Cromatograma obtido em detector ultravioleta a 225 nm com a solução padrão de PSMA-1007 12 g/L preparada em solução matriz.....	75
Figura 37 - Cromatograma obtido em detector ultravioleta a 225 nm com a solução padrão de PSMA-1007 0,5 g/L.....	76
Figura 38 - Cromatograma obtido em detector ultravioleta a 225 nm com a solução padrão de PSMA-1007 1,4 g/L.....	76
Figura 39 - Cromatograma obtido da amostra do produto 18F PSMA-1007 para avaliação da precisão. Cromatograma superior corresponde ao detector ultravioleta a 225 nm e o inferior, ao de radioatividade .....	79

Figura 40 - Cromatograma obtido para injeção de padrão de etanol e DMSO em método cromatográfico utilizando rampa de temperatura de 40 a 200 °C.....	80
Figura 41 - Cromatogramas obtidos com as injeções de padrão de etanol e DMSO em método isotérmico a 200 °C. ....	81
Figura 42 - Cromatograma obtido para injeção de padrão de etanol e DMSO em método cromatográfico utilizando rampa de temperatura de 120 a 210 °C.....	82
Figura 43 - Gráfico gerado para os dados de linearidade do método de avaliação determinação de etanol.....	84
Figura 44 - Gráfico gerado para os dados de linearidade do método de avaliação determinação de DMSO.....	84
Figura 45 - Gráfico gerado para os dados de linearidade do método de avaliação determinação de etanol, após retirada de outliers.....	86
Figura 46 - Gráfico gerado para os dados de linearidade do método de avaliação determinação de DMSO, após retirada de outliers.....	86
Figura 47 - Gráfico de probabilidade normal para avaliação de normalidade de dados - Etanol.....	89
Figura 48 - Gráfico de probabilidade normal para avaliação de normalidade de dados - DMSO .....	90
Figura 49 - Gráfico de resíduos x valores preditos para avaliação de homocedasticidade - Etanol .....	90
Figura 50 - Gráfico de resíduos x valores preditos para avaliação de homocedasticidade – DMSO.....	90
Figura 51 - Gráfico de resíduos x ordem de coleta dos dados para avaliação de independência – Etanol.....	91
Figura 52 - Gráfico de resíduos x ordem de coleta dos dados para avaliação de independência – DMSO .....	91
Figura 53 - Cromatograma obtido com a solução padrão de etanol 2 % v/v e DMSO 0,025 % p/p preparada em água .....	94
Figura 54 - – Cromatograma obtido com a solução padrão de etanol 2 % v/v e DMSO 0,025 % p/p preparada em solução matriz.....	95
Figura 55 - Cromatograma obtido para solução padrão de etanol 8% v/v e DMSO 0,3% p/p preparada em solução matriz para avaliação da exatidão. ....	97
Figura 56 - Cromatograma obtido com a solução amostra de 18F-PSMA 1007 para avaliação da precisão.....	99

Figura 57 - Cromatograma obtido em detector ultravioleta a 225 nm com a solução padrão de PSMA-1007 10 g/L.....	105
Figura 58 - Cromatograma obtido com amostra do produto 18F PSMA-1007. Cromatograma superior corresponde ao detector ultravioleta a 225 nm e o inferior, ao de radioatividade.....	106
Figura 59 - Aplicação de padrão de TBA 50 g/L (50) / aplicação de amostra de 18F PSMA-1007 (A) / aplicação de padrão de TBA 260 g/L (260).....	107
Figura 60 - Resultados de pureza radioquímica obtidos ao longo do estudo de estabilidade para a primeira síntese realizada.....	108
Figura 61 - Resultados de pureza radioquímica obtidos ao longo do estudo de estabilidade para a segunda síntese realizada.....	108
Figura 62 - Resultados de pureza radioquímica obtidos ao longo do estudo de estabilidade para a terceira síntese realizada.....	109

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Incidência estimada de novos casos.....	24
Tabela 2 - Comparativo de tempo, rendimento e pureza em diferentes módulos .....	32
Tabela 3 - Gradiente de fase móvel .....	47
Tabela 4 - Fluxo do gás de arraste.....	48
Tabela 5 - Temperatura da coluna .....	48
Tabela 6 - Recuperação esperada em função da concentração do analito .....	53
Tabela 7 - DPR aceitável para diferentes concentrações de analito em soluções para avaliação da precisão.....	53
Tabela 8 - Valores de atividade, tempo e rendimento das sínteses realizadas.....	57
Tabela 9 - Valores de largura dos picos, tempo de retenção e resolução de picos ..	63
Tabela 10 - Dados obtidos para Linearidade .....	65
Tabela 11 - Coeficientes obtidos pela regressão linear.....	66
Tabela 12 - Hipóteses e conclusões estabelecidas para Teste de Cochran – Avaliação da Homocedasticidade.....	66
Tabela 13 - Variâncias calculadas para aplicação do Teste de Cochran .....	66
Tabela 14 - Critérios de decisão para avaliação do coeficiente angular .....	67
Tabela 15 - Critérios de decisão para avaliação do coeficiente linear.....	67
Tabela 16 - Dados ANOVA .....	67
Tabela 17 - Resultados de área obtido com as injeções de padrão para avaliação de seletividade .....	71
Tabela 18 - Hipóteses criadas e resultados obtidos para avaliação de variâncias através do teste F.....	72
Tabela 19 - Hipóteses criadas e resultados obtidos para avaliação de médias através do teste t.....	72
Tabela 20 - Resultados obtidos com as injeções para avaliação da exatidão .....	74
Tabela 21 - valores utilizados e calculados para LQ e LD (g/L) .....	75
Tabela 22 - Resultados obtidos com as injeções para avaliação da exatidão na concentração do LQ.....	76
Tabela 23 - Resultados obtidos com as injeções de solução amostra de 18F PSMA-1007 para avaliação da precisão repetibilidade. ....	77
Tabela 24 - Resultados obtidos com as injeções de solução amostra de 18F PSMA-1007 para avaliação da precisão intermediária. ....	77
Tabela 25 - Avaliação de Precisão Intermediária pelo cálculo de DPR (%).....	78

Tabela 26 - Dados obtidos para Linearidade – Etanol .....	83
Tabela 27 - Dados obtidos para Linearidade DMSO .....	83
Tabela 28 - Coeficientes obtidos pela regressão linear para o etanol.....	84
Tabela 29 - Coeficientes obtidos pela regressão linear para o DMSO .....	85
Tabela 30 - Variâncias calculadas para aplicação do Teste de Cochran para o etanol .....	85
Tabela 31 - Variâncias calculadas para aplicação do Teste de Cochran para o DMSO .....	85
Tabela 32 - Variâncias calculadas para aplicação do Teste de Cochran para o etanol .....	87
Tabela 33 - Variâncias calculadas para aplicação do Teste de Cochran para o DMSO .....	87
Tabela 34 - Dados ANOVA para o Etanol .....	88
Tabela 35 - Dados ANOVA para o DMSO.....	88
Tabela 36 - Resultados de área obtido com as injeções de padrão de etanol para avaliação de seletividade. ....	92
Tabela 37 - Resultados de área obtido com as injeções de padrão de DMSO para avaliação de seletividade. ....	92
Tabela 38 - Resultados obtidos para avaliação de variâncias através do teste F para o etanol .....	92
Tabela 39 - Resultados obtidos para avaliação de médias através do teste T para o etanol .....	93
Tabela 40 - Resultados obtidos para avaliação de variâncias através do teste F para o DMSO.....	93
Tabela 41 - Resultados obtidos para avaliação de médias através do teste T para o DMSO .....	94
Tabela 42 - valores utilizados e calculados para LQ e LD do etanol.....	95
Tabela 43 - valores utilizados e calculados para LQ e LD do DMSO.....	95
Tabela 44 - Resultados obtidos com as injeções para avaliação da exatidão para o etanol .....	96
Tabela 45 - Resultados obtidos com as injeções para avaliação da exatidão para o DMSO .....	96
Tabela 46 - Resultados obtidos com as injeções de solução amostra de 18F PSMA-1007 para avaliação da precisão repetibilidade do etanol e do DMSO.....	97

Tabela 47 - Resultados obtidos com as injeções de solução amostra de $^{18}\text{F}$ PSMA-1007 para avaliação da precisão intermediária do etanol e do DMSO.....	98
Tabela 48 - Rendimentos obtidos para as três sínteses realizadas para estudo de validação de processo e estabilidade.....	100

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	16
2. OBJETIVO.....	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	19
3.1 Anatomia da próstata.....	19
3.2 Crescimento celular da próstata .....	20
3.3 Câncer e crescimento celular .....	22
3.4 Câncer de próstata .....	23
3.5 Detecção e diagnóstico de Câncer de próstata .....	24
3.6 Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET).....	25
3.7 Radiofármacos.....	26
3.8 Uso de radiofármacos para detecção do câncer de próstata.....	27
3.9 PSMA-1007 radiomarcado.....	27
3.10 <sup>18</sup> F PSMA-1007.....	29
3.11 Síntese do radiofármaco <sup>18</sup> F PSMA-1007.....	31
3.12 Controle de Qualidade .....	32
3.12.1 Controle de qualidade físico-químico.....	34
3.13 Validação de métodos analíticos .....	37
3.13.1 Exatidão.....	38
3.13.2 Linearidade .....	38
3.13.3 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ) .....	39
3.13.4 Precisão.....	39
3.13.5 Seletividade .....	39
3.13.6 Robustez.....	39
3.14 Validação de processo.....	40
3.15 Estudo de Estabilidade .....	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	42

4.1 Reagentes e equipamentos .....	42
4.2 Síntese do radiofármaco <sup>18</sup> F-PSMA 1007 .....	42
4.3 Controle de qualidade do radiofármaco <sup>18</sup> F PSMA-1007 .....	44
Testes .....	44
continua .....	44
4.3.1 Inspeção visual .....	45
4.3.2 pH .....	45
4.3.3 Identificação e pureza radionuclídica .....	45
4.3.4 Pureza química .....	46
4.3.5 Pureza radioquímica .....	46
4.3.6 Solventes Residuais .....	48
4.4 Validação Analítica .....	49
4.4.1 Método para avaliação de pureza química .....	49
4.4.2 Método para avaliação de pureza radioquímica e determinação de solventes residuais .....	49
4.4.3 Parâmetros avaliados nas validações analíticas .....	49
4.5 Validação de processo e estudo de estabilidade .....	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	56
5.1 Síntese do radiofármaco <sup>18</sup> F PSMA-1007 .....	56
5.2 Metodologia analítica para avaliação da pureza química – Limite de TBA57	
5.3 Validação de metodologia analítica para avaliação da pureza química – Limite de TBA .....	60
5.3.1 Seletividade .....	60
5.3.2 Limite de detecção .....	61
5.4 Metodologia analítica para avaliação da pureza radioquímica – Avaliação de <sup>18</sup> F PSMA-1007, PSMA-1007 e substâncias relacionadas .....	61
5.5 Validação da metodologia analítica para avaliação da pureza radioquímica – Avaliação de <sup>18</sup> F PSMA-1007, PSMA-1007 e substâncias relacionadas .....	64

5.5.1 Linearidade .....	64
5.5.2 Seletividade .....	70
5.5.3 Exatidão .....	73
5.5.4 Limite de Detecção e Limite de Quantificação .....	75
5.5.5 Precisão .....	76
5.6 Metodologia analítica para avaliação de solventes residuais – Determinação de etanol e de DMSO .....	79
5.7 Validação metodologia analítica para avaliação dos solventes residuais – Etanol e DMSO .....	82
5.7.1 Linearidade .....	82
5.7.2 Seletividade .....	91
5.7.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação .....	95
5.7.4 Exatidão .....	96
5.7.5 Precisão .....	97
5.8 Validação de processo e Estudo de Estabilidade .....	100
6 CONCLUSÕES .....	110
7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS .....	111
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	112

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer de próstata é o segundo tipo de câncer mais comum entre os homens. Estima-se cerca de 65.840 novos casos no Brasil para cada ano do triênio 2020 – 2022 (INCA, 2021).

O diagnóstico precoce do câncer possibilita melhor chance de tratamento, uma vez que se o tumor é diagnosticado em estágio inicial será possível contê-lo de forma mais eficiente. Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento de formas de diagnóstico que sejam eficazes na detecção.

As formas mais tradicionais de diagnóstico para o câncer de próstata são a dosagem, sérica do antígeno prostático específico (do inglês *Prostate-Specific Antigen*, PSA) e o toque retal. Porém, atualmente tem-se apresentado alternativas que podem antecipar o diagnóstico desse tipo de câncer, o que traz ao paciente melhores chances de recuperação e cura. Uma dessas alternativas é o uso de radiofármacos que fornecem imagens de tomografia por emissão de pósitron (do inglês *Positron Emission Tomography*, PET). A obtenção da imagem de tomografia PET se dá por meio da administração de um radiofármaco, cujo radioisótopo seja emissor de pósitrons. Com o passar do tempo, esta molécula irá acumular na área do corpo em que possui afinidade, propiciando que haja emissão de radiação suficiente para obtenção da imagem (ROBILOTTA, 2006).

Os radiofármacos são preparações farmacêuticas, sem ação farmacológica, que podem ter finalidade diagnóstica ou terapêutica, e contêm um ou mais radioisótopos em sua composição (ANVISA, 2020).

O radiofármaco  $^{18}\text{F}$ -PSMA-1007 tem sido utilizado para obtenção de imagens da próstata que permitem vários manejos clínicos, por exemplo, biópsia guiada por imagem, estadiamento de tumor primário, localização de recidiva bioquímica, planejamento de radioterapia, previsão e avaliação do tumor. (HONG, 2020)

O antígeno de membrana específico da próstata (do inglês, *Prostate-Specific Membrane Antigen*, PSMA) é uma glicoproteína de superfície celular, que está super expressada em células de câncer (OH, 2018). Moléculas de PSMA marcadas com  $^{18}\text{F}$  irão ligar-se, com alta afinidade, ao PSMA já presente na célula. Tendo em vista que nas células cancerosas o PSMA está super expressado haverá, então acúmulo de PSMA marcado nessas células, o que permite a obtenção de imagens por tomografia PET que revelam a presença do tumor, assim como sua agressividade e extensão. (HONG, 2020) (HOFMAN, 2020) (OH, 2018)

Para que os radiofármacos possam ser usados pelo paciente de maneira segura é necessário que sua qualidade seja atestada. O controle de qualidade assegura que os testes relevantes e necessários sejam executados, garantindo que o produto não seja liberado para uso ou venda, até que sua qualidade seja julgada satisfatória para a administração (ANVISA, 2019a).

A qualidade dos produtos pode ser controlada por meio de ensaios analíticos e microbiológicos. Esses ensaios podem ser procedentes de compêndios oficiais, ou desenvolvidos pela empresa. A confiabilidade dos resultados deve ser comprovada, por meio da validação analítica, que irá confirmar e fornecer evidências objetivas de que o método analítico produz resultados confiáveis e adequados à finalidade a que se destina. (ANVISA, 2017)

## **2. OBJETIVO**

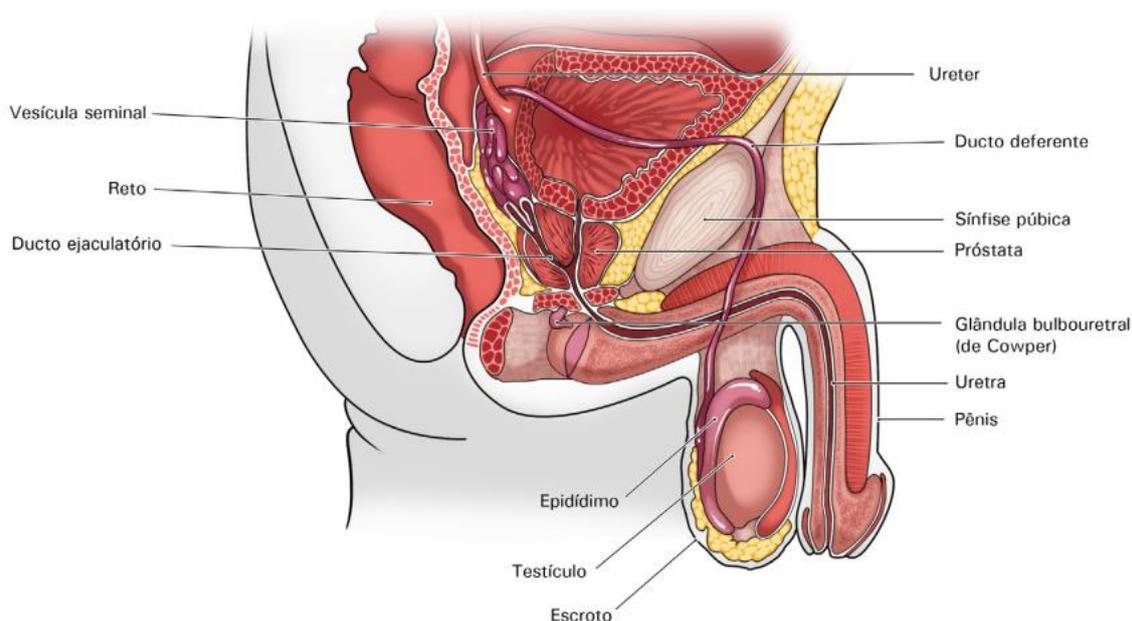
Executar a síntese do radiofármaco  $^{18}\text{F}$  PSMA-1007, desenvolver e implementar metodologias analíticas para o controle de qualidade do radiofármaco  $^{18}\text{F}$  PSMA-1007, bem como realizar as validações analíticas e de processo produtivo, assegurando a qualidade do produto final e sua estabilidade.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Anatomia da próstata

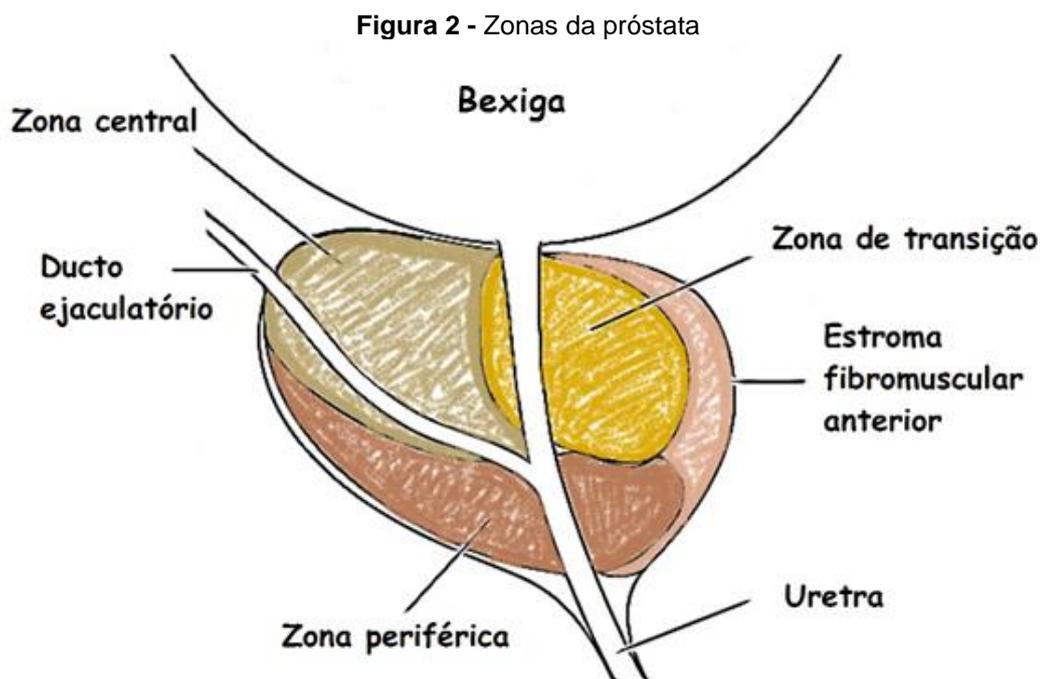
O sistema reprodutor masculino é composto pelos testículos, por ductos, por estruturas de suporte, como, escroto e o pênis, e por glândulas sexuais acessórias. Dentre as glândulas sexuais acessórias tem-se a próstata, que se localiza abaixo da bexiga urinária e envolve a uretra (Figura 1) (MACÉA; PINTO, 2010).

**Figura 1-** Estruturas do sistema reprodutor masculino



Fonte: (MACÉA; PINTO, 2010)

A próstata encontra-se em posição imediatamente anterior ao reto, justificando o exame de toque retal como uma forma de avaliação prostática (SARRIS, 2018). A organização da próstata do adulto é comumente descrita três zonas que exibem regiões anatômicas distintas: a zona central, uma zona de transição e uma zona periférica (Figura 2) (MARKER; A DONJACOUR; DAHIYA; CUNHA, 2003) (CUNHA *et al.*, 2004).



Fonte: Intervenção prostática. Dr.Pixel. Campinas: Dr Pixel, 2018. Disponível em: <https://drpixel.fcm.unicamp.br/conteudo/intervencao-prostatica>. Acesso em: 03 Mar. 2022

Ao longo dos períodos de desenvolvimento do homem, a próstata modifica-se em tamanho, até a puberdade há um lento aumento, tornando-se mais acentuado até os 30 anos e permanecendo estável até os 45, quando pode ocorrer novo aumento. O aumento de tamanho excessivo caracteriza o surgimento de uma neoplasia (MACÉA; PINTO, 2010)

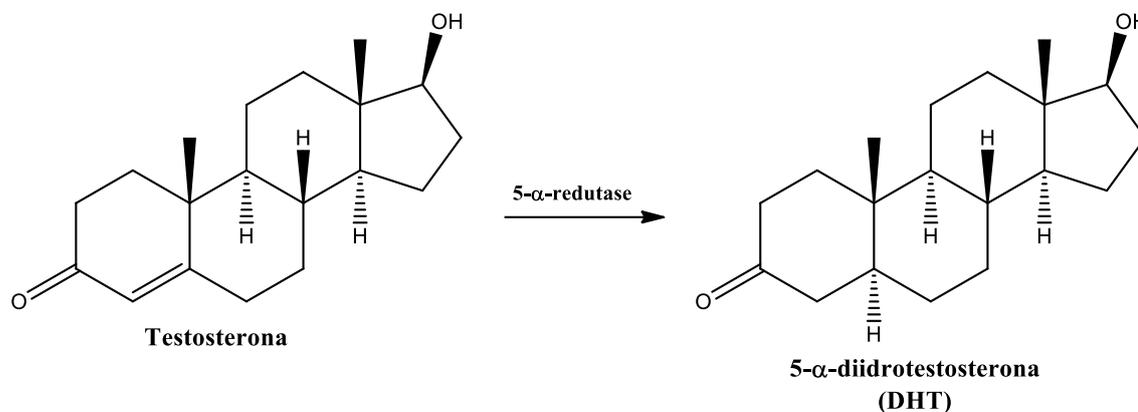
### 3.2 Crescimento celular da próstata

Na próstata o crescimento celular é regulado pelo epitélio e pelo estroma prostático, a interação dessas duas regiões culmina no crescimento prostático (LEE *et al.*, 2001). A testosterona é o principal hormônio sexual masculino, trata-se de um esteroide que desempenha importantes papéis em homens, por exemplo, atuar no desenvolvimento de tecidos reprodutores masculinos, como testículos e próstata, atuar na promoção de características sexuais secundárias, como o aumento da massa muscular, aumento e maturação dos ossos e o crescimento do cabelo corporal (MOORADIAN *et al.*, 1987).

Dentre as funções desse hormônio destaca-se seu importante papel estimulador das células prostáticas. Quando no interior das células, sob ação da enzima 5- $\alpha$ -redutase

a testosterona é convertida em 5- $\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT), Figura 3, que se liga aos receptores androgênicos (RA).

**Figura 3** - Estruturas químicas da testosterona e da 5- $\alpha$ -dihidrotestosterona



Fonte: o autor

A ligação entre DHT e RA acarreta uma alteração na conformação deste receptor, que expõe segmentos que têm a capacidade de se ligarem à cadeia de DNA de genes que são sensíveis aos andrógenos, (do inglês, *hormone responsive element*, HRE). A ligação DHT-RA ao HRE funciona como um fator de iniciação na transcrição dos genes sensíveis aos andrógenos e, também, fator de iniciação para a síntese de proteínas que modulam a proliferação e a secreção das células prostáticas. (LEZE, 2011). Os fatores de crescimento, (do inglês, *growth factors*, GF) são peptídeos celulares que também têm um importante papel estimulador sobre a proliferação das células prostáticas, uma vez que apresentam potente atividade mitogênica. No tecido normal prostático esses fatores estão presentes em grande quantidade, onde exercem função parácrina e autócrina na proliferação celular, além de exercer potente mediação da interação estroma-epitélio. Sabe-se que os RA e a 5- $\alpha$ -reductase são encontrados tanto no epitélio como no estroma, o que os torna sensíveis a ação da DHT. Diante disso, acredita-se que o crescimento e diferenciação da próstata é fruto da influência androgênica sofrida pelas células do estroma, o que acarreta a produção de mediadores que irão atuar sobre o epitélio (CARSON-JURICA *et al.*, 1990).

Nos ductos prostáticos a porção distal e apical é um segmento que está em constante proliferação e onde não ocorre apoptose celular. Já o segmento intermediário apresenta importante atividade secretora, onde não há crescimento e, também, não há apoptose, sendo a parte responsável pela secreção ativa da glândula. Por fim, no segmento proximal não há divisão celular, como também não há secreção, há um constante processo de apoptose. (MACÉA; PINTO, 2010)

Essa modelo permite observar que o crescimento da próstata e seu volume final dependem de um equilíbrio entre as atividades que ocorrem nos diferentes segmentos, ou seja, dependem do equilíbrio entre a proliferação celular da porção apical e a velocidade de apoptose na porção proximal (LEZE, 2011). Quando a taxa de replicação celular é igual a taxa de morte celular, o órgão ou tecido é estável. Já se a taxa de replicação celular excede a taxa de morte celular isso resultará em taxas aumentadas de replicação celular (FOSTER, 2000).

### **3.3 Câncer e crescimento celular**

O crescimento celular, que envolve aumento da massa celular, duplicação do ácido desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*, DNA) e divisão física da célula, a mitose, é um processo bem regulado que responde às necessidades do organismo. Os fatores de crescimento são polipeptídeos que regulam a proliferação celular, ao se ligarem em receptores localizados nas membranas celulares, sendo responsáveis por desencadear a proliferação celular normal (MACÉA; PINTO, 2010).

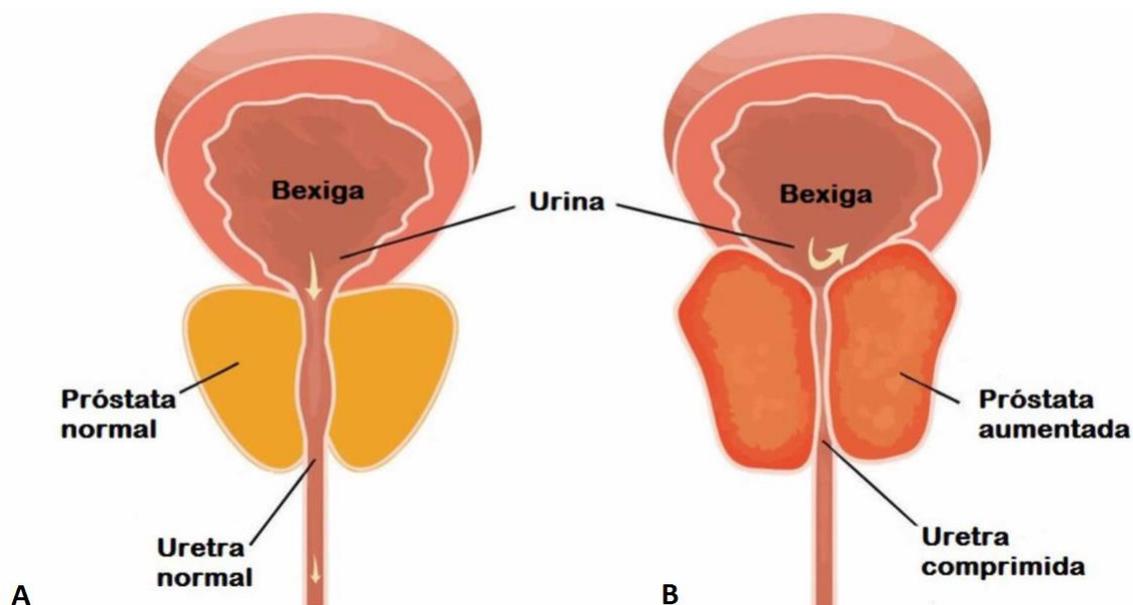
Há situações em que o estímulo para crescimento efetivo é benéfico para o organismo, por exemplo, para reparo de uma alteração tissular. Nesse caso, as células se multiplicam até que o tecido se recomponha e quando ficam em contato íntimo umas com as outras, ou seja, quando o tecido foi completamente regenerado, tem-se uma inibição por contato que paralisa todo o processo de multiplicação (MACÉA; PINTO, 2010).

Quando ocorre uma ruptura dos mecanismos reguladores da multiplicação celular a célula começa a dividir-se desordenadamente, o que pode resultar em células descendentes que também têm propensão a esse crescimento anômalo e é insensível aos mecanismos reguladores, isso resultará na formação do que chamamos tumor ou neoplasia (MACÉA; PINTO, 2010) (FOSTER, 2000).

A hiperplasia prostática benigna (HPB) é a condição clínica mais frequente a partir dos 60 anos, sendo a neoplasia benigna da zona de transição mais comum no homem. A HPB é considerada uma doença progressiva, definida como o crescimento contínuo da próstata, como mostrado na Figura 4, é resultado de uma proliferação celular não neoplásica tanto das células estromais quanto das glândulas prostáticas. Apresenta como quadro clínico o aparecimento de sintomas urinários, como a retenção urinária aguda, redução do calibre e da força do jato urinário, intervalo entre as micções inferior a 2 horas, esforço ou demora em iniciar a micção, jato intermitente e esvaziamento

incompleto, que geram impacto negativo na qualidade de vida. (LIMA; LORENZETTI 2010) (BRUM *et al.*, 2005)

**Figura 4** - A Próstata em tamanho normal sem obstrução do canal da uretra. B Próstata aumentada causando obstrução da uretra.



Fonte: Doenças da próstata e a importância do diagnóstico com Ultrassom. Disponível em: <https://tomocenter.com.br/doencas-da-prostata/>. Acesso em 02. Mar. 2022

Por outro lado, o adenocarcinoma é o tipo de câncer de próstata mais comum, correspondendo a mais de 95% dos casos de malignidade (BRASILEIRO FILHO, 2016). O adenocarcinoma prostático ocorre predominantemente na zona periférica, enquanto a hiperplasia prostática benigna é predominantemente uma doença da zona de transição. (CUNHA *et al.*, 2004)

### 3.4 Câncer de próstata

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer de próstata é o segundo tipo de câncer mais comum entre os homens, estima-se o surgimento de 65.840 novos casos de câncer de próstata no Brasil para cada ano do triênio 2020-2022, o que corresponde a um risco estimado de 62,95 casos novos a cada 100 mil homens (INCA, 2021).

Na Tabela 1 é mostrada a incidência estimada de novos casos conforme a localização primária do tumor para homens.

**Tabela 1** - Incidência estimada de novos casos

Localização primária	Casos Novos	(%)
Próstata	65.840	29.2
Cólon e Reto	20.540	9.1
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	7.9
Estômago	13.360	5.9
Cavidade Oral	11.200	5.0
Esôfago	8.690	3.9
Bexiga	7.590	3.4
Laringe	6.470	2.9
Leucemias	5.920	2.6
Sistema Nervoso Central	5.870	2.6
Todas as neoplasias, exceto pele não melanoma	225.980	100.9
Todas as neoplasias	309.750	

Fonte: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em 02 Mar. 2022

Hyuna Sung e colaboradores (2021) avaliaram a incidência e mortalidade mundial para 36 tipos de cânceres em 185 países. Foi observado neste estudo que em 112 países o câncer de próstata é o mais frequentemente diagnosticado e em 48 países é a principal causa de morte por câncer entre homens. O estudo aponta uma estimativa de quase 1,4 milhão de novos casos e 375.000 mortes em todo o mundo. Por outro lado, observa-se uma diminuição das taxas de mortalidade em países de alta renda, desde meados da década de 1990, o que se atribui a avanços no tratamento e detecção precoce.

A taxa de sobrevivência é de quase 100% se o câncer de próstata é detectado precocemente, uma vez que a doença está, ainda, confinada a próstata e aos gânglios linfáticos regionais. Já se a doença for detectada tardiamente, em sua fase metastática a taxa de sobrevivência cai abaixo 30% (KELLY *et al.*, 2016).

Detectar a doença de forma sensível e específica é importante para que se compreenda o estadiamento correto dessa, o que irá possibilitar um manejo adequado do paciente, melhorando de forma significativa seu prognóstico (KELLY *et al.*, 2016) (BOUCHELOUCHE *et al.*, 2010).

### 3.5 Detecção e diagnóstico de Câncer de próstata

O exame de toque retal, as medidas séricas do Antígeno Específico da Próstata (do inglês *Prostate Specific Antigen*, PSA) e a ultrassonografia transretal são as formas principais e clássicas de detecção do câncer de próstata (SROUGI *et al.*, 2008).

O exame de toque retal permite avaliar o tamanho, a forma e a consistência da próstata, o que possibilita identificar a presença de nódulos, porém esse exame deixa cerca de 40% a 50% dos tumores fora do seu alcance, uma vez que é possível palpar apenas as porções posterior e lateral da próstata. (BACELAR JÚNIOR *et al.*, 2015) (AMORIM, *et al.*, 2011) (BRASIL, 2002)

O PSA é uma proteína produzida pela próstata e excretada pelo fluido seminal. No homem saudável essa está presente em concentrações baixas na circulação, aceita-se como valores limites normais até 4 ng/mL, porém podem existir tumores com PSA abaixo deste valor. A dosagem sérica de PSA é um exame de alta sensibilidade, porém pouco específico para a detecção do câncer, uma vez que um aumento dos índices séricos de PSA pode estar relacionado com diferentes patologias, por exemplo, prostatite, hiperplasia benigna, trauma prostático e infecção da próstata, não sendo, portanto, específico para o câncer (JÚNIOR *et al.*, 2015). Há ainda falta de consenso para o valor de corte dos níveis de PSA acima do qual deve-se indicar biópsia (BRASIL, 2002) (REIS; CASSINI 2010). Pacientes com PSA entre 4 a 10 ng/mL ou >10 ng/mL têm, respectivamente, 30% e 62% de probabilidade de terem câncer de próstata (REIS; CASSINI 2010).

Quando se detecta em um paciente áreas de maior consistência na glândula e/ou com elevação dos níveis séricos de PSA, indica-se que seja realizada a biópsia para investigar-se a presença de doença neoplásica. (SROUGI *et al.*, 2008)

Nos últimos anos a medicina nuclear tornou-se uma ferramenta importante no diagnóstico e estadiamento do câncer de próstata, utilizando técnicas como o PET/CT (do inglês *Positron Emission Tomography and Computed Tomography*) (VIDEIRA, *et al.*, 2020).

### **3.6 Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET)**

A Medicina Nuclear obtém as imagens através da administração de radiofármacos, a radiação emitida é captada externamente. A dose necessária para realização de um exame de tomografia por emissão de pósitrons é mais baixa quando comparada com as doses utilizadas como agentes de contraste em outras técnicas de diagnóstico, tais como a radiografia e a ressonância magnética nuclear (RMN), sendo, portanto, uma técnica segura para o paciente (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

A tomografia PET é um método de imagem, utilizado em Medicina Nuclear, que permite mapear a distribuição de emissores de pósitrons no corpo, possibilitando o

diagnóstico precoce de alterações fisiológicas. O uso dessa técnica requer que seja administrado ao paciente um radiofármaco cujo radionuclídeo que o constitui seja um emissor de pósitrons. O pósitron que é emitido a partir do radionuclídeo colide com um elétron do meio e ambos se aniquilam, dando origem a um par de fótons de energia de 511 keV cada, que se propagam em sentidos opostos. Esses fótons são detectados externamente, e a informação é usada para a reconstrução das tomografias. Assim, obtém-se um mapa da distribuição do radiofármaco emissor de pósitrons pelos tecidos e órgãos do corpo, o que permite, avaliar a função e a morfologia de órgãos possibilitando, por exemplo, a localização de tumores (ROBILOTTA, 2006).

### **3.7 Radiofármacos**

Segundo a Farmacopeia Brasileira (2020) radiofármacos são preparações farmacêuticas com finalidade diagnóstica ou terapêutica que, quando prontas para o uso, contêm um ou mais radionuclídeos.

Os radiofármacos são formados por dois componentes, um elemento radioativo, o radionuclídeo, e um elemento não radioativo que pode ser uma molécula biologicamente ativa, um tipo de droga, ou uma célula, que irá atuar como carregador ou ligante, e será responsável por conduzir o radionuclídeo a um órgão específico (PAYOLLA *et al.*, 2019) (ANVISA, 2019a).

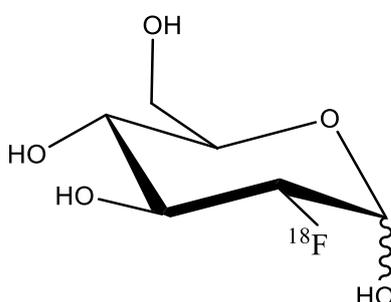
A farmacocinética dos radiofármacos, ou seja sua absorção, metabolismo e excreção, será determinada por suas características físico-químicas que estão relacionadas a parte não radioativa, enquanto as características físicas do radionuclídeo serão responsáveis por determinar se esse radiofármaco destina-se ao uso diagnóstico e/ou terapêutico (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Na modalidade diagnóstica, são utilizados em exames de imagem, podem ser administrados por via oral, intravenosa ou por inalação, e permitem a visualização de seus traçadores radioativos em órgãos e tecidos. Na modalidade terapêutica os radiofármacos são administrados com uma alta dose de radiação, esse será direcionado ao órgão ou tecido doente, podendo ser utilizados, por exemplo, no tratamento de certos tipos de câncer e tratamento de glândula tireóide com funcionamento excessivo (PAYOLLA *et al.*, 2019).

### 3.8 Uso de radiofármacos para detecção do câncer de próstata

O  $^{18}\text{F}$  fluorodesoxiglicose ( $^{18}\text{F}$ -FDG) é o radiofármaco mais comumente usado em tomografia PET (PIANOU *et al.*, 2019). Um dos sinais do câncer trata-se do metabolismo aumentado da glicose pelas células cancerosas, o que faz com que quando administrado o  $^{18}\text{F}$ -FDG se acumule nessas células, por esse motivo o  $^{18}\text{F}$ FDG apresenta vantagens para diversos estudos em oncologia ou neurologia, tendo, portanto, ampla aplicação no diagnóstico de câncer por meio da tomografia PET (MAFELD *et al.*, 2015) (JADVAR, 2012).

Figura 5 - Molécula de  $^{18}\text{F}$  fluorodesoxiglicose



Fonte: o autor

Porém, para o câncer de próstata esse radiofármaco tem um papel limitado no diagnóstico e estadiamento da doença, uma vez que há sobreposição do acúmulo do marcador em tecidos normais e anormais da próstata, além de não haver penetração na membrana prostática (JADVAR, 2012).

Diante das limitações apresentadas na tentativa do uso do  $^{18}\text{F}$ -FDG para detecção e estadiamento do câncer de próstata fez-se necessário o desenvolvimento de outros radiofármacos.

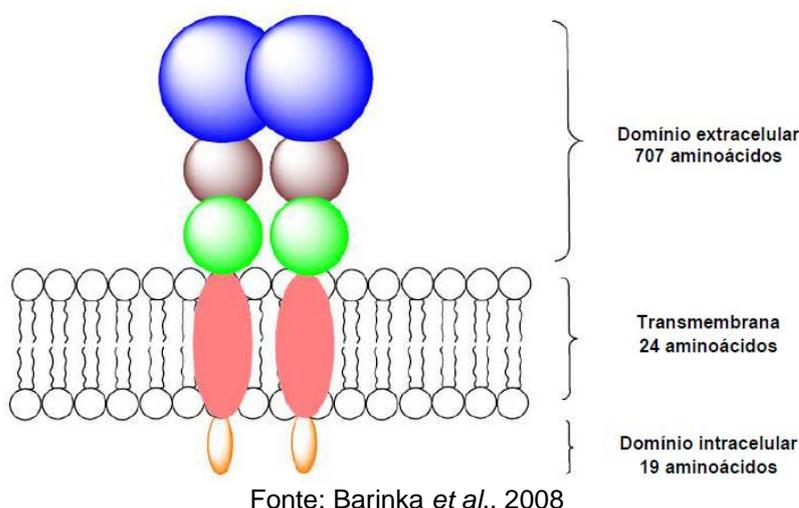
Videira e colaboradores (2020) fizeram um levantamento dos radiofármacos desenvolvidos ao longo dos anos na tentativa de melhorar a acurácia do diagnóstico do câncer de próstata, os trabalhos na literatura mostraram tentativas com N-3- $^{18}\text{F}$ ]fluoropropylputrescine,  $^{11}\text{C}$ - Acetate,  $^{18}\text{F}$ - Acetate,  $^{11}\text{C}$ -Colina,  $^{18}\text{F}$ -Fluorometilcolina,  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-HBED-CC,  $^{18}\text{F}$ -FDCFBBC,  $^{18}\text{F}$ -FACBC,  $^{18}\text{F}$ -DCFPyL, Al $^{18}\text{F}$ -PSMA-11 e  $^{18}\text{F}$ -PSMA-1007.

### 3.9 PSMA-1007 radiomarcado

O antígeno de membrana específico da próstata é uma glicoproteína de membrana composta por um segmento intracelular (19 aminoácidos), um domínio

transmembranar (24 aminoácidos) e um domínio extracelular extenso (707 aminoácidos) como mostrado na Figura 6 (GHOSH; HESTON, 2003).

**Figura 6** - Representação da estrutura do PSMA-1007



Além do epitélio da próstata o PSMA encontra-se expresso na região dos túbulos proximais do rim, na região do jejuno no intestino delgado e em gânglios do sistema nervoso (PIANOU *et al.*, 2019).

Na próstata, o PSMA está localizado no citoplasma e no lado apical do epitélio que reveste os ductos prostáticos, quando ocorre transformação maligna na célula, o PSMA é transferido do citoplasma para a superfície luminal dos ductos prostáticos tornando-se uma proteína ligada a membrana (PIANOU *et al.*, 2019).

O PSMA tornou-se um alvo viável para imagens e terapia de próstata, uma vez que está expresso em quase todos os tipos de cânceres de próstata com expressão aumentada em carcinomas pouco diferenciados e metastáticos (BANERJEE *et al.*, 2010) (EDER *et al.*, 2012). Em células cancerosas seu nível de expressão é cerca de 1000 vezes maior quando comparado com os níveis fisiológicos encontrados em outros tecidos. Mesmo em células resistentes à castração, ou seja, células resistentes a terapêutica hormonal, a super expressão de PSMA está presente (PIANOU *et al.*, 2019). Em todas as fases do câncer essa glicoproteína encontra-se altamente expressa e fortemente regulado para cima, isso faz do PSMA um alvo promissor para detecção em exames de imagem (EDER *et al.*, 2012) (GHOSH; HESTON, 2003) (PIANOU *et al.*, 2019). O PSMA forma um complexo receptor ligante com um substrato, com base nesse recurso, moléculas que imitam o substrato endógeno

marcadas com o radionuclídeo irão ligar-se ao PSMA super expressado nas células (OH *et al.*, 2018)

O uso de agentes de imagem, no caso os radionuclídeos, direcionados ao PSMA tem aumentado significativamente a capacidade de verificar a presença e extensão da doença metastática (WERNER *et al.*, 2020).

O PSMA marcado com o radioisótopo  $^{68}\text{Ga}$  apresentou-se como uma boa alternativa para diagnóstico no câncer de próstata, uma vez que este radiofármaco é internalizado e se acumula em altos níveis, mesmo em pequenas metástases (EDER *et al.*, 2012). A emissão de pósitrons do radionuclídeo Ga pode ser usada para imagens de tumores (BANERJEE *et al.*, 2010).

Quando comparado com o radioisótopo  $^{18}\text{F}$ , o  $^{68}\text{Ga}$  apresenta algumas desvantagens, dentre as quais podemos destacar: um menor rendimento de pósitrons além de pósitrons com maior energia, que irá afetar a qualidade da imagem obtida em exames PET e prejudicar o diagnóstico. Além de um menor tempo de meia vida, restringindo o tempo de aquisição de imagens, bem como a distância entre o local de produção e utilização do fármaco marcado com o  $^{68}\text{Ga}$  (WERNER *et al.*, 2018) (WERNER *et al.*, 2020).

Diante das vantajosas propriedades mostradas pelo radionuclídeo  $^{18}\text{F}$  e das propriedades químicas do PSMA que favorecem a detecção do câncer de próstata, o radiofármaco  $^{18}\text{F}$  PSMA-1007 tem apresentado sucesso em seu uso para detecção dessa doença.

### 3.10 $^{18}\text{F}$ PSMA-1007

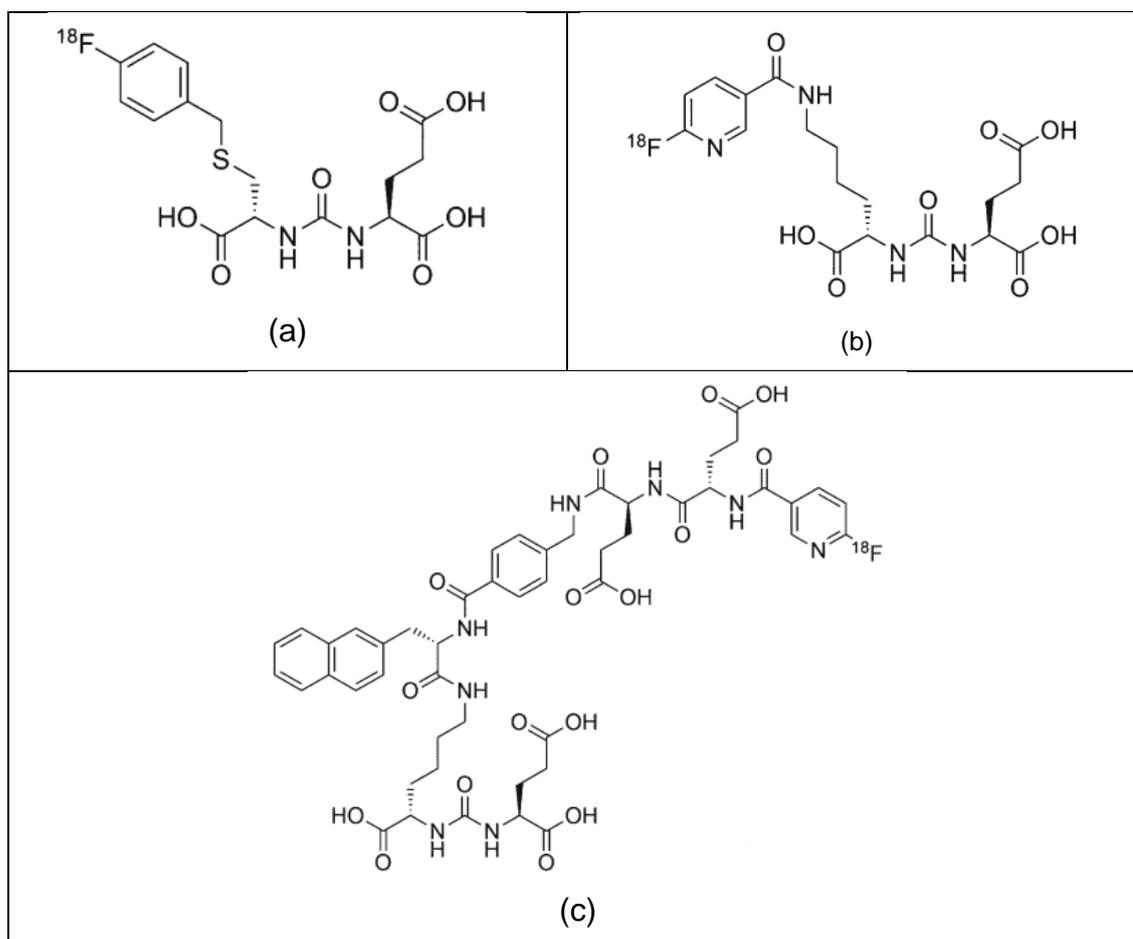
O PSMA-1007 marcado com  $^{18}\text{F}$  é a terceira geração de moléculas marcadas, ou seja, agentes PET, direcionados PSMA da célula para detectar a presença do câncer de próstata. A primeira geração desenvolvida foi o  $^{18}\text{F}$ -DCFBC (N-[N-[(S)-1,3-dicarboxipropil] carbamoil] – 4 - [ $^{18}\text{F}$ ] fluorobenzil-L-cisteína) (Figura 7a), o  $^{18}\text{F}$ -DCFBC foi capaz de detectar locais da doença oculta que não foram detectados por modalidades de imagem convencionais. No entanto,  $^{18}\text{F}$ -DCFBC apresenta lenta depuração sanguínea. Com objetivo de superar essas limitações surgiu a segunda geração, o  $^{18}\text{F}$ -DCFPyL ((2-(3-(1-carboxi-5-((6-[ $^{18}\text{F}$ ] fluoro-piridina-3-carbonil) amino)-pendtil)-ureido)-ácido pentanodióico)(Figura 7b), este ligante também apresentou-se capaz de detectar a doença, além de um perfil de segurança favorável. Porém,

DCFBC e DCFPyL não são capazes de se ligar a nuclídeos terapêuticos, assim surge a terceira geração, os ligantes de PSMA.

O PSMA é capaz de ligar-se ao nuclídeo  $^{177}\text{Lu}$ , formando o  $^{177}\text{Lu}$  PSMA-617, um importante agente terapêutico. O PSMA-1007 (Figura 7c) surge como importante agente diagnóstico, além de melhorar uma característica presente nos dois ligantes citados anteriormente, a biodistribuição. O PSMA-1007 tem sua liberação reduzida na urina, uma vez que apresenta excreção hepatobiliar, o que diminuiu seu acúmulo em células normais do leito prostático facilitando a avaliação e, conseqüentemente, a detecção do câncer de próstata (GIESEL *et al.*, 2016) (HONG *et al.*, 2020) (OH *et al.*, 2018).

Kesch *et al.* (2017), Giesel *et al.* (2018) relataram que a intensidade do acúmulo de PSMA-1007 ( $^{18}\text{F}$ ) em tumores da próstata correlaciona-se positivamente com outras formas de avaliação e detecção do câncer de próstata, por exemplo, os níveis de PSA, o que corrobora para um diagnóstico mais assertivo.

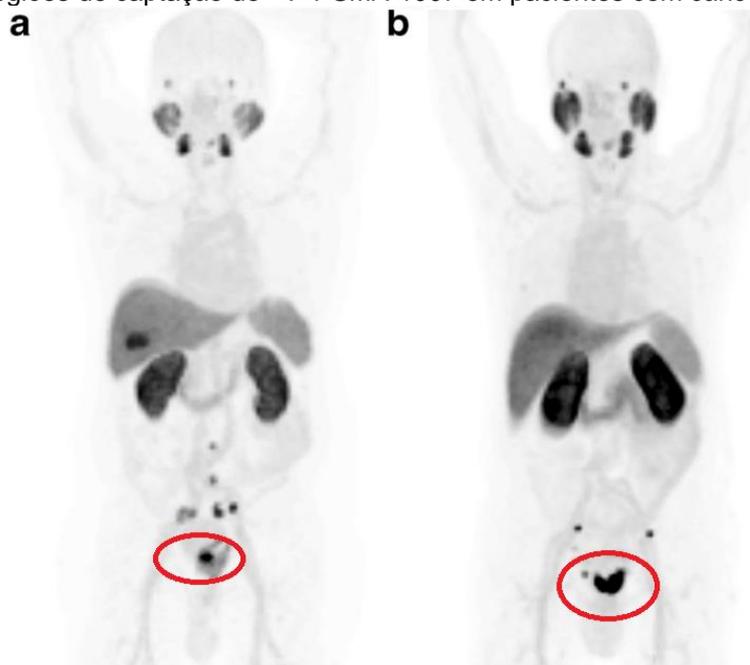
**Figura 7** - (a) Estrutura do  $^{18}\text{F}$ -DCFBC; (b) Estrutura do  $^{18}\text{F}$ -DCFPyL e (c)  $^{18}\text{F}$ -PSMA-1007



Fonte: GIESEL *et al.*, 2016

Na Figura 8 é apresentada as regiões de captação do  $^{18}\text{F}$ -PSMA-1007 aplicado em pacientes com câncer de próstata. Em 9 (a) o paciente apresentou grande massa tumoral na próstata infiltrando a vesícula seminal e metástases para vários linfonodos na pelve. Em 9 (b) o paciente apresentou uma grande massa tumoral na próstata e várias metástases linfonodais.

**Figura 8** -Regiões de captação de  $^{18}\text{F}$ -PSMA-1007 em pacientes com câncer de próstata



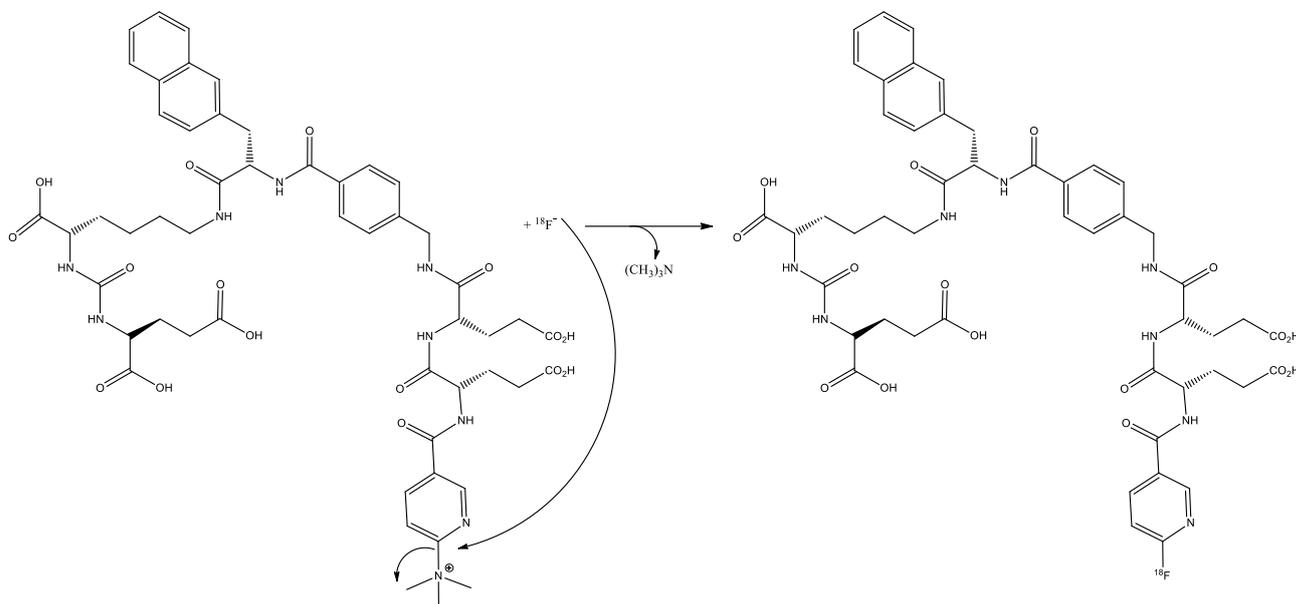
Fonte: GIESEL *et al.*, 2016

### 3.11 Síntese do radiofármaco $^{18}\text{F}$ PSMA-1007

Nos primeiros estudos em que o  $^{18}\text{F}$ -PSMA foi utilizado em humanos esse radiofármaco foi obtido por um procedimento de síntese realizado em duas etapas (CARDINALE *et al.*, 2016) (CARDINALE *et al.*, 2017). A primeira etapa consiste na síntese do precursor da reação, o *N,N,N*-trimetil-5-((2,3,5,6-tetrafluorofenoxi)-carbonil)piridina-2-amino trifluorometanossulfonato. Na segunda etapa ocorre reação do precursor com ânion fluoreto ( $^{18}\text{F}^-$ ) que foi produzido por meio do bombardeamento de prótons em água enriquecida com  $^{18}\text{O}$ . Este procedimento apresentou elevada complexidade e rendimentos radioquímicos baixos, 1,5 a 6,0% (NAKA, *et al.*, 2020). Posteriormente, foi desenvolvido um novo procedimento em uma etapa única (CARDINALE *et al.*, 2017) A reação se dá por uma substituição nucleofílica, em que o fluoreto radiomarcado ( $^{18}\text{F}^-$ ) ataca o precursor da reação. Como resultado, o procedimento de síntese foi simplificado e obtido melhores valores de rendimento

radioquímico. A reação que ocorre entre o precursor e o ânion fluoreto é mostrada na Figura 9.

**Figura 9** - Mecanismo da reação entre o precursor e o ânion fluoreto levando a obtenção de  $^{18}\text{F}$  PSMA



Para a síntese realizada em etapa única, Cardinale e colaboradores (2017a) mostraram diferentes procedimentos realizados em diferentes módulos de síntese disponíveis comercialmente. A Tabela 2 mostra um comparativo para os módulos avaliando o tempo de síntese, os rendimentos e a pureza radioquímica obtida.

**Tabela 2** - Comparativo de tempo, rendimento e pureza em diferentes módulos

Módulo de síntese	Tempo de síntese	Rendimento da reação	Pureza radioquímica
Tracerlab FX FN	55 minutos	24,3 – 84,4 %	≥97,0 %
GE Tracerlab MX	45 minutos	43,3 – 52,8 %	≥ 95,0 %
NEPTIS Mosaic-RS	45 minutos	41,3 – 44,9 %	≥ 95,0 %
IBA SYNTHERA+	35 minutos	59,5 e 72,8 %	≥ 95,0 %

Fonte: (CARDINALE *et al.*, 2017)

### 3.12 Controle de Qualidade

Atualmente, no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regula por meio de Resoluções de Direção Colegiada (RDC) e de Instruções Normativas (IN) o setor de Radiofármacos. A RDC 451, de 16 de dezembro de 2020, que dispõe sobre o registro, notificação, importação e controle de qualidade de Radiofármacos, e a IN 37, de 21 de agosto de 2019, que dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação complementares a Medicamentos Radiofármacos são as principais legislações que regulam o setor. Além dessas, a RDC 301, de 21 de agosto de 2019, que dispõe sobre

as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos, apresenta importantes normas que devem ser seguidas na produção de Radiofármacos.

Segundo o Art. 13 da RDC 301 o controle de qualidade é a parte das Boas Práticas de Fabricação (BPF) que assegura que os testes relevantes e necessários sejam executados, e que os materiais não sejam liberados para uso, ou que produtos não sejam liberados para comercialização ou distribuição, até que a sua qualidade tenha sido considerada satisfatória.

Tendo em vista que os radiofármacos serão destinados à administração a humanos, é imprescindível que se tenha informações reais da condição da qualidade desses e que cumpram todos os requisitos de qualidade pré-estabelecidos pelas legislações vigentes (TAVARES *et al.*, 2015) (MOLAVIPORDANJANI; HOSSEINIMEHR, 2019).

A Farmacopeia Brasileira estabelece que a produção dos radiofármacos deverá atender os requisitos de BPF de Radiofármacos, além de atender às especificações farmacopeicas (ANVISA, 2019a). Os procedimentos de controle de qualidade devem sempre ser realizados antes da administração ao paciente para garantir que o produto se encontre dentro das especificações estabelecidas (MOLAVIPORDANJANI; HOSSEINIMEHR, 2019). Porém, devido à meia-vida curta de seus radionuclídeos, alguns medicamentos radiofármacos podem ser liberados antes da conclusão de todos os testes de controle de qualidade, nesse caso, a liberação será feita com base em uma avaliação da documentação do lote (ANVISA, 2019b).

O controle de qualidade envolve testes e medidas específicas que visam garantir a pureza, potência, identidade do produto, segurança biológica e eficácia dos radiofármacos (MOLAVIPORDANJANI; HOSSEINIMEHR, 2019). Os testes necessários para assegurar a qualidade dos Radiofármacos dividem-se em duas categorias: ensaios físico-químicos e ensaios microbiológicos (TAVARES *et al.*, 2015). Os ensaios físico-químicos incluem as características físicas, pH, as determinações de pureza química e radioquímica, a identificação e pureza radionuclídica e a determinação de solventes residuais. Os ensaios microbiológicos incluem o teste de pirogênicos e teste de esterilidade. Todos os testes realizados para liberação do radiofármaco devem seguir integralmente a monografia farmacopeica e na ausência de monografia farmacopeica, a metodologia deve ser fundamentada em literatura científica (ANVISA, 2020).

### **3.12.1 Controle de qualidade físico-químico**

#### **3.12.1.1 Inspeção visual**

A formulação final do produto deve ser inspecionada avaliando-se sua coloração e a presença de partículas na solução. A coloração deve ser característica, conforme especificação farmacopeica ou referência científica. Quanto a presença de partículas, uma vez que se trata de um produto injetável, espera-se a ausência de qualquer material particulado (MOLAVIPORDANJANI; HOSSEINIMEHR, 2019). A presença de material particulado no produto indica possível falha em algum estágio da síntese do radiofármaco (SHUKLA *et al.*, 2013). Para preparações de natureza coloidal deve-se avaliar o tamanho e número das partículas presentes na preparação (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

#### **3.12.1.2 pH**

O pH é importante para a estabilidade da preparação, por se tratar de um produto injetável esse deve apresentar compatibilidade fisiológica, devendo estar próximo de 7,4 (pH sanguíneo). Contudo, devido a capacidade tamponante do sangue pode-se alargar a faixa de pH permitida para a formulação (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

#### **3.12.1.3 Pureza química e radioquímica**

A pureza química corresponde a fração do material na forma química desejada, seja ela marcada ou não. É a razão da massa da molécula do composto de interesse em relação à massa total da preparação (OLIVEIRA *et al.*, 2006) (ANVISA, 2019a).

A presença de impurezas químicas antes da marcação radioativa pode levar a espécies marcadas indesejáveis, o que pode, por exemplo, prejudicar a qualidade de imagens obtidas em testes de diagnóstico. A fim de evitar ou diminuir a presença dessas impurezas, há durante a síntese do radiofármaco uma etapa de purificação, que pode ser realizada por métodos de separação química, como precipitação, extração por solvente, troca iônica e destilação (MOLAVIPORDANJANI; HOSSEINIMEHR, 2019).

A pureza radioquímica corresponde a porcentagem de radioatividade do radionuclídeo de interesse em relação à radioatividade total da formulação (ANVISA, 2019a).

A presença de impurezas radioquímicas nas preparações radiofarmacêuticas prejudica a qualidade da imagem e aumenta a dose de radiação para o paciente (MOLAVIPORDANJANI; HOSSEINIMEHR, 2019). Essas impurezas podem originar-

se da decomposição do radiofármacos, devido à ação do solvente, temperatura, pH, luz, presença de agentes oxidantes ou redutores e da radiólise (MOLAVIPORDANJANI; HOSSEINIMEHR, 2019) (OLIVEIRA *et al.*, 2006). A fim de evitar ou diminuir a presença dessas impurezas pode-se adicionar substâncias com características antioxidantes, como ascorbato de sódio, ácido ascórbico e sulfito de sódio, essas são utilizadas para manter a estabilidade dos radiofármacos nas condições mencionadas (MOLAVIPORDANJANI; HOSSEINIMEHR, 2019).

#### 3.12.1.4 Identificação e Pureza Radionuclídica

A identificação radionuclídica pode ser avaliada pelo cálculo da meia-vida do radionuclídeo a partir do decaimento radioativo, uma vez que cada radionuclídeo possui tempo de meia vida característico, é possível identificar o radionuclídeo presente na formulação (LOBO FILHO *et al.*, 2019).

O tempo de meia-vida ( $T_{1/2}$ ) é o tempo que leva para a atividade de um radioelemento decair à metade do seu valor original (XAVIER *et al.*, 2007).

Então,  $A(T_{1/2}) = A_0/2$ .

O decaimento radioativo é expresso em função da atividade emitida ao longo do tempo,  $A(t)$ , segundo a equação matemática:

**Equação 1** – Equação para cálculo da atividade

$$A_{(t)} = A_0 e^{-\lambda T} \quad (1)$$

Onde,

$A_0$  = é a atividade medida no tempo inicial

$\lambda$  = é a constante de decaimento

Desta forma,

$$\frac{A_0}{2} = A_0 e^{-\lambda T_{1/2}} \quad (2)$$

$$\ln 2 = \lambda T_{1/2} \quad (3)$$

$$T_{1/2} = \frac{0,693}{\lambda} \quad (4)$$

(RUIVO *et al.*, 2013)

A pureza radionuclídica representa a razão, expressa em porcentagem, da radioatividade do radionuclídeo em relação à radioatividade total da preparação radiofarmacêutica (ANVISA, 2019a), pode ser obtida pela determinação da energia e tipo de radiações emitidas pelo radiofármaco (MOLAVIPORDANJANI; HOSSEINIMEHR, 2019).

A presença de eventuais impurezas radionuclídicas está relacionada com o modo de produção do radionuclídeo, o que prejudica a obtenção de imagens em exames, além de aumentar a radiação a qual o paciente está exposto (MOLAVIPORDANJANI; HOSSEINIMEHR, 2019).

### **3.12.1.5 Solventes Residuais**

Solventes residuais são produtos químicos orgânicos voláteis que são usados ou produzidos na fabricação de substâncias ou excipientes de medicamentos, ou na preparação de medicamentos (ICH, 2021).

Durante a síntese de radiofármacos podem ser utilizados solventes que não são completamente removidos ao final do processo. Sabendo que esses solventes podem ser prejudiciais à saúde humana, é fundamental controlar e regular a quantidade de solventes residuais em radiofármacos (TING; LAHEY, 2021).

Para definição de limites aceitáveis de concentração desses solventes, o guia *“Impurities: guideline for residual solvents Q3C(R8)”*, publicado 2021 na *International Conference on Harmonization* (ICH) classifica os solventes em diferentes classes e estabelece seus limites seguros. Os solventes foram avaliados quanto ao seu possível risco para a saúde humana e colocados em uma das três classes a seguir:

Classe 1 - solventes que devem ser evitados

Agentes cancerígenos humanos e solventes altamente prejudiciais para o meio ambiente. Recomenda-se que esses solventes não sejam empregados na produção de substâncias medicamentosas. Porém se o uso desses for inevitável na formulação de um produto que apresente avanço terapêutico significativo, seus níveis devem ser restringidos. Exemplos: benzeno, tetracloreto de carbono, 1,2-Dicloroetano, 1,1-Dicloroetano e 1,1,1-Tricloroetano.

Classe 2 - solventes que devem ser limitados

Carcinógenos animais não genotóxicos ou possíveis agentes causadores de outra toxicidade irreversível, como neurotoxicidade ou teratogenicidade. Solventes suspeitos de toxicidades significativas, mas reversível. Exemplos: acetonitrila, clorobenzeno, clorofórmio, etilenoglicol, hexano, metanol, piridina e tolueno.

Classe 3 - solventes com baixo potencial tóxico

Apresentam baixo potencial tóxico para o homem. Para os solventes dessa classe considera-se que quantidades de solventes residuais de até 5000 ppm são aceitáveis sem justificativa. Quantidades superiores a essa podem ser aceitáveis desde que

sejam justificadas e condizentes com as boas práticas de fabricação. Exemplos: acetona, ácido acético, ácido fórmico, etanol, pentano, dimetilsulfóxido, butanol e trietilamina.

### 3.13 Validação de métodos analíticos

A validação das metodologias analíticas utilizadas no controle de qualidade de produtos farmacêuticos é parte mandatória das Boas Práticas de Fabricação. A RDC 166, que dispõe sobre a validação de métodos analíticos, define que a validação analítica é a avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos (ANVISA, 2017).

A validação deve demonstrar a qualidade do método analítico, demonstrando que esse produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina (ANVISA, 2017) (MAPA, 2011). Além disso, a validação deve garantir a rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade dos resultados para a tomada de decisões. (MAPA, 2011).

Os parâmetros que devem ser considerados para a validação dependem do ensaio a ser realizado, o Quadro 1 mostra os ensaios requeridos para cada tipo de teste.

**Quadro 1** – Parâmetros a serem considerados na validação analítica

Parâmetro Avaliado	Identificação	Teste de Impurezas		Doseamento -dissolução (quantificação) -uniformidade de conteúdo - potência
		Quantitativo	Ensaio Limite	
Exatidão	Não	Sim	Não	Sim
Precisão Repetibilidade	Não	Sim	Não	Sim
Precisão Intermediária	Não	Sim	Não	Sim
Seletividade	Sim	Sim	Sim	Sim
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	Não
Limite de detecção	Não	Não <sup>(a)</sup>	Sim	Não
Linearidade	Não	Sim	Não	Sim
Intervalo	Não	Sim	Não	Sim

Fonte: (ANVISA, 2017). (a) Pode ser necessário em alguns casos

### 3.13.1 Exatidão

É o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados por um método analítico em um determinado ensaio e o valor real de referência, aceito como verdadeiro (VALDERRAMA *et al.*, 2009) (BRASIL, 2017).

A exatidão deve ser verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível (BRASIL, 2017).

Para avaliação da exatidão de um método analítico pode-se utilizar a comparação dos valores obtidos com um material de referência, com um segundo método já validado ou com ensaios de recuperação. (VALDERRAMA *et al.*, 2009).

O Vocabulário Internacional de Metrologia define a veracidade como o “grau de concordância entre a média de um número infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência” esse conceito é semelhante ao apresentado pela RDC 166 para o termo exatidão: a exatidão de um método analítico é obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro. Tendo em vista que para o registro de novos produtos junto a ANVISA deve-se atender as legislações vigentes, o termo adotado nesse trabalho será exatidão.

### 3.13.2 Linearidade

A linearidade é a capacidade do método analítico de responder de forma linear à variação de concentração do analito, dentro de uma determinada faixa de aplicação (GIUDICE, 2016) (BRASIL, 2017).

Ao observar a resposta obtida para as diferentes concentrações de analito é possível obter uma equação de reta formada pelo gráfico resposta versus concentração, pode-se avaliar a linearidade pelo valor do coeficiente de regressão “b”, o intercepto “a” e o coeficiente de correlação “R” (VALDERRAMA *et al.*, 2009) (GIUDICE, 2016).

Espera-se que a resposta analítica seja diretamente proporcional à concentração, sendo assim a equação capaz de prever resultados será uma equação de primeiro grau, representada por:

$$y = bx + a + \varepsilon$$

Onde:

a: coeficiente linear ou intercepto

b: coeficiente angular ou inclinação da reta

$\epsilon$ : erro do modelo.

### **3.13.3 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)**

O limite de detecção refere-se a menor concentração do analito que pode ser detectada, sem, necessariamente ser quantificada. O limite de quantificação refere-se a menor concentração do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis (GIUDICE, 2016) (BRASIL, 2017).

### **3.13.4 Precisão**

A precisão é o grau de concordância entre os resultados obtidos de cada teste quando aplicado repetidamente a várias alíquotas de uma mesma amostra (VALENTINI *et al.*, 2007) (BRASIL, 2017).

A precisão pode ser avaliada em diferentes níveis. A nível de repetitividade, quando é avaliada em condições idênticas, por exemplo, mesmo analista, mesmo dia, mesmas condições ambientais. A nível de precisão intermediária, quando é avaliada em pequenas variações dentro do mesmo laboratório, por exemplo, execução do teste por um analista diferente, execução em dia diferente. A precisão intermediária representa a concordância com os resultados da repetibilidade. A nível de reprodutibilidade, quando são feitos ensaios interlaboratoriais (BRITO *et al.*, 2003) (VALDERRAMA *et al.*, 2009) (GIUDICE, 2016).

### **3.13.5 Seletividade**

A seletividade é a capacidade de medir exata e especificamente o analito de interesse na presença de outros constituintes que possam estar presentes na amostra, por exemplo componentes da matriz e impurezas, além de constituintes do diluente e fase móvel utilizados no método analítico (VALDERRAMA *et al.*, 2009) (BRASIL, 2017).

### **3.13.6 Robustez**

Indica a capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas, por exemplo, temperatura, fluxo e pH de fase móvel. O método é dito robusto quando não é afetado por essas pequenas variações (VALDERRAMA *et al.*, 2009) (BRASIL, 2017).

### 3.14 Validação de processo

A instrução normativa (IN) 47 publicada pela ANVISA em 21 de agosto de 2019 dispõe sobre Boas Práticas de Fabricação complementares às atividades de qualificação e validação, nela está definido que a validação de processos consiste na evidência documentada de que um processo, operado dentro dos parâmetros pré-estabelecidos, pode desempenhar suas funções efetivamente e reprodutivamente para a produção de um medicamento dentro de especificações e atributos de qualidade pré-estabelecidos.

Na validação de processo é comprovado que o processo produtivo está controlado antes que o produto seja disponibilizado para o mercado, e que o sistema produtivo é capaz de fornecer de uma forma constante medicamentos que atendam as especificações farmacêuticas. A validação de processos é particularmente importante nos casos em que é necessário tomar a decisão de liberar ou rejeitar um lote ou um produto antes que todos os testes sejam concluídos, como é o caso da produção de alguns radiofármacos (EANM, 2007). Além dos atributos de qualidade que devem ser atendidos deve-se levar em consideração, também, a radioproteção, de modo a garantir que os radiofármacos sejam preparados em ambiente adequado, com a segurança necessária para o pessoal operacional (TODDE *et al.*, 2017) (GILLINGS *et al.*, 2021).

Na IN 47 é determinado que para compor um estudo de validação de processo é necessário um mínimo de três lotes consecutivos, fabricados sob condições de rotina. Deste modo a atividade inicial do radionuclídeo, reagentes/solventes e suas quantidades, parâmetros automatizados do módulo de síntese, condições de reação, purificação e formulação devem ser os mesmos que se destinam à preparação de rotina do radiofármaco desejado (TODDE *et al.*, 2017).

Os lotes produzidos como parte da validação de processo, devem ser totalmente caracterizados do ponto de vista analítico, com o objetivo de verificar se o produto atende aos critérios de aceitação quanto a todos os parâmetros de qualidade estabelecidos (TODDE *et al.*, 2017).

### 3.15 Estudo de Estabilidade

A estabilidade é definida como o tempo durante o qual uma preparação farmacêutica mantém suas características dentro dos limites especificados, da mesma forma de

quando foi produzida, ou seja, o tempo em que o período de armazenamento não prejudica a segurança e eficácia do produto (SILVA, *et al.*, 2009).

Os estudos de estabilidade são preconizados para garantir que as preparações farmacêuticas mantêm sua integridade química, física e microbiológica dentro dos limites especificados ao longo do tempo, mesmo sob influência dos fatores ambientais (ANSEL *et al.*, 2007) (SILVA, *et al.*, 2009). Estes estudos são utilizados para definir e justificar o prazo de validade e as condições de armazenamento do radiofármaco produzido. (EANM, 2007). Para radiofármacos pode-se definir a estabilidade como o tempo durante o qual o radioisótopo pode ser usado com segurança para a finalidade pretendida. Dessa forma, é importante que sejam realizados controles radioquímicos e radionuclídeos nos estudos de estabilidade de radiofármacos (IAEA, 2006) (MARTINS *et al.*, 2011).

Na IN 80, publicada pela ANVISA em 16 de dezembro de 2020 é regulamentada a documentação necessária para o protocolo de registro de radiofármaco. Nela é preconizado que o estudo de estabilidade é parte da documentação necessária quando deseja-se registrar um novo radiofármaco. Segundo a IN 80, a frequência dos testes que serão realizados na condução do estudo de estabilidade deve ser definida pelo fabricante e deve conter no mínimo cinco pontos, correspondentes a cinco intervalos de tempo feitos após o fracionamento do produto, incluindo o tempo inicial. Para os radiofármacos disponibilizados em frascos multidoses, deve-se investigar a estabilidade após a remoção de doses sucessivas ao longo do prazo de validade proposto (EANM, 2007).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Reagentes e equipamentos

A síntese foi executada no módulo de síntese TRACERLab FX (General Eletric, EUA). Para o controle de qualidade utilizou-se ativímetro Capintec CRC-25R (EUA), cromatógrafo líquido Agilent 1200 com detector ultravioleta e com detector de radioatividade (EUA), cromatógrafo gasoso Perkin Elmer Clarus® 580 com detector FID (do inglês, *Flame Ionization Detector*), micropHmetro Mettler Toledo (EUA) e analisador multicanal com detector de germânio Canberra (EUA).

O reagente etanol absoluto grau HPLC foi adquirido da JT Baker (EUA). Os reagentes acetonitrila grau HPLC, cloreto de potássio P.A., cloreto de sódio P. A., fosfato de potássio monobásico P. A., fosfato de sódio monobásico P. A., ácido fosfórico 85%, peróxido de hidrogênio 30% foram adquiridos da Merck (Alemanha).

A ANVISA recomenda que na validação de métodos analíticos deve-se utilizar Substância Química de Referência Farmacopeica (SQF) oficializada pela Farmacopeia Brasileira, preferencialmente, ou por outros compêndios oficialmente reconhecidos pela Anvisa. As substâncias químicas de referência de PSMA-1007, desfluorotrimetil-PSMA-1007, desfluorohidroxi-PSMA-1007 e o precursor foram comprados da *Advanced Biochemical Compounds* ABX (Alemanha). As substâncias químicas de referência de etanol e dimetilsulfóxido foram adquiridos da *USP Pharmacopeia*. O padrão de tetrabutilamônio foi adquirido da Sigma-Aldrich (EUA). O kit para síntese de  $^{18}\text{F}$ -PSMA-1007, contendo o cassete, os reagentes, e os cartuchos para purificação utilizados, foi adquirido da ABX (Alemanha).

### 4.2 Síntese do radiofármaco $^{18}\text{F}$ -PSMA 1007

A síntese pode ser dividida nas seguintes etapas: produção do  $^{18}\text{F}$ , purificação/isolamento do  $^{18}\text{F}$ , reação de marcação, purificação e formulação.

A primeira etapa da síntese consiste na formação do flúor 18, que agirá como nucleófilo na reação seguinte (COENEN, 2007). O acelerador de partículas do tipo ciclotron (PETtrace 16,5 MeV, General Eletric, EUA), utilizado para produção de flúor radioativo ( $^{18}\text{F}$ ) está instalado no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN), o  $^{18}\text{F}$  produzido no acelerador é enviado por meio de dutos ao módulo de síntese.

No módulo de síntese o processo ocorre de forma totalmente automatizada, utiliza-se o módulo de síntese GE TracerLab Mx (Figura 10), que é instalado no interior de

uma célula quente (Figura 11). Foi adquirido da *Advanced Biochemical Compounds* (ABX) uma sequência de comandos de eventos em tempos definidos para execução da síntese.

**Figura 10** - Módulo de síntese TracerLab Mx

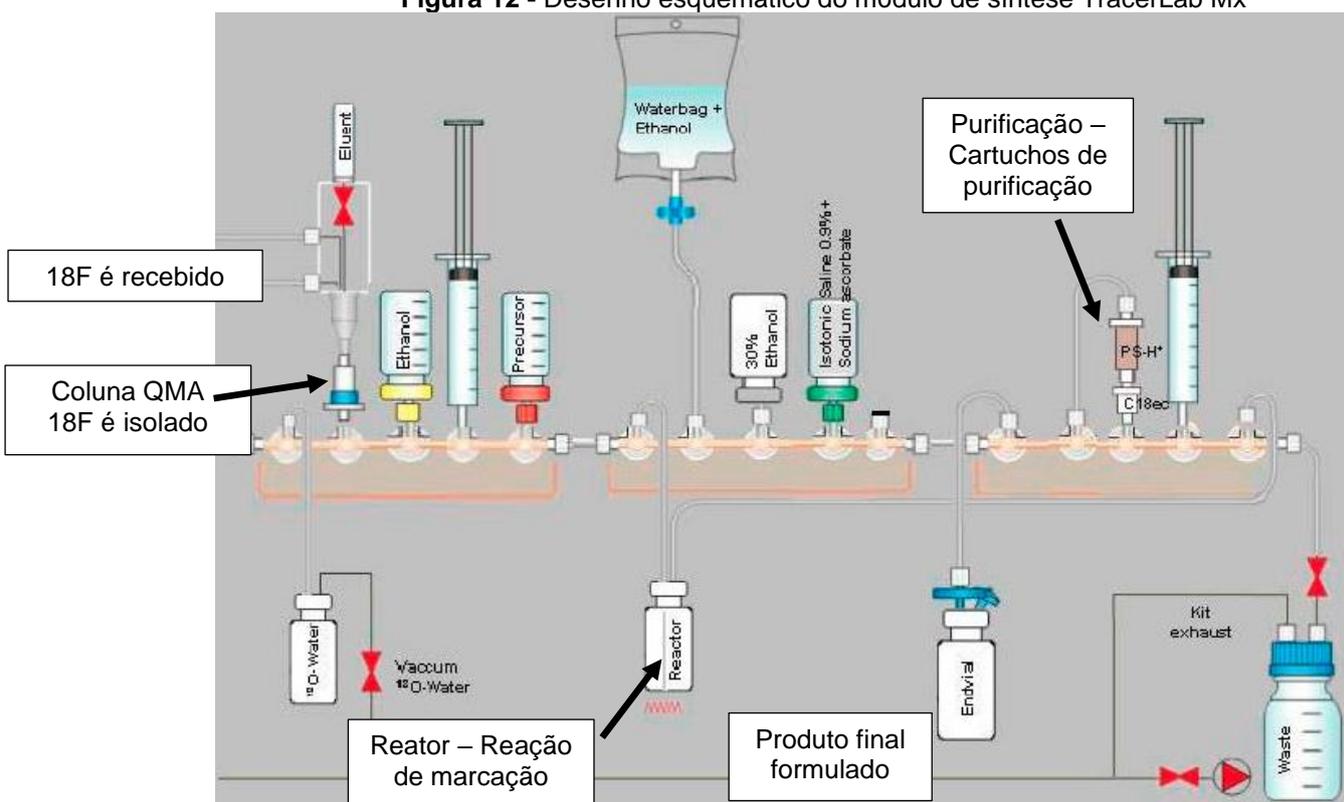


**Figura 11** - Célula quente



Na Figura 12 é mostrado um desenho esquemático do cassete instalado no módulo de síntese TracerLab Mx e destaca-se onde ocorrem cada uma das etapas de síntese a partir da purificação do  $^{18}\text{F}$ .

Figura 12 - Desenho esquemático do módulo de síntese TracerLab Mx



Fonte: Advanced Biochemical Compounds (ABX)

### 4.3 Controle de qualidade do radiofármaco $^{18}\text{F}$ PSMA-1007

A caracterização físico-química do produto foi feita através da inspeção visual, medida de pH, determinação da identidade e pureza radionuclídica, identificação e pureza radioquímica, pureza química e análise de solventes residuais. O radiofármaco  $^{18}\text{F}$  PSMA-1007 não possui monografia na farmacopeia brasileira, dessa forma, deve-se adotar as especificações de monografia presente em farmacopeia reconhecida pela brasileira. Adotou-se as especificações da farmacopeia europeia, apresentadas no Quadro 2.

Quadro 2 – Especificações adotadas para o radiofármaco  $^{18}\text{F}$ -PSMA-1007

Testes	Especificações
Inspeção visual	Solução límpida, incolor ou levemente amarelada.
pH	Entre 4,5 e 8,5
Identificação Radioquímica	O tempo de retenção ( $T_R$ ) da amostra de PSMA-1007( $^{18}\text{F}$ ) no ensaio de Pureza Radioquímica deve ser semelhante ao $T_R$ de PSMA padrão (aproximadamente 8 minutos).
Pureza Radioquímica	A radioatividade de $^{18}\text{F}$ -PSMA-1007 não deve ser inferior a 91% da radioatividade total

continua

**Quadro 2** - Especificações adotadas para o radiofármaco 18F-PSMA-1007 (continuação)

Testes	Especificações
Pureza Química	O tamanho e a intensidade da mancha obtida para amostra de PSMA-1007 (18F) não devem exceder os da mancha obtida para tetrabutylamônio (TBA) padrão 260 µg/mL
PSMA-1007 e substâncias relacionadas	<ul style="list-style-type: none"> <li>A área de PSMA na amostra de PSMA-1007 (18F) não é superior à área do pico obtido para PSMA padrão (10 g/L).</li> <li>A área de qualquer outra impureza não é superior à área do pico obtido para PSMA padrão (10 g/L).</li> <li>Total: A soma das áreas de quaisquer picos significativos não é superior a 5 vezes a área do pico obtido para PSMA padrão 10 g/L.</li> </ul>
Solventes residuais	Dimetilsulfóxido: < 0,5% p/v
Determinação de etanol	< 10% v/v
Identificação Radionuclídica	A meia-vida deve estar entre 105 e 115 minutos.
Pureza Radionuclídica	Não menos do que 99,9% das emissões gama devem corresponder a picos de 511,0 ± 0,5 keV; 1022,0 ± 0,5 keV ou referentes ao espalhamento Compton do flúor-18

Fonte: European Pharmacopoeia Supplement 10.5

#### 4.3.1 Inspeção visual

As amostras foram examinadas visualmente, avaliando-se se essas apresentavam aparência translúcida e ausência de partículas.

#### 4.3.2 pH

O pH foi medido utilizando um micropHmetro. Previamente a realização das medidas o micropHmetro foi calibrado com soluções padrões de pH 4,0, 7,0 e 9,0. E posteriormente o eletrodo foi submerso na amostra para leitura direta.

#### 4.3.3 Identificação e pureza radionuclídica

A identificação radionuclídica foi feita a partir do cálculo da meia-vida física ( $t_{1/2}$ ) do radionuclídeo. Usou-se ativímetro Capintec para aquisição de 4 valores de atividade espaçados entre si em 10 minutos. Os valores medidos foram colocados na fórmula, obtendo-se, assim, o valor de  $T_{1/2}$  do radionuclídeo.

**Equação 2** - Equação para cálculo do tempo de meia-vida

$$T_{1/2} = \frac{(0,693)t}{\ln (A_0/A)}$$

Onde:  $A_0$  = atividade inicial

$A$  = atividade medida no tempo  $t$

$t$  = intervalo de tempo (em minutos) entre duas medidas ( $t_A - t_{A0}$ )

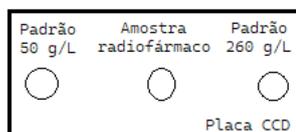
A pureza radionuclídica foi analisada utilizando o espectrômetro de raios gama com detector de germânio. Em um frasco ampola contendo 15,0 mL de água adicionou-se 1 µL do radiofármaco. A amostra diluída foi colocada no equipamento para contagem por 600 segundos.

#### 4.3.4 Pureza química

A avaliação da pureza química foi realizada por meio de ensaio-limite, que permite verificar se a quantidade do analito está acima ou abaixo de um nível previamente estabelecido, sem o quantificar com exatidão. Nesse caso, objetiva-se verificar se a quantidade de tetrabutylamônio (TBA) presente na amostra, após a purificação do radiofármaco, encontra-se dentro de limites aceitáveis.

Utilizou-se padrão de TBA na concentração do limite da especificação, 260,0 g/L, e um segundo padrão na concentração de 50,0 g/L. Padrões e amostra foram aplicados conforme Figura 13 e em seguida aplicou-se 1 µL de solução de peróxido de hidrogênio 30%. Após secagem a placa foi colocada em recipiente contendo iodo para revelação das manchas.

**Figura 13** - Aplicação de padrões e amostra para avaliação de pureza química



#### 4.3.5 Pureza radioquímica

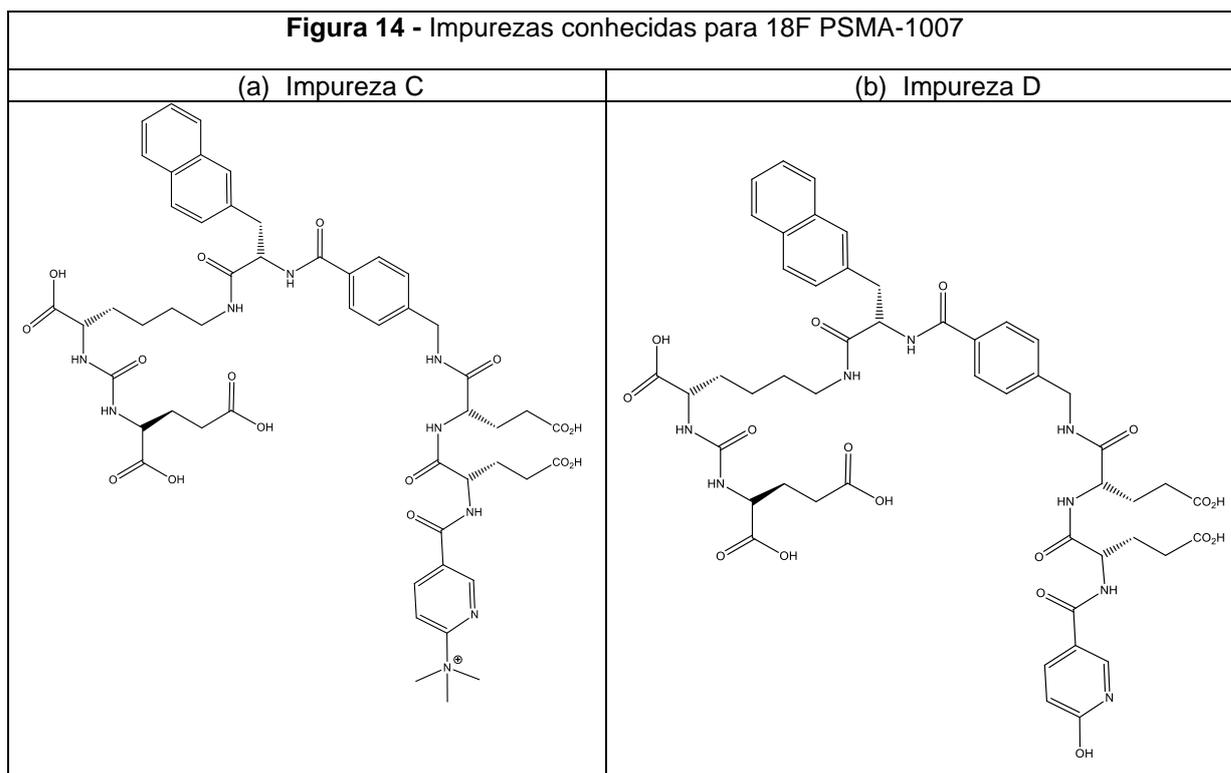
A determinação da pureza radioquímica do  $^{18}\text{F}$  PSMA-1007 foi avaliada por cromatografia líquida. Foi utilizado Cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo Agilent HP 1200 (CRLPD-01) equipado com um detector de radioatividade (Raytest – Gabi Star) e UV-VIS com comprimento de onda de 225 nm.

Utilizou-se coluna Zorbax C18 (150 x 4,6) mm, 2,7 µm, como fase móvel utilizou-se uma solução fosfato pH 2,5 (Fase móvel A) e acetonitrila (Fase móvel B), modo gradiente. Testou-se diferentes modos de gradiente e fluxo afim de encontrar melhor resultado de separação. Estabeleceu-se o gradiente mostrado na Tabela 3 e fluxo de 1 mL/min.

**Tabela 3** - Gradiente de fase móvel

Tempo (min)	Fase móvel A	Fase móvel B
0	90	10
03'00	90	10
05'00	70	30
08'00	40	60
08'10	90	10
12'00	90	10

Há duas impurezas conhecidas que devem ser avaliadas, uma delas é o próprio precursor da reação, chamada impureza D (Figura 14 a) e a outra é formada quando esse reage com um grupo hidroxila, ao invés do fluoreto  $^{18}\text{F}$ , chamada impureza C (Figura 14 b).



Fonte: Farmacopéia Européia

Preparou-se uma solução para adequação do sistema, contendo as impurezas C e D, para avaliação da resolução entre os picos, e uma solução padrão de PSMA-1007 10,0 g/L, não radioativa. A solução de adequação foi injetada uma vez e a solução padrão de PMSA não radioativo, em triplicata; a amostra de  $^{18}\text{F}$  PSMA-1007 também foi injetada em triplicata. A pureza radioquímica foi determinada pela medida da área

relativa ao pico de  $^{18}\text{F}$  PSMA-1007 em relação ao total de contagens pelo detector de radioatividade.

Para avaliação da resolução entre os picos utilizou-se a equação apresentada na Farmacopéia Brasileira:

**Equação 3** – Equação para cálculo do parâmetro de resolução

$$R = 2 \frac{(t_2 - t_1)}{W_1 + W_2}$$

em que

$t_2$  e  $t_1$  = tempos de retenção das duas substâncias da mistura;

$W_1$  e  $W_2$  = respectivas larguras dos picos na linha de base, pelo método da triangulação;

#### 4.3.6 Solventes Residuais

Para determinação dos solventes etanol e dimetilsulfóxido (DMSO) utilizou-se cromatógrafo gasoso (*Perkin Elmer, Clarus 580*) com uma coluna DB WAX 30 m x 0,25 mm sílica fundida coberta com camada de 0,50  $\mu\text{m}$  ligação cruzada de polietilenoglicol (Agilent J&W). O gás hélio (He) foi utilizado como gás de arraste com fluxo conforme mostrado no Tabela 4. As temperaturas do injetor e do detector FID foram mantidas a 250 °C e 300 °C, respectivamente. A temperatura do forno foi estabelecida conforme Tabela 5.

**Tabela 4** - Fluxo do gás de arraste

Fluxo	Tempo de espera
4.0	0.50
8.0	Final

**Tabela 5** - Temperatura da coluna

Taxa de variação	Temperatura	Tempo de espera
0.0	120	0.01
45.0	210	0.00

A solução padrão (etanol (8% v/v) e DMSO e (0,3% p/v)) e a amostra foram injetadas em triplicatas em um volume de 1,0  $\mu\text{L}$ . A comparação dos tempos de retenção (TR) e das áreas de cada pico (do inglês, *area under curve*, AUC) permitiu a identificação e a quantificação dos solventes na amostra.

## **4.4 Validação Analítica**

### **4.4.1 Método para avaliação de pureza química**

A avaliação da pureza química deve ser feita por meio de ensaio-limite, que permite verificar se a quantidade do analito está acima ou abaixo de um nível previamente estabelecido, sem o quantificar com exatidão. Nesse caso, objetiva-se verificar se a quantidade de TBA presente na amostra, após a purificação do radiofármaco, encontra-se dentro de limites aceitáveis.

No caso de ensaio limite, devem ser avaliados os parâmetros de seletividade e de limite de detecção (BRASIL, 2017).

### **4.4.2 Método para avaliação de pureza radioquímica e determinação de solventes residuais**

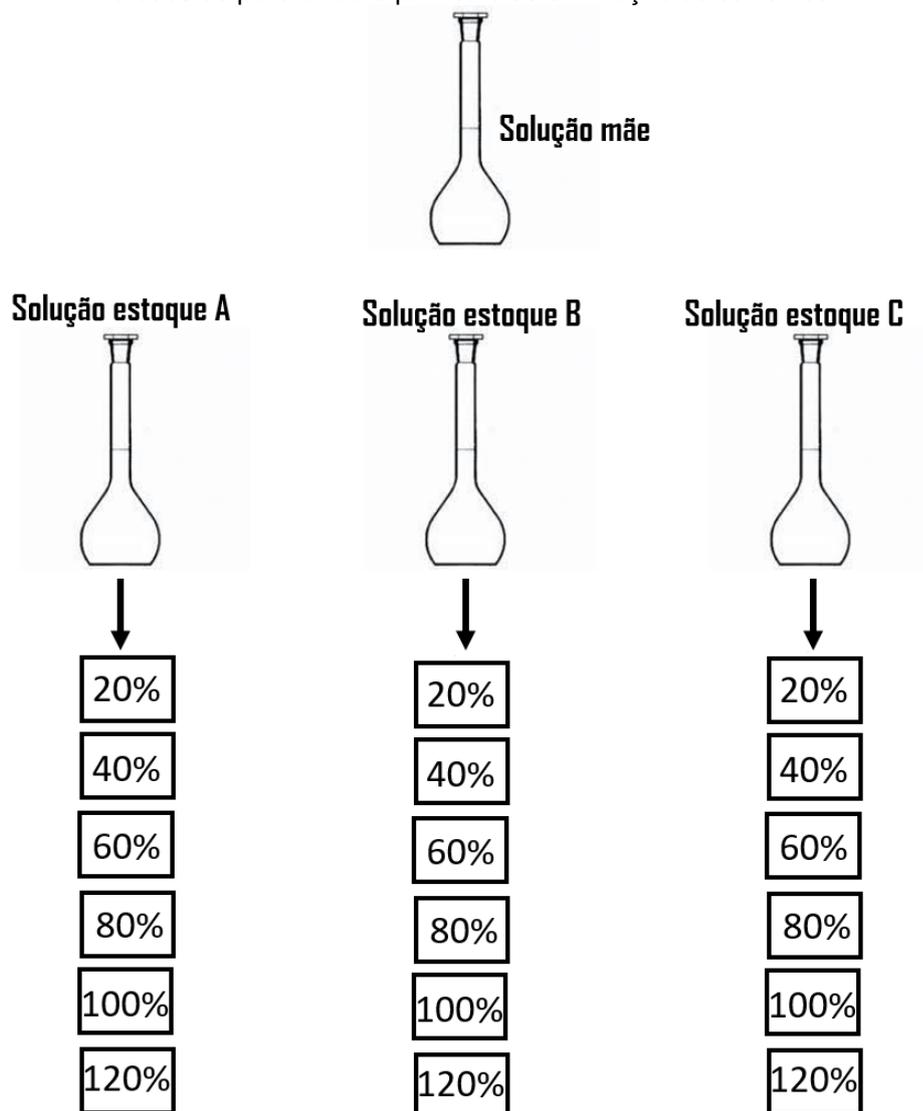
O método de avaliação de pureza radioquímica enquadra-se tanto em um tipo de método de doseamento quanto de substâncias relacionadas, e o método para avaliação dos solventes, etanol e DMSO, enquadra-se em um teste de impurezas quantitativo, dessa forma, conforme o Quadro 1 (página 38), deve-se avaliar todos os parâmetros para esses métodos.

### **4.4.3 Parâmetros avaliados nas validações analíticas**

#### **4.4.3.1 Linearidade**

Para análise da linearidade do método analítico estabeleceu-se seis diferentes concentrações. Preparou-se uma solução mãe, essa foi diluída formando três soluções estoque, de mesma concentração, e a partir dessas preparou-se cada um dos seis níveis da curva de calibração, conforme mostrado na Figura 15.

**Figura 15** - Esquema para preparação das soluções utilizadas para avaliação da linearidade nos métodos de pureza radioquímica e determinação de solventes



Inicialmente os dados foram plotados em um gráfico área obtida versus concentração e discutiu-se a análise visual dos pontos. Após detectar que há relação linear aparente seguiu-se com a análise de variâncias.

O método dos mínimos quadrados (MMQ) foi utilizado para estimar a equação de reta. Para definir se o modelo adequado é o método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP) ou método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), utilizou-se o teste de Cochran.

Para avaliação dos coeficientes, linear e angular, utilizou-se a ferramenta de análise de regressão linear e o teste de Análise de Variância ANOVA do *software* Excel. A

avaliação do coeficiente de correlação foi feita por meio do coeficiente de correlação de Pearson (r), obtido na equação de reta.

Para a detecção de outliers aplicou-se o teste dos resíduos padronizados de Jackknife.

Para avaliação gráfica da normalidade, homocedasticidade e independência dos resíduos utilizou-se o *software* Minitab.

#### 4.4.3.2 Limite de detecção e limite de quantificação

Para o método colorimétrico utilizado na determinação de pureza química, o limite de detecção foi determinado pela menor concentração para a qual foi possível constatar o efeito visual esperado.

Para os métodos instrumentais de pureza radioquímica e solventes residuais os limites de detecção e quantificação foram determinados por parâmetros baseados na curva analítica. Utilizou-se os dados do estudo de linearidade obtidos a partir da análise de regressão. Para cálculo dos valores de LD e LQ utilizou-se a equação 4 mostrada abaixo.

**Equação 4** – Equação para cálculo de LD e LQ

$$L = \frac{s \times F}{b}$$

Onde:

s: desvio padrão

b: inclinação da curva de calibração

F: fator, igual a 3,3 para limite de detecção e 10 para limite de quantificação.

O desvio padrão (s) foi obtido a partir do desvio padrão do intercepto (Sa) com o eixo Y, que pode ser determinado pela equação 5 mostrada abaixo:

**Equação 5** – Equação para cálculo do desvio padrão do intercepto

$$S_a = S_{\frac{y}{x}} \sqrt{\frac{\sum (x)^2}{n \sum (x - \bar{x})^2}}$$

Onde,

$S_{\frac{y}{x}}$ : desvio padrão do intercepto;

x: valor individual de concentração;

$\bar{x}$ : Valor médio de concentração;

n: número de medições.

#### 4.4.3.3 Exatidão

Para avaliação da exatidão preparou-se uma solução matriz, a qual contém todos os componentes da formulação do radiofármaco  $^{18}\text{F}$  PSMA-1007, exceto o PSMA-1007. A solução matriz utilizada para os preparos de exatidão do método de solventes residuais além de não conter o PSMA-1007 não continha também etanol.

Para o método de pureza radioquímica a solução matriz foi contaminada com três diferentes concentrações conhecidas de padrão de PSMA-1007 e avaliou-se a recuperação do PSMA-1007 quando adicionado à matriz.

Para o método de solventes residuais, que utiliza a técnica de cromatografia gasosa, a solução matriz foi contaminada com três diferentes concentrações conhecidas de padrão de etanol e de padrão de DMSO e avaliou-se a recuperação desses solventes quando adicionados à matriz.

A exatidão foi determinada pela relação entre a concentração média, determinada experimentalmente, e a concentração teórica correspondente, dada pela equação abaixo:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Equação 6 – Equação para cálculo da exatidão}}{\text{concentração média experimental}} \times 100$$
$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

Foram calculados os percentuais de recuperação para cada concentração. Para o método de pureza radioquímica, que utiliza a técnica de cromatografia líquida, esses percentuais devem atender aos critérios estabelecidos na Tabela 6, que fornece os intervalos de recuperação médios desejados para as diferentes concentrações do analito. Quanto menor a concentração do analito, maior o intervalo da recuperação média aceitável. Para o método de solventes residuais, que utiliza a técnica de cromatografia gasosa, esses percentuais devem estar na faixa de recuperação de 80 – 120% (USP, 2022)

**Tabela 6** - Recuperação esperada em função da concentração do analito

Analito %	Fração de massa	Unidade	Recuperação média %
100	1	100%	98 - 102
10	10 <sup>-1</sup>	10%	
1	10 <sup>-2</sup>	1%	97 - 103
0,1	10 <sup>-3</sup>	0,1%	95 - 105
0,01	10 <sup>-4</sup>	100 ppm (mg/kg)	90 - 107
0,001	10 <sup>-5</sup>	10 ppm (mg/kg)	80 - 110
0,0001	10 <sup>-6</sup>	1 ppm (mg/kg)	
0,00001	10 <sup>-7</sup>	100 ppb (µg/kg)	
0,000001	10 <sup>-8</sup>	10 ppb (µg/kg)	60 - 115
0,0000001	10 <sup>-9</sup>	1 ppb(µg/kg)	40 - 120

Fonte: AOAC,2016

#### 4.4.3.4 Precisão

Para avaliação da precisão utilizou-se seis injeções de solução amostra. A avaliação foi feita por meio do desvio padrão relativo (DPR) entre as replicatas da precisão repetibilidade e o DPR entre as replicatas da precisão intermediária.

O DPR deve ser calculado da seguinte forma:

**Equação 7** – Equação para cálculo do desvio padrão relativo

$$DPR = \frac{S}{CMD} \times 100$$

Onde,

DPR = desvio padrão relativo;

S = desvio padrão;

CMD = concentração média determinada;

100 = fator de porcentagem.

Para o método de pureza radioquímica os valores de DPR aceitáveis foram baseados na Tabela 7.

Para o método de determinação de solventes utilizou-se DPR máximo de 5%, esse valor é utilizado pela Farmacopeia Brasileira para outros radiofármacos que utilizam a mesma técnica para a determinação de solventes residuais (FB, 2020)

**Tabela 7** - DPR aceitável para diferentes concentrações de analito em soluções para avaliação da precisão

Analito %	Fração de massa	Unidade	DPR %
100	1	100%	1,3
10	10 <sup>-1</sup>	10%	1,9
1	10 <sup>-2</sup>	1%	2,7
0,1	10 <sup>-3</sup>	0,1%	3,7
0,01	10 <sup>-4</sup>	100 ppm (mg/kg)	5,3
0,001	10 <sup>-5</sup>	10 ppm (mg/kg)	7,3
0,0001	10 <sup>-6</sup>	1 ppm (mg/kg)	11
0,00001	10 <sup>-7</sup>	100 ppb (µg/kg)	15
0,000001	10 <sup>-8</sup>	10 ppb (µg/kg)	21
0,0000001	10 <sup>-9</sup>	1 ppb(µg/kg)	30

Fonte: AOAC,2016

#### 4.4.3.5 Seletividade

Para o método utilizado para a determinação de pureza química avaliou-se a presença de resposta positiva para as preparações que continham o analito, sendo elas a amostra de  $^{18}\text{F}$ -PSMA-1007, o padrão de PSMA-1007 e a solução matriz contaminada com padrão de PSMA-1007. E avaliou-se ausência de resposta para a solução matriz. Para o método cromatográfico de pureza radioquímica realizou-se injeções de diluente, fase móvel e solução matriz, a fim de identificar possíveis interferentes. Além disso, preparou-se o padrão de PSMA-1007 em solução diluente e em solução matriz, a fim de avaliar se a solução matriz possui algum interferente capaz de afetar a recuperação do analito de interesse, para essa avaliação fez-se uma comparação das médias de áreas utilizando-se teste t (*t de Student*).

Para o método de determinação de solventes residuais preparou-se padrões de etanol e de DMSO em solução matriz e em água e por meio do teste t fez a comparação das áreas obtidas nas injeções.

#### 4.5 Validação de processo e estudo de estabilidade

Realizou-se três sínteses do radiofármaco  $^{18}\text{F}$  PSMA-1007 para condução dos estudos de validação de processo e estabilidade, os três lotes de produto acabado obtidos foram utilizados para a realização dos testes.

Tendo em vista que os lotes produzidos para o estudo de validação de processos devem ser totalmente caracterizados do ponto de vista analítico (EANM, 2007), foram realizados todos os testes físico-químicos que devem ser realizados rotineiramente para atestar a qualidade dos lotes produzidos. A caracterização físico-química do produto acabado foi feita através da inspeção visual, medida de pH, determinação da identidade e pureza radionuclídica, identificação e pureza radioquímica, pureza química e análise de solventes residuais (EANM, 2007).

Para o estudo de estabilidade, o radiofármaco foi avaliado por até 10 horas após sua síntese, em intervalos de 2,5 horas, totalizando 5 resultados de avaliação, incluindo o inicial. Foram realizadas perfurações sucessivas na tampa de borracha do frasco-ampola, simulando o uso real do produto, cuja embalagem é multidoso. O radiofármaco foi mantido no frasco-ampola de vidro com tampa, dentro da blindagem de tungstênio, em câmara climática qualificada, por até 10 horas após a síntese. A câmara climática foi mantida na temperatura de  $40 \pm 2$  °C e umidade de  $75 \pm 5\%$  UR,

essa condição é utilizada nos estudos de estabilidade acelerada, representando, portanto, uma condição crítica de armazenamento (BRASIL, 2019b).

Para realização do estudo de estabilidade definiu-se o seguinte cronograma, que mostra os testes que foram realizados em cada ponto do estudo.

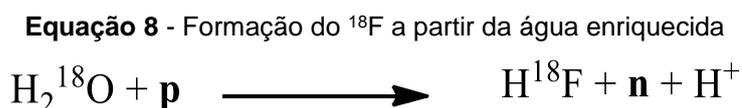
**Quadro 3** – Cronograma de testes realizados no decorrer dos intervalos do estudo de estabilidade

Ensaio	Intervalos após o fracionamento				
	0 h	2,5 h	5 h	7,5 h	10 h
Inspeção visual	X	X	X	X	X
pH	X	X	X	X	X
Identificação radionuclídica	X	X	X	X	X
Pureza radionuclídica	X	X	X	X	X
Identificação radioquímica	X	X	X	X	X
Pureza radioquímica	X	X	X	X	X
Solventes residuais	X	X	X	X	X

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Síntese do radiofármaco $^{18}\text{F}$ PSMA-1007

O bombardeio de prótons acelerados na água enriquecida com oxigênio-18 ( $^{18}\text{O}$ ) leva a produção do flúor-18 ( $^{18}\text{F}$ ), por meio de uma reação em que há ganho de um próton e a perda de um nêutron. (Equação 8).



O ácido fluorídrico contendo o flúor 18 produzido é solubilizado em água e enviado para o módulo de síntese, onde será retido em uma coluna QMA (*Quaternary Methyl Ammonium*). A coluna QMA é composta por material de amônio quaternário ligado a sílica, sendo, portanto, uma coluna de troca catiônica. Nessa ocorre a segunda etapa, a purificação do flúor 18 uma vez que esse será retido e a água e as impurezas aniônicas serão descartadas (CARDINALE *et al.*, 2017). Em seguida, o ânion fluoreto, marcado com flúor 18, será eluído da coluna por uma solução de carbonato de tetrabutilamônio, ( $\text{TBA}\text{CO}_3^-$ ). O ânion eluído é enviado ao reator, por meio da aplicação de vácuo. No reator, ocorre a etapa de marcação, o  $^{18}\text{F}^-$  encontra o precursor solubilizado em dimetilsulfóxido, os quais reagem por cerca de 10 minutos a uma temperatura de 105 °C. Na reação tem-se a substituição de um grupo amino trimetil amônio ( $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$ ) pelo flúor 18. A reação ocorre com a liberação do grupo trimetilamina e a formação do produto fluorado marcado, conforme pode ser observado na Figura 9 (página 26).

Decorrido o tempo da reação, o produto formado é solubilizado em uma solução de etanol 5% v/v e conduzido para próxima etapa. Na etapa seguinte deve ser feita a purificação do produto, que ocorre por meio de dois cartuchos, um cartucho de troca catiônica e outro cartucho apolar, acoplados nessa ordem. Ao passar pelo cartucho de troca catiônica impurezas iônicas, assim como o TBA presente, são retidas, o  $^{18}\text{F}$ -PSMA segue para o cartucho C18 onde ficará retido. Os cartuchos são lavados com solução aquosa de etanol 5% v/v e posteriormente o radiofármaco eluído com solução aquosa de etanol 30% v/v.

Na etapa final é feita a formulação do produto, por meio da adição de solução salina tamponada com fosfato, PBS (do inglês *Phosphate Buffered Saline*), e também, ascorbato de sódio solubilizado em PBS. O ascorbato de sódio tem importante papel

de estabilizador da formulação, uma vez que evita a radiólise. (CARDINALE *et al.*, 2017). Por fim, o produto é submetido a filtração esterilizante, realizada por meio de um filtro 0,22 µm.

Realizaram-se cinco sínteses completas, uma forma de avaliar a eficiência do processo é por meio do cálculo de rendimento, que pode ser obtido dividindo-se a atividade do radiofármaco no fim da síntese pela atividade inicial de <sup>18</sup>F recebida no início do processo global, como na equação abaixo:

**Equação 9:** Equação para cálculo do rendimento

$$\text{Rendimento não corrigido} = \frac{\text{Atividade final do radiofármaco} \times 100}{\text{Atividade inicial } F^{18}}$$

Para cálculo de rendimento corrigido deve-se levar em consideração o decaimento do radionuclídeo. Nesse trabalho optou-se por expressar os resultados na forma de rendimento não corrigido.

Nas cinco sínteses do produto executadas, observou-se variação de tempo de duração das sínteses e de rendimento entre as sínteses. O tempo médio de síntese foi de 38 minutos e o rendimento médio do processo foi de 33%.

**Tabela 8 -** Valores de atividade, tempo e rendimento das sínteses realizadas

Síntese	Tempo de duração (min)	Atividade solicitada ao ciclotron (GBq)	Atividade produzida (GBq)	Atividade inicial ( <sup>18</sup> F) (GBq)	Atividade final (GBq)	Rendimento do processo
1	38	74	81,400	77,950	24,6	32%
2	36	148	164,246	151,922	58,0	38%
3	37	148	177,008	157,028	34,5	22%
4	41	74	88,800	84,323	35,5	42%
5	37	74	88,800	84,360	25,9	31%

A variação observada para os rendimentos obtidos também foi descrita por Cardinale (2017), para 16 ensaios de sínteses realizadas em um módulo de síntese de mesma marca comercial do utilizado nesse trabalho, obteve-se uma variação de 24,3% a 82,4%.

## 5.2 Metodologia analítica para avaliação da pureza química – Limite de TBA

Inicialmente, optou-se por testar a metodologia apresentada na Farmacopeia Européia, que utiliza a técnica de cromatografia de camada delgada (CCD). No método farmacopeico é descrito como fase estacionária uma placa de sílica gel e como fase móvel uma solução de hidróxido de amônio:metanol (0,5:100), a revelação

é feita colocando a placa em uma cuba contendo vapor de iodo platinado. Aplica-se 2  $\mu$ L de padrão e 2  $\mu$ L de amostra e, após eluição, compara-se a intensidade das manchas obtidas. Para testar esse método aplicou-se em uma placa concentrações crescentes do padrão, 500 g/L (A), 1000 g/L (B) e 2000 g/L (C) (Figura 16 a), para que fosse possível calcular o fator de retenção (Rf) do TBA, e em outra placa fez-se o teste aplicando o padrão na concentração de 260 g/L (D), que corresponde ao limite da especificação e a amostra de  $^{18}\text{F}$  PSMA-1007 (E) (Figura 16 b).

Figura 16 - Resultados obtidos para teste realizado com método farmacopeico	
	
(a) Padrão de TBA 500 g/L (A), 1000 g/L (B) e 2000 g/L(C).	(b) Padrão de TBA 260 g/L (D) e amostra de $^{18}\text{F}$ PSMA (E)

O método farmacopeico não apresentou resultados satisfatórios, embora tenha sido possível identificar o Rf do TBA, uma vez que para crescentes concentrações observou-se aumento da intensidade da mancha. Na placa mostrada na Figura 16 b não se identificou o TBA, observa-se apenas uma mancha, na aplicação da amostra, que não coincide com Rf referente ao TBA. Diante disso, fez-se necessário o desenvolvimento de uma metodologia para essa avaliação.

Halvorsen e Kvernenes (2020) descrevem que na presença de antioxidantes na formulação, por exemplo o ascorbato, não é possível observar mancha referente ao TBA. O aparecimento da mancha deve-se ao complexo formado entre o TBA e a platina (IV), na presença do ascorbato esse reduz a platina (IV) a platina (II), impossibilitando a formação do complexo, por isso, não é possível identificar a presença de TBA, acredita-se que isso está relacionado à ineficiência do método

farmacopeico. Esses autores apresentaram uma metodologia alternativa para a avaliação do TBA em formulações que contém antioxidante. O método alternativo consiste na aplicação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que irá oxidar a platina (II) a platina (IV), permitindo a formação do complexo da platina com TBA. Além disso, ao invés de utilizar uma CCD utiliza-se um método de “*spot-test*”, nesse não é necessária a eluição, faz as aplicações em ponto único seguida da revelação. Assim, testou-se novo método para avaliação do TBA no radiofármaco  $^{18}F$  PSMA-1007. Aplicou-se em uma placa de sílica 1  $\mu$ L de padrão de TBA 260 g/L e 1  $\mu$ L de amostra, após secos aplicou-se 1  $\mu$ L de  $H_2O_2$  tanto no padrão quanto na amostra e colocou-se a placa em cuba contendo vapor de iodo para revelação. A Figura 17 mostra o resultado obtido para esse teste.

**Figura 17** - Resultados obtidos para a aplicação de 1,0  $\mu$ L de padrão 260 g/L + 1,0  $\mu$ L  $H_2O_2$  / aplicação de 1,0  $\mu$ L de amostra + 1,0  $\mu$ L  $H_2O_2$



O método apresentado mostrou-se satisfatório para avaliação de TBA em amostra de  $^{18}F$  PSMA-1007, observou-se uma mancha pouco intensa para a amostra, mostrando que embora presente o TBA encontra-se dentro dos limites especificados. Para confirmar a capacidade do método de produzir um resultado positivo para presença de TBA no limite da especificação realizou-se o seguinte teste: uma quantidade de amostra de  $^{18}F$  PSMA-1007 foi contaminada com padrão de TBA 260 g/L, aplicou-se a amostra sem padrão de TBA, a amostra contaminada com padrão de TBA e o padrão de TBA 260 g/L, o resultado obtido é mostrado na Figura 18. É possível observar que quando o TBA está presente na amostra em concentração próxima a do limite da especificação a mancha obtida apresentou tamanho e intensidade semelhante ao do padrão, o que confirma a eficiência do método.

**Figura 18** - Resultados obtidos para aplicação de 1,0  $\mu\text{L}$  de amostra + 1,0  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  / aplicação de 1,0  $\mu\text{L}$  de amostra contaminada com padrão + 1,0  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  / aplicação de 1,0  $\mu\text{L}$  de padrão + 1,0  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$



### 5.3 Validação de metodologia analítica para avaliação da pureza química – Limite de TBA

#### 5.3.1 Seletividade

Para avaliação da seletividade as soluções foram aplicadas na seguinte ordem: solução matriz, padrão, amostra e amostra+padrão (Figura 19).

**Figura 19** - Aplicação de 1  $\mu\text{L}$  de matriz, 1  $\mu\text{L}$  de padrão 260 g/L, 1  $\mu\text{L}$  de amostra e 1  $\mu\text{L}$  de amostra + padrão



A matriz aplicada não apresentou nenhuma resposta para o teste, o que garante que a matriz do radiofármaco não interfere na detecção do analito de interesse. O padrão de TBA no limite da especificação apresentou mancha que possui tamanho, cor e intensidade facilmente detectados visualmente. A amostra contaminada com padrão no limite da especificação apresentou mancha de tamanho, cor e intensidade semelhante à do padrão aplicado individualmente. A amostra, que se encontra dentro dos limites especificados, apresentou mancha visivelmente menos intensa que o padrão.

Diante disso, o método mostrou-se seletivo para avaliação de TBA, uma vez que mostrou sua capacidade de avaliar, de forma inequívoca, o TBA na presença de

componentes que possam estar presentes, por exemplo, componentes da matriz do próprio radiofármaco.

### 5.3.2 Limite de detecção

Para avaliação do limite de detecção aplicou-se padrão de TBA nas seguintes concentrações 260 g/L, 50 g/L, 25 g/L, 12,5 g/L, 6,25 g/L e 3,125 g/L. (Figura 20)

**Figura 20** - Aplicação de padrão de TBA em diferentes concentrações para avaliação de LD



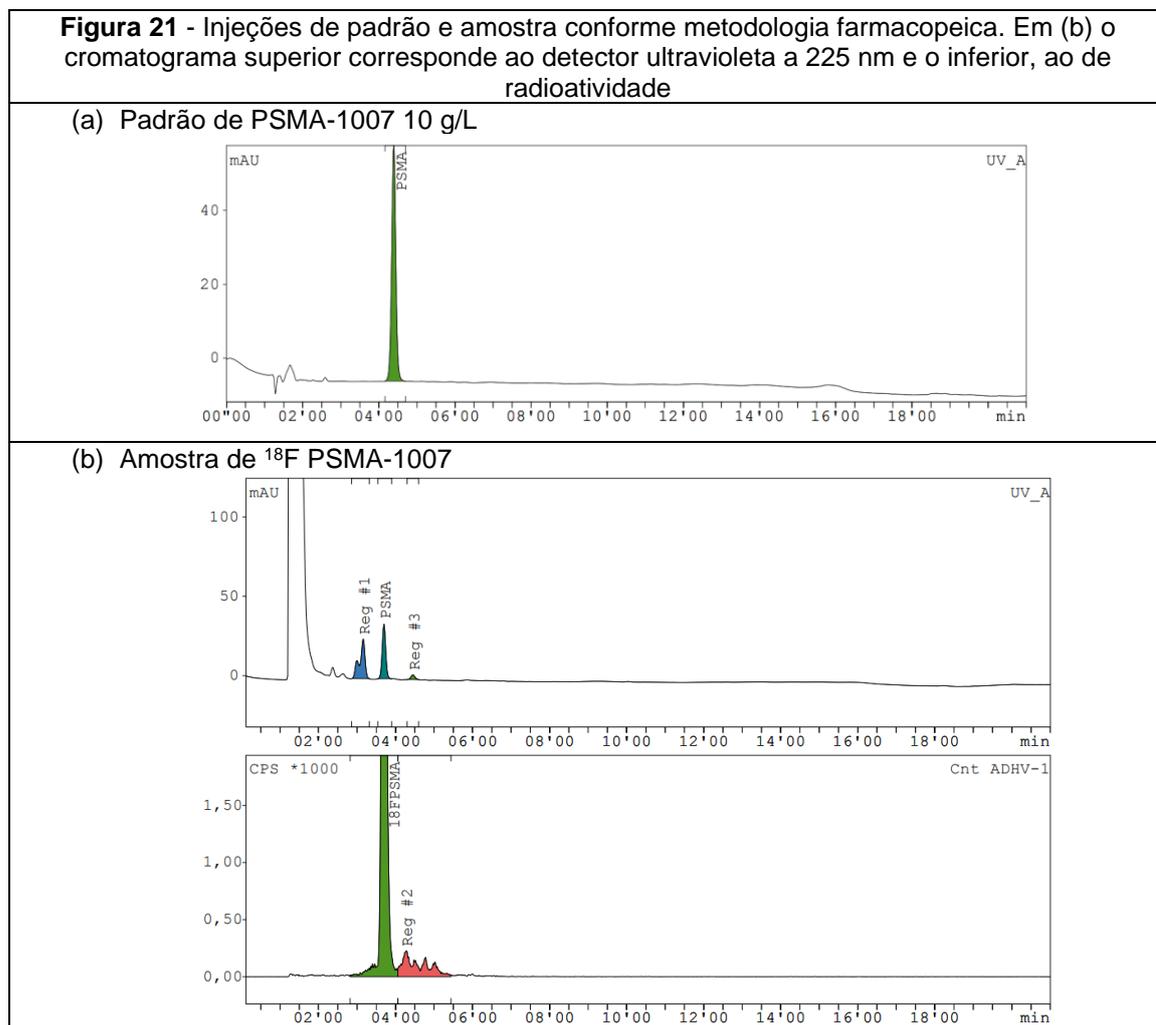
A mancha correspondente ao limite da especificação (260 g/L) apresentou tamanho, cor e intensidade facilmente detectados visualmente. A concentração de 3,125 g/L foi definida como LD para esse método, uma vez que a mancha obtida apresentou intensidade fraca. Como a concentração definida para LD está muito abaixo do limite de especificação (260 g/L), que será utilizado na rotina de análise do produto, o método mostrou-se satisfatório.

Uma vez que atendeu aos parâmetros de seletividade e limite de detecção o método para avaliação da pureza química encontra-se validado.

### 5.4 Metodologia analítica para avaliação da pureza radioquímica – Avaliação de $^{18}\text{F}$ PSMA-1007, PSMA-1007 e substâncias relacionadas

Inicialmente optou-se por testar a metodologia apresentada na Farmacopeia Européia, que utiliza a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). O método farmacopeico utiliza uma coluna cromatográfica C18 (150 x 4,6) mm – 2,7  $\mu\text{m}$ , como fase móvel utiliza um gradiente composto por uma solução fosfato pH 2,5 (Fase móvel A) e acetonitrila (Fase móvel B), com fluxo de 1,3 mL/min, tempo de corrida de 21 minutos e comprimento de onda de 225 nm, além de detector de radioatividade. Nessas

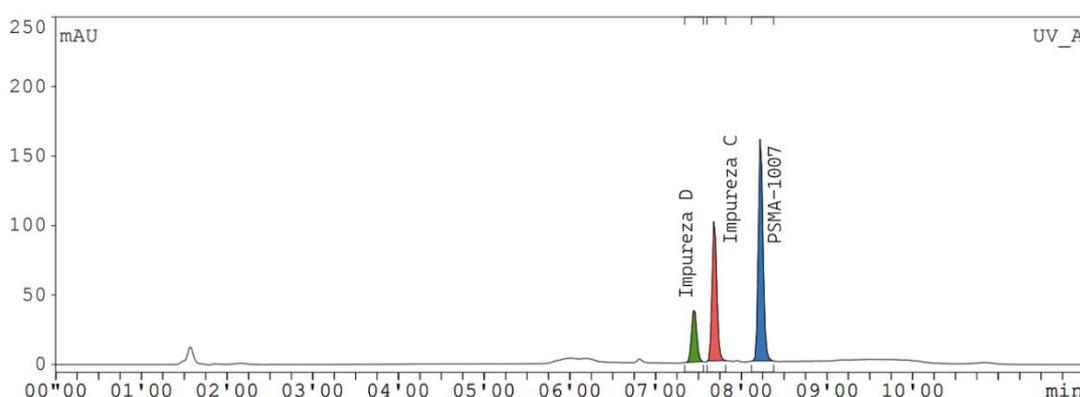
condições injetou-se solução padrão de PSMA-1007 10 g/L e solução amostra e obteve-se os cromatogramas mostrados na Figura 21.



Embora tenha sido possível identificar o pico referente ao PSMA-1007, obteve-se TR = 4min. Segundo a monografia da Farmacopeia Europeia há duas impurezas conhecidas, identificadas como impureza C e impureza D, que eluem antes do pico de PSMA-1007, dessa forma, o TR muito próximo ao início da corrida poderia dificultar a separação desses picos. Inicialmente, a substância química de referência dessas impurezas não estava disponível, não sendo possível injeção dessas para avaliação. Diante disso, optou-se por manter a coluna e a fase móvel usadas pelo método farmacopeico e alterar o gradiente de fase móvel, na tentativa de aumentar o TR do pico do PSMA-1007, e, se possível, diminuir o tempo de corrida, uma vez que quanto menor o tempo de corrida mais rápido pode-se liberar resultados, tornando mais ágil a liberação do uso do radiofármaco em pacientes.

O método farmacopeico inicia-se com uma proporção 77:23 de Fase móvel A: Fase móvel B, a fim de tornar a eluição mais lenta optou-se por diminuir a força da fase móvel e o fluxo. Iniciou-se o gradiente com uma proporção 90:10 de Fase móvel A: Fase móvel B e fluxo de 1 mL/min, a partir disso fez-se alterações de proporção de fase móvel no decorrer do tempo de corrida para obter separação adequada das impurezas e do PSMA. Com o novo gradiente proposto foi possível separar adequadamente os picos, reduzir o TR do PSMA-1007 para 8 minutos, além de reduzir o tempo de corrida para 12 minutos. Já com os padrões de impurezas disponível, foi possível injetá-los para avaliar a separação (Figura 22).

**Figura 22** - Cromatograma obtido da injeção dos padrões de impureza C, impureza D e PSMA-1007.



Observou-se TR= 07'28 para Impureza D, TR=07'41 para Impureza C e TR=08'14 para PSMA-1007.

Para cálculo das resoluções utilizou-se a equação 3, todos os valores foram convertidos para segundos, conforme mostrado na tabela abaixo:

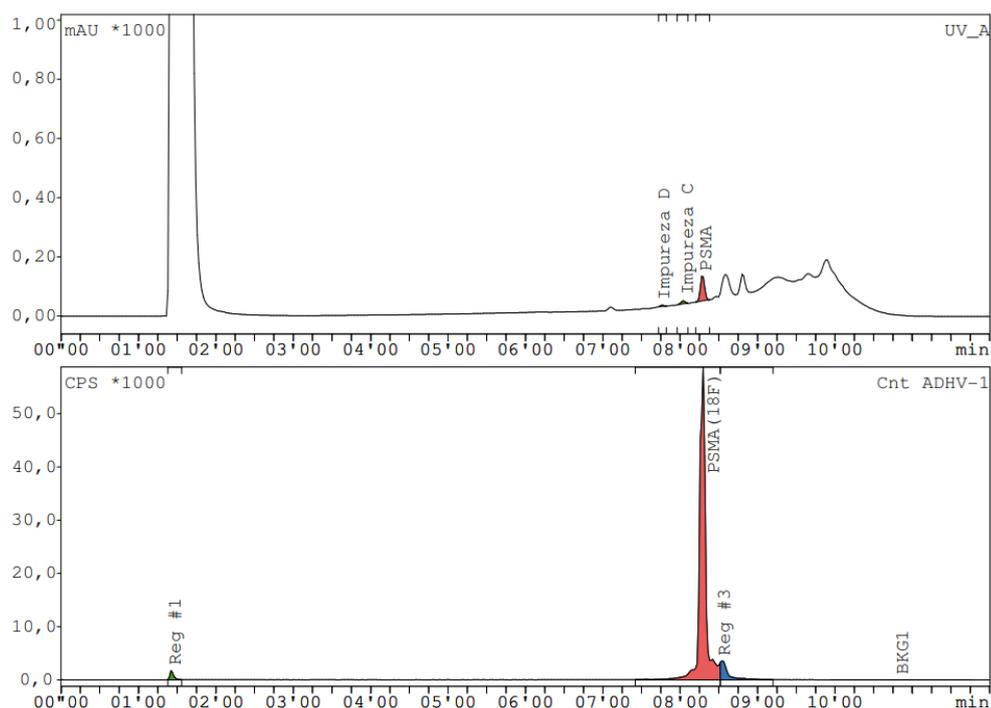
**Tabela 9** - Valores de largura dos picos, tempo de retenção e resolução de picos

	<b>W (seg)</b>	<b>Tempo de retenção (seg)</b>	<b>Resolução</b>
Impureza D	11,4	448	
Impureza C	7,8	461	1,4
PSMA	15,0	494	2,9

Obteve-se resolução entre as impurezas D e C de 1,4 e entre o PSMA e a impureza C de 2,9. tendo em vista que na condição definida o método atendeu a todos os parâmetros de validação analítica, a separação mostrou-se adequada.

Para a solução amostra também se observou separação adequada dos picos presentes (Figura 23).

**Figura 23** - Cromatograma obtido da amostra do produto  $^{18}\text{F}$  PSMA-1007. Cromatograma superior corresponde ao detector ultravioleta a 225 nm e o inferior, ao de radioatividade



O método analítico desenvolvido mostrou-se satisfatório, embora baseado no método farmacopeico devido as alterações feitas, fez-se necessário sua validação.

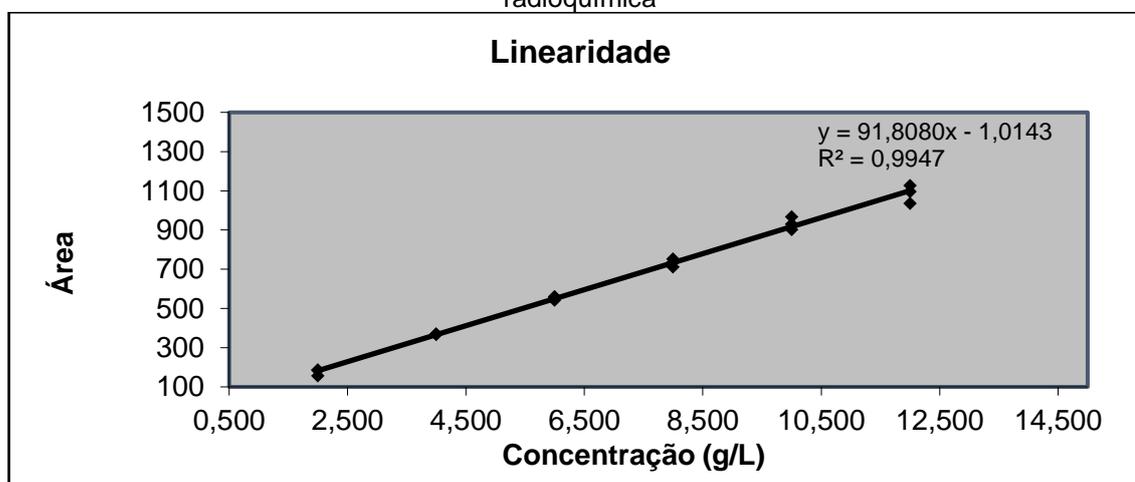
## 5.5 Validação da metodologia analítica para avaliação da pureza radioquímica – Avaliação de $^{18}\text{F}$ PSMA-1007, PSMA-1007 e substâncias relacionadas

### 5.5.1 Linearidade

Os dados obtidos para o teste de linearidade são mostrados na Tabela 10 e dispostos na Figura 24. Ao avaliar visualmente o gráfico obtido na Figura 24 verifica-se que os pontos dispostos no gráfico têm relação linear aparente.

**Tabela 10** - Dados obtidos para Linearidade

Nível (%)		Concentração (g/L)	Área	
20	1	a	2,000	185,2
		b	2,000	157,1
		c	2,000	185,3
40	1	a	4,000	368,0
		b	4,000	367,5
		c	4,000	370,5
60	1	a	6,000	561,0
		b	6,000	553,9
		c	6,000	541,9
80	1	a	8,000	752,6
		b	8,000	736,8
		c	8,000	712,2
100	1	a	10,000	966,8
		b	10,000	901,6
		c	10,000	929,7
120	1	a	12,000	1.126,8
		b	12,000	1.096,2
		c	12,000	1.036,4

**Figura 24** - Gráfico gerado para os dados de linearidade do método de avaliação de pureza radioquímica

A partir da análise de regressão linear obteve-se a equação de reta mostrada a seguir e os coeficientes mostrados na Tabela 11.

**Equação 9** – Equação de reta obtida para PSMA-1007

$$y = 91,8080x - 1,0143$$

**Tabela 11** - Coeficientes obtidos pela regressão linear

Coeficientes da reta	
Coeficiente de Pearson (r):	0,9973
Coeficiente de Determinação (R <sup>2</sup> ):	0,9947
Coeficiente angular (Inclinação da Reta)	91,8080
Coeficiente linear (Intercepto da Reta)	-1,0143

Para definir se o modelo deve ser ajustado conforme MMQO ou MMQP aplicou-se o Teste de Cochran, as hipóteses estão definidas na Tabela 12 e os resultados mostrados na Tabela 13.

**Tabela 12** - Hipóteses e conclusões estabelecidas para Teste de Cochran – Avaliação da Homocedasticidade

Teste de Cochran		
Hipóteses	Critério de decisão	Conclusão
Hipótese nula (H <sub>0</sub> ): Não existe diferença significativa entre as variâncias.	Se $C_{\text{calculado}} < C_{\text{Crítico}}$ , aceita-se a hipótese nula (H <sub>0</sub> ).	Não há diferença estatística significativa entre as variâncias (situação denominada homocedasticidade) - Recomendável utilizar MMQO
Hipótese alternativa (H <sub>1</sub> ): Existe diferença significativa entre as variâncias.	Se $C_{\text{calculado}} > C_{\text{Crítico}}$ , rejeita-se a hipótese nula (H <sub>0</sub> ).	Há diferença estatística significativa entre as variâncias (situação denominada heterocedasticidade) - Recomendável utilizar MMQP

**Tabela 13** - Variâncias calculadas para aplicação do Teste de Cochran

Avaliação da igualdade de variâncias - Teste de Cochran			
Variância em 20	265,0	Maior variância	2113,2
Variância em 40	2,56		
Variância em 60	93,6	Soma das variâncias	3957,9
Variância em 80	413,6		
Variância em 100	1069,8	C calculado	0,5339
Variância em 120	2113,2		

O valor de C tabelado para 6 pontos com 3 réplicas é 0,616, sendo  $C_{\text{calculado}} < C_{\text{tabelado}}$ , portanto, aceita-se a hipótese nula (H<sub>0</sub>) de que não há diferença estatística significativa entre as variâncias, logo os dados são homocedásticos e recomenda-se utilizar o modelo MMQO.

Para avaliação dos coeficientes angular (b) e linear (a) aplicou-se o teste ANOVA, que foi realizado utilizando o Excel.

A comprovação da significância do coeficiente angular permite determinar se o valor de y efetivamente varia em função de x, por isso, é fundamental para que seja demonstrada a linearidade do método. Essa avaliação será realizada por meio do

teste F da Anova. A Tabela 14 apresenta os critérios para avaliação do coeficiente angular.

**Tabela 14 - Critérios de decisão para avaliação do coeficiente angular**

<b>Avaliação da inclinação</b>		
<b>Hipóteses</b>	<b>Critério de decisão</b>	<b>Conclusão</b>
$H_0: b=0$	$F_{calculado} \geq F(\alpha, 1, n-2), \Rightarrow$ rejeita-se a hipótese nula	Rejeita-se a hipótese de que $b=0$ e assume-se que $y$ efetivamente varia em função de $x$ e que o método pode ser considerado linear
$H_1: b \neq 0$	$F_{calculado} < F(\alpha, 1, n-2), \Rightarrow$ aceita-se a hipótese nula	Aceita-se a hipótese de que $b=0$

A avaliação do coeficiente linear ( $a$ ) permite determinar se na rotina de análise, para execução do método analítico em questão, deve ser padronizado o uso de uma curva de calibração ou de um ponto único. Espera-se que o coeficiente linear não seja estatisticamente diferente de zero. Essa avaliação será feita avaliando-se o valor-p obtido para a interseção no teste Anova. A Tabela 15 apresenta os critérios para avaliação do coeficiente linear.

O valor-p que será usado para tomada de decisão deve ser calculado com nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ).

**Tabela 15 - Critérios de decisão para avaliação do coeficiente linear**

<b>Avaliação do intercepto</b>		
<b>Hipóteses</b>	<b>Critério de decisão</b>	<b>Conclusão</b>
$H_0: a=0$	$p\text{-valor} \leq 0,05 \Rightarrow$ rejeita-se a hipótese nula	O intercepto é diferente de zero ao nível de significância de 5%
$H_1: a \neq 0$	$p\text{-valor} > 0,05 \Rightarrow$ aceita-se a hipótese nula	O intercepto é igual a zero ao nível de significância de 5%.

Os resultados obtidos com aplicação do teste Anova são mostrados na Tabela 16.

**Tabela 16 - Dados ANOVA**

<b>ANOVA</b>					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	1770029,21	1770029,21	3005,005246	1,21863E-19
Resíduo	16	9424,43192	589,0269951		
Total	17	1779453,64			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>
Interseção	-1,014257778	13,0446677	-0,077752673	0,938988844
Variável X 1	91,80800905	1,67478072	54,81792814	1,21863E-19

A comprovação da significância do coeficiente angular obteve-se valor de  $F$  tabelado igual a 4,4939 e o valor de  $F$  calculado igual a 3005,0052, diante disso, rejeita-se a hipótese de que  $b=0$  e assume-se que  $y$  efetivamente varia em função de  $x$ , e o método pode ser considerado linear.

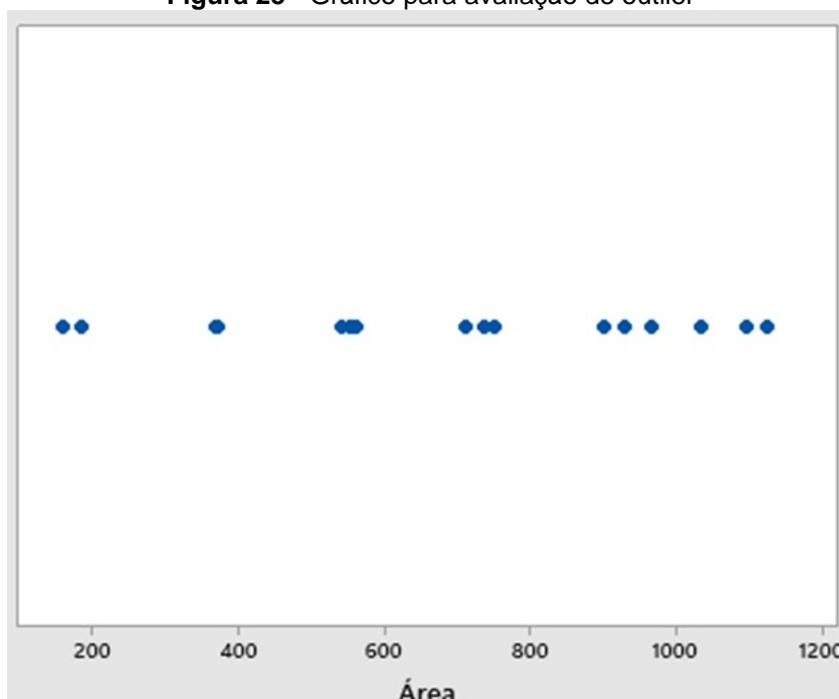
O valor-p obtido para interseção no teste Anova foi 0,93898, sendo esse maior que 0,05, aceita-se a hipótese nula e conclui-se que o intercepto é igual a zero ao nível de significância de 5%. Assim, verifica-se que a utilização de um método de ponto único na rotina de análise, ao invés de um método com curva de calibração é adequado para a rotina de análise.

De acordo com a RDC 166 o valor mínimo do coeficiente de correlação ( $r$ ) deve ser de 0,990, obteve-se  $r = 0,997$ , o que indica forte correlação entre as duas variáveis, área e concentração.

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido foi 0,9947, esse valor mostra que conhecendo  $x$  é possível prever 99,47% da variação de  $y$ , portanto, o modelo proposto é significativo, uma vez que variabilidade que o modelo explica (variância da regressão) é maior que a porcentagem de variabilidade que o modelo não explica (variância dos resíduos).

Para avaliação de outlier utilizou-se um gráfico para outliers gerado pelo software Minitab, não foi observado nenhum ponto deslocado no gráfico gerado, o que sugere ausência de outlier (Figura 25).

**Figura 25** - Gráfico para avaliação de outlier



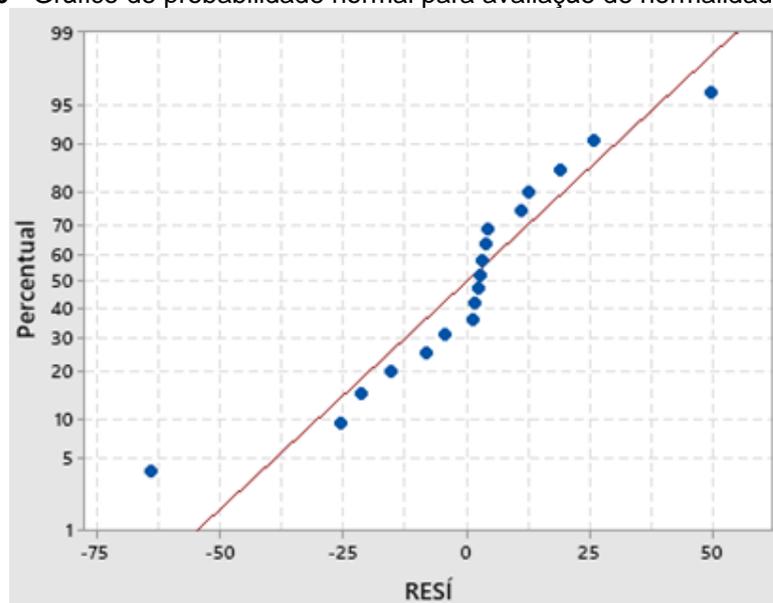
A avaliação da normalidade, homocedasticidade e independência dos resíduos foi feita por análise gráfica, os gráficos foram obtidos com o *software* Minitab.

Para a avaliação da normalidade dos resíduos utilizou-se um gráfico de probabilidade normal mostrado na Figura 26, a proximidade dos pontos a reta traçada é indicativa da normalidade dos resíduos.

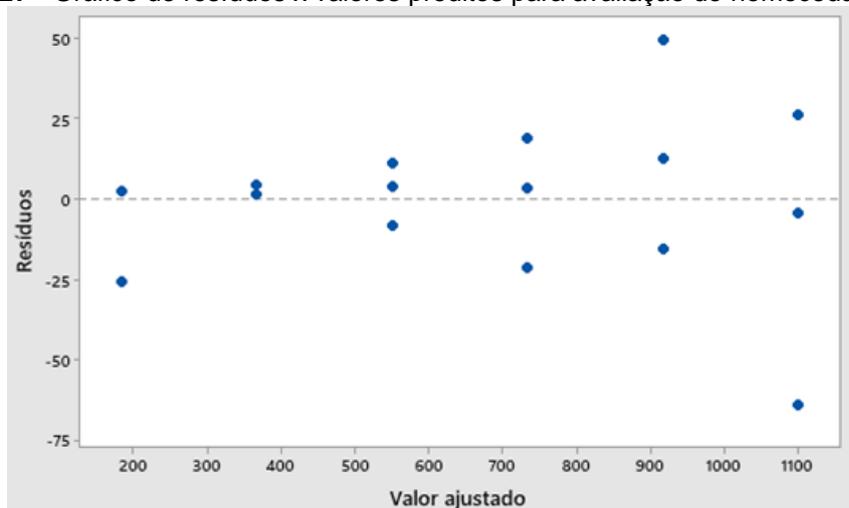
O gráfico dos resíduos versus valores preditos, mostrado na Figura 27, foi utilizado para verificar a homocedasticidade dos dados. Não foi observado comportamento ou tendência, o que sugere que a variância dos resíduos é homocedástica.

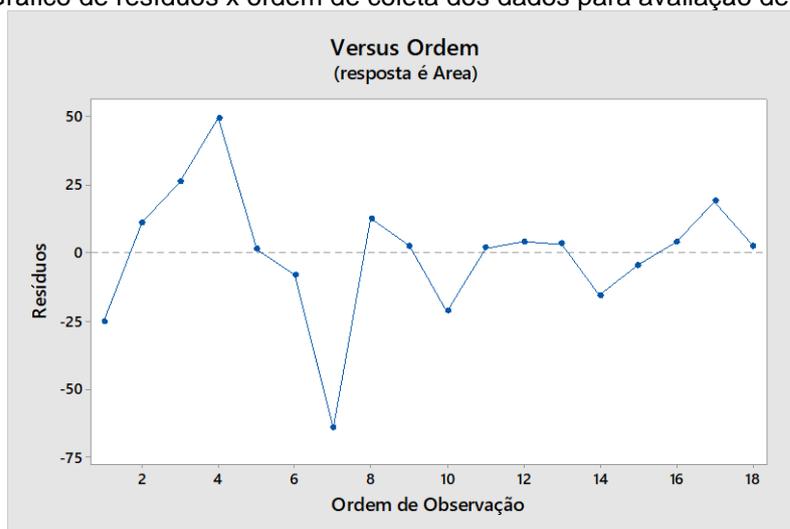
A análise de independência dos resíduos, Figura 28, foi feita por meio do gráfico dos resíduos versus a ordem da coleta dos dados, não há indícios de dependência dos resíduos uma vez que não se observa tendência dos pontos, não há um comportamento dos pontos que se repete em determinado ponto do gráfico.

**Figura 26** - Gráfico de probabilidade normal para avaliação de normalidade de dados



**Figura 27** - Gráfico de resíduos x valores preditos para avaliação de homocedasticidade

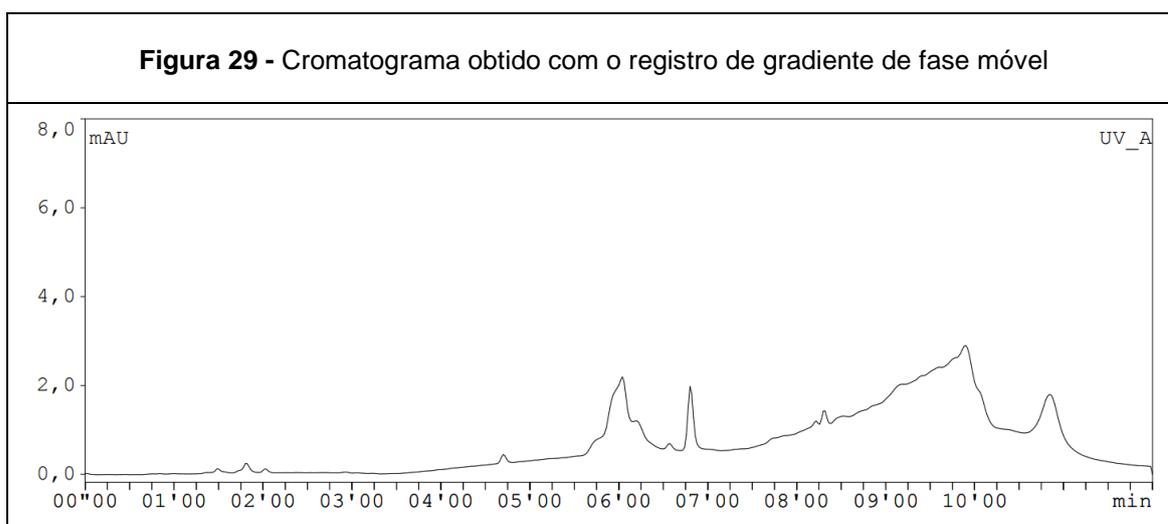


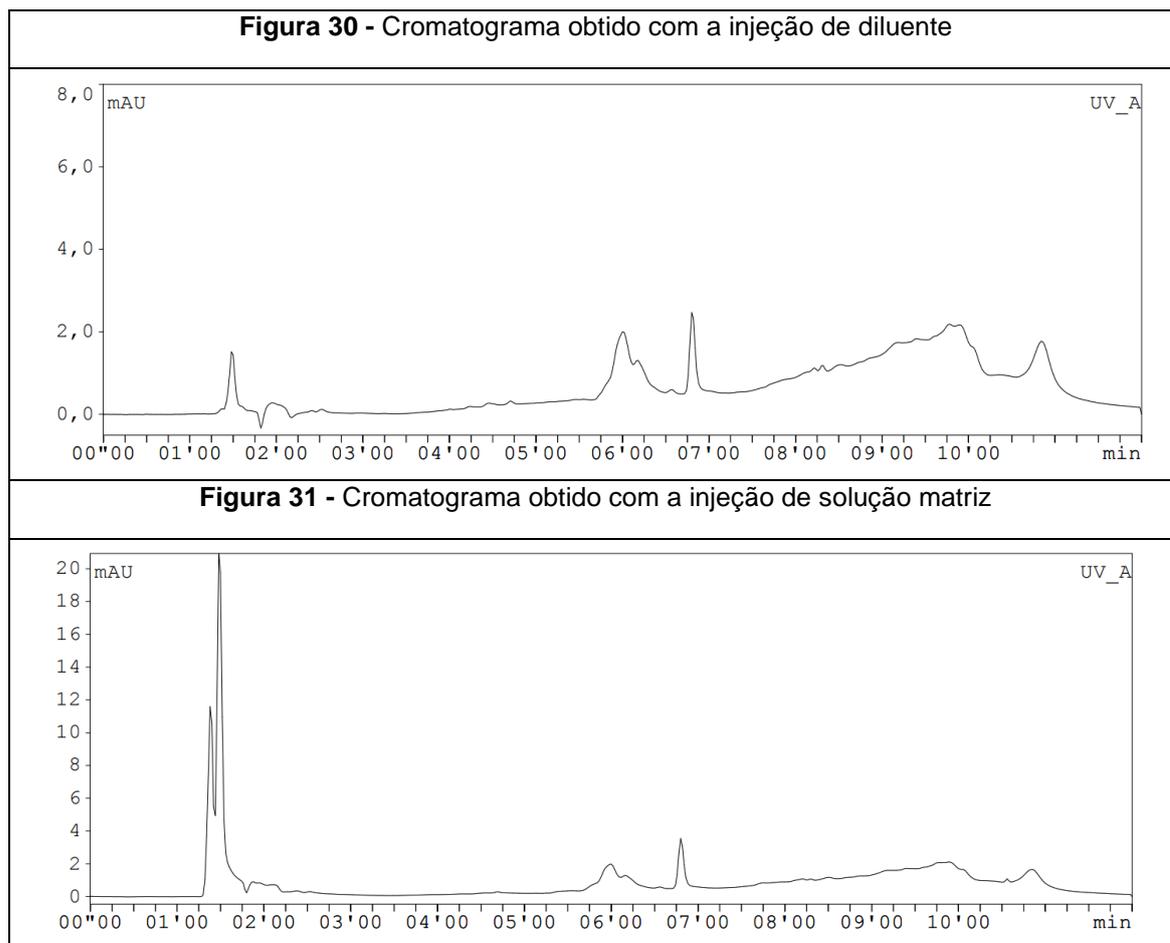
**Figura 28** - Gráfico de resíduos x ordem de coleta dos dados para avaliação de independência

Os critérios para linearidade foram atendidos e os resíduos têm distribuição normal, são homocedásticos e independentes, diante disso, o modelo que se ajusta ao método proposto é linear.

### 5.5.2 Seletividade

As injeções de fase móvel, diluente e solução matriz são mostradas nas Figuras 29, 30 e 31. Em nenhuma delas observou-se picos nos tempos de retenção, 08'14, do PSMA-1007 ou das impurezas conhecidas, Impureza C e D. Dessa forma, constata-se que essas soluções não apresentam componentes capazes de interferir na quantificação dos analitos de interesse.





Preparou-se solução padrão de PSMA-1007 10 g/L em solução diluente e em solução matriz e avaliou-se os valores de área que foram registrados com as injeções dessas soluções, mostrados na Tabela 17.

**Tabela 17 - Resultados de área obtido com as injeções de padrão para avaliação de seletividade**

	<b>Padrão 10 g/L em diluente</b>	<b>Padrão 10 g/L em solução matriz</b>
Área	936,06280	943,64080
	938,88400	894,13990
	939,45600	922,90950
Média	<b>938,13427</b>	<b>920,23007</b>

Aplicou-se teste F (Tabela 18) e concluiu-se que a variância observada para os dois grupos apresentava diferença estatística significativa. Assim, prosseguiu-se para avaliação da diferença entre as médias, aplicando teste t presumindo variância diferente entre os dois grupos, as hipóteses criadas e os resultados obtidos são mostrados na Tabela 19. O teste t permitiu concluir que não há diferença entre a média de área da solução padrão preparada em diluente comparada com a média de área da solução padrão preparada em solução matriz, assim, conclui-se que os

componentes da solução matriz não interferem na quantificação do analito de interesse, o PSMA-1007.

**Tabela 18** - Hipóteses criadas e resultados obtidos para avaliação de variâncias através do teste F

<b>Teste F - Avaliação das variâncias</b>		
<b>Hipótese nula:</b>	Não há diferença estatística entre as variâncias	
<b>Hipótese alternativa:</b>	Há diferença estatística entre as variâncias	
<b>p &gt; 0,05</b>	Aceita-se a hipótese nula	
<b>p &lt; 0,05</b>	Rejeita-se a hipótese nula	
<b>Média</b>	938,13427	920,23007
<b>N</b>	3	3
<b>Desvio Padrão</b>	1,81660	24,85899
<b>(Desvio padrão)<sup>2</sup></b>	3,30003	617,96930
<b>F</b>	187,26191	
<b>Probabilidade associada (p)</b>	0,00531	
<b>CONCLUSÃO</b>	Há diferença estatística entre as variâncias	

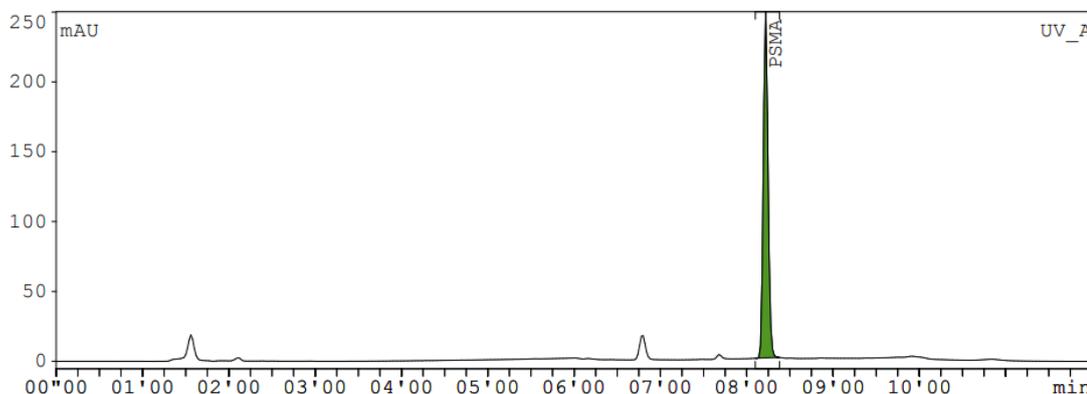
**Tabela 19** - Hipóteses criadas e resultados obtidos para avaliação de médias através do teste t

<b>Teste t - Avaliação das médias</b>		
<b>Hipótese nula:</b>	Não há diferença estatística entre as médias	
<b>Hipótese alternativa:</b>	Há diferença estatística entre as médias	
<b>P(T&lt;=t) bi-caudal &gt; 0,05</b>	Aceita-se a hipótese nula	
<b>P(T&lt;=t) bi-caudal &lt; 0,05</b>	Rejeita-se a hipótese nula	
Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes		
	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	938,1342667	920,2300667
Variância	3,300026613	617,9692974
Observações	3	3
Hipótese da diferença de média	0	
Gl	2	
Stat t	1,244158161	
P(T<=t) uni-caudal	0,169738382	
t crítico uni-caudal	2,91998558	
P(T<=t) bi-caudal	0,339476764	
t crítico bi-caudal	4,30265273	
t crítico bi-caudal	2,776445105	
<b>CONCLUSÃO</b>	Não há diferença estatística entre as médias	

As Figuras 32 e 33 mostram um cromatograma obtido com a solução padrão preparada em diluente e um cromatograma com a solução preparada em solução matriz, respectivamente.

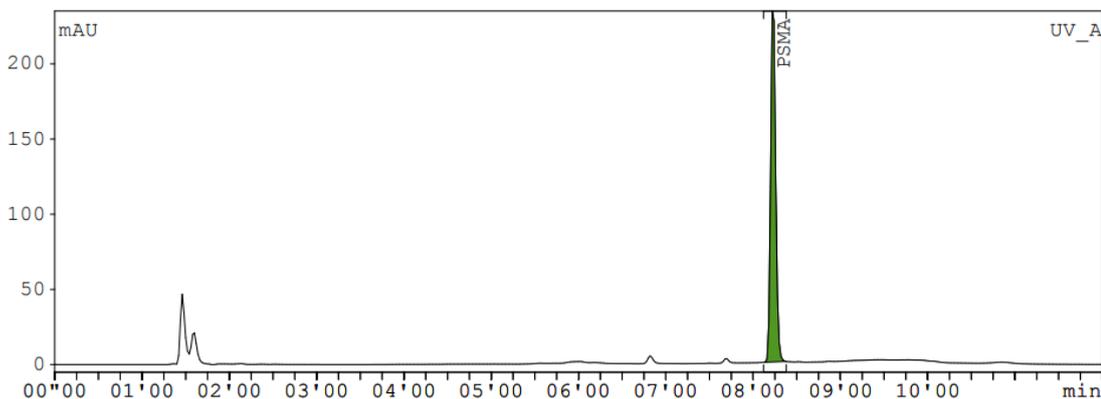
**Figura 32** - Cromatograma obtido em detector ultravioleta a 225 nm com a solução padrão de PSMA-1007 10 g/L preparada em diluente

Measurement Sol\_Padrao\_120122\_A UPPR-CDTN Page 1/1  
c:\gina\_nt\18F-PSMA CDTN\SOL\_PADRAO\_120122\_A Print date: 14/01/2022



**Figura 33** - Cromatograma obtido em detector ultravioleta a 225 nm com a solução padrão de PSMA-1007 10 g/L preparada em solução matriz

Measurement Matriz\_Padrao\_120122\_A UPPR-CDTN Page 1/1  
c:\gina\_nt\18F-PSMA CDTN\MATRIZ\_PADRAO\_120122\_A Print date: 14/01/2022



O método proposto apresentou seletividade adequada para a análise do analito PSMA-1007.

### 5.5.3 Exatidão

Para avaliação da exatidão foram preparadas três triplicatas da solução matriz contaminadas com a solução padrão de PSMA-1007, contemplando o intervalo linear de 80 a 120% da concentração de trabalho do método analítico, que é de 10 g/L. Deste modo, foram preparadas soluções nas concentrações: baixa (8 g/L), média (10 g/L) e alta (12 g/L), com três réplicas em cada nível.

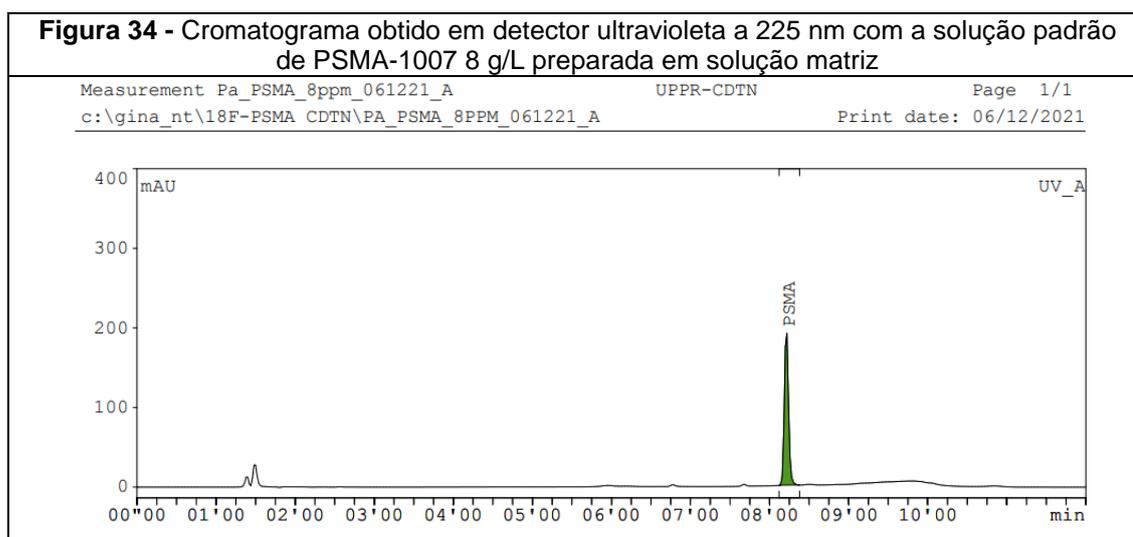
Os dados obtidos são mostrados nas Tabela 20.

**Tabela 20** - Resultados obtidos com as injeções para avaliação da exatidão

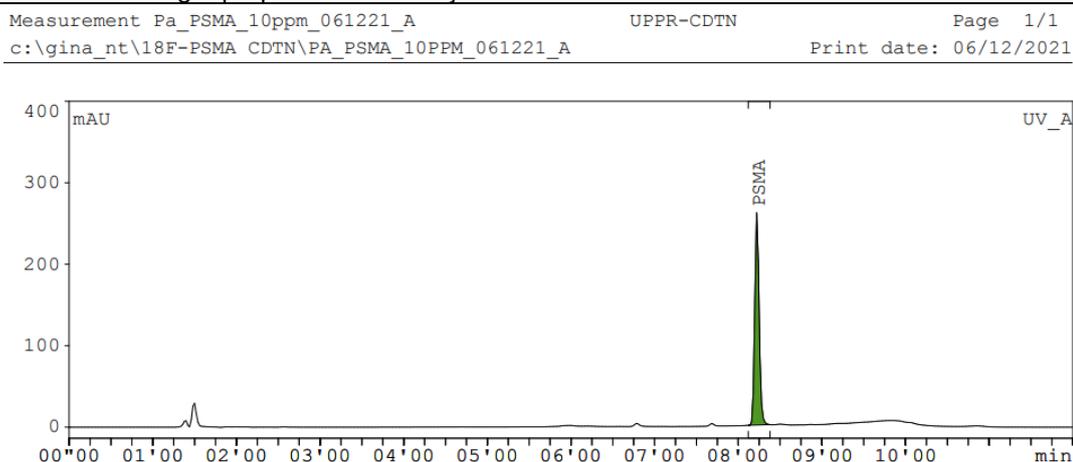
Nível	Replicata	Concentração teórica (g/L)	Área	Concentração medida (g/L)	Recuperação %	Recuperação média
80%	1	8,00	719,80	7,53	94,16	94,69
	2	8,00	727,90	7,62	95,22	
	3	8,00	723,90	7,58	94,70	
100%	1	10,00	938,20	9,82	98,19	98,73
	2	10,00	938,40	9,82	98,21	
	3	10,00	953,40	9,98	99,78	
120%	1	12,00	1.186,10	12,41	103,45	102,97
	2	12,00	1.191,30	12,47	103,90	
	3	12,00	1.164,70	12,19	101,58	

De acordo com os intervalos de recuperação observados na Tabela 6, página 53, a recuperação do analito na solução matriz deve estar na faixa de 80 – 110%. Para as três concentrações avaliadas os valores de recuperação encontrados mostraram-se adequados, uma vez que variaram de 94% - 104%, dessa forma, o método analítico apresenta exatidão satisfatória.

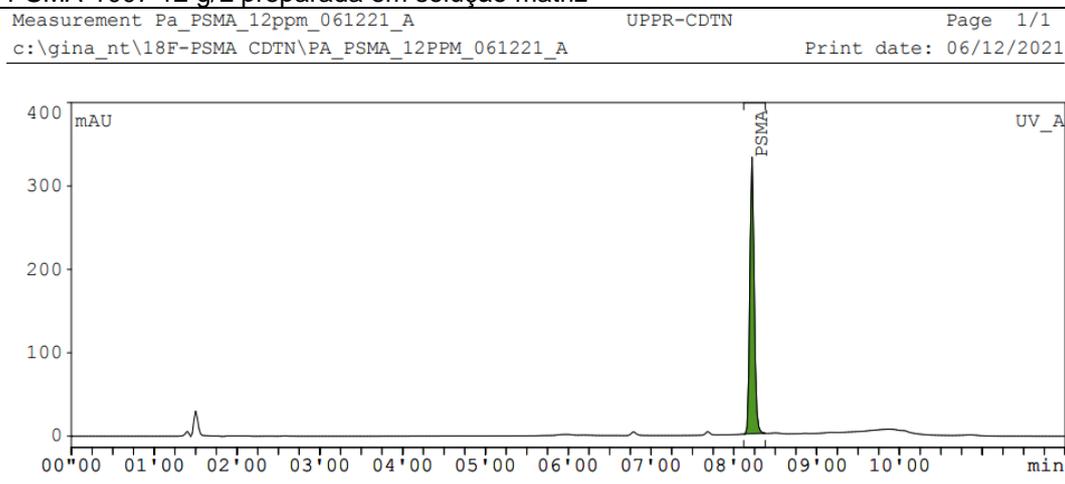
Nas Figuras 34, 35 e 36 é mostrado os cromatogramas obtidos para as soluções utilizadas para avaliação da exatidão nas concentrações de 8 g/L, 10 g/L e 12 g/L, neles podemos observar que os picos referentes ao PSMA, de TR = 8 minutos, apresentam aumento da área com o aumento da concentração do analito, conforme esperado.



**Figura 35** - Cromatograma obtido em detector ultravioleta a 225 nm com a solução padrão de PSMA-1007 10 g/L preparada em solução matriz.



**Figura 36** - Cromatograma obtido em detector ultravioleta a 225 nm com a solução padrão de PSMA-1007 12 g/L preparada em solução matriz



#### 5.5.4 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

A partir da equação 5 (página 52) calculou-se o valor do desvio padrão do intercepto ( $S_a$ ), em seguida, utilizou-se a equação 4 (página 51) para cálculo dos valores de LD e LQ, mostrados na Tabela 21.

**Tabela 21** - valores utilizados e calculados para LQ e LD (g/L)

Inclinação (b)	Desvio do intercepto ( $S_a$ )	F	
91,8080	13,0447	3,3	LD = 0,4689
		10	LQ = 1,4209

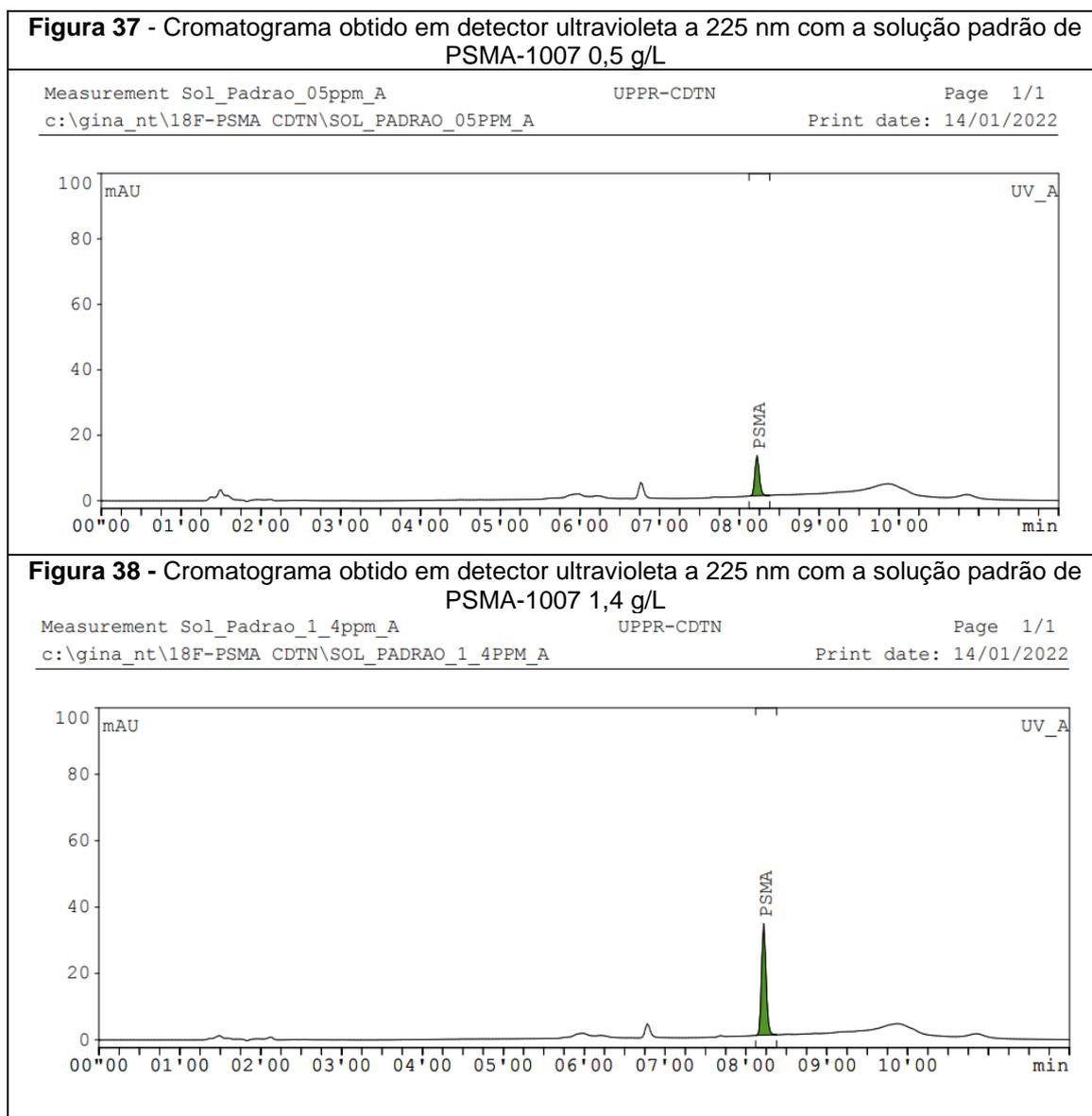
Tendo em vista que um dos objetivos do método é detectar a quantidade de PSMA-1007 presente no radiofármaco, e que para esse o valor da especificação é de no máximo 10 g/L, os limites estabelecidos permitem que a avaliação seja feita de forma satisfatória, uma vez que contemplam o valor que se objetiva medir.

Avaliou-se a exatidão do método analítico na concentração do limite de quantificação, os valores obtidos são mostrados na Tabela 22, os resultados mostraram-se satisfatórios uma vez que a recuperação obtida, entre 95 -101%, se encontra dentro da faixa estabelecida na Tabela 6, página 53.

**Tabela 22** - Resultados obtidos com as injeções para avaliação da exatidão na concentração do LQ.

Replicata	Concentração teórica (g/L)	Área	Concentração medida (g/L)	Recuperação %
1	1,40	126,58	1,33	95,3
2	1,40	126,61	1,34	95,4
3	1,40	133,51	1,41	100,6

As Figuras 37 e 38 mostram os cromatogramas obtidos com soluções padrão de PSMA-1007 preparadas nas concentrações do LD e LQ, que para fins de preparo foram arredondadas para 0,5 g/L e 1,4 g/L, respectivamente.



### 5.5.5 Precisão

Para avaliação da precisão repetibilidade registrou-se a área de seis injeções da solução amostra de  $^{18}\text{F}$ -PSMA-1007, mostradas na Tabela 23, o DPR obtido encontra-se dentro do limite especificado, menor que 7,3%, mostrado na Tabela 7, página 53.

**Tabela 23** - Resultados obtidos com as injeções de solução amostra de  $^{18}\text{F}$  PSMA-1007 para avaliação da precisão repetibilidade.

Replicata	Área	Concentração de PSMA-1007 (g/L)
1	431,06	4,55
2	410,53	4,33
3	422,12	4,46
4	430,16	4,54
5	422,78	4,46
6	422,91	4,47
<b>Média</b>	<b>423,26</b>	<b>4,47</b>
<b>Desvio padrão</b>	<b>7,38</b>	<b>0,08</b>
<b>DPR (%)</b>	<b>1,7</b>	<b>1,7</b>

Para avaliação da precisão intermediária foram feitas seis injeções de solução amostra em um dia diferente, por um analista diferente do realizado na precisão repetibilidade, os resultados obtidos são mostrados na Tabela 24.

**Tabela 24** - Resultados obtidos com as injeções de solução amostra de  $^{18}\text{F}$  PSMA-1007 para avaliação da precisão intermediária.

Replicata	Área	Concentração de PSMA-1007 (g/L)
1	403,04	3,97
2	387,55	3,82
3	393,76	3,88
4	394,51	3,89
5	387,32	3,82
6	393,76	3,88
<b>Média</b>	<b>393,32</b>	<b>3,88</b>
<b>Desvio padrão</b>	<b>5,75</b>	<b>0,06</b>
<b>DPR (%)</b>	<b>1,5</b>	<b>1,5</b>

Avaliou-se o DPR entre as 12 medidas obtidas na precisão. De acordo com a Tabela 7 (página 53), na concentração de PSMA obtida o DPR deve ser menor que 11,0%, obteve-se DPR de 7,6%, como mostrado na Tabela 25, entre as 12 amostras, o que atende ao parâmetro de precisão intermediária.

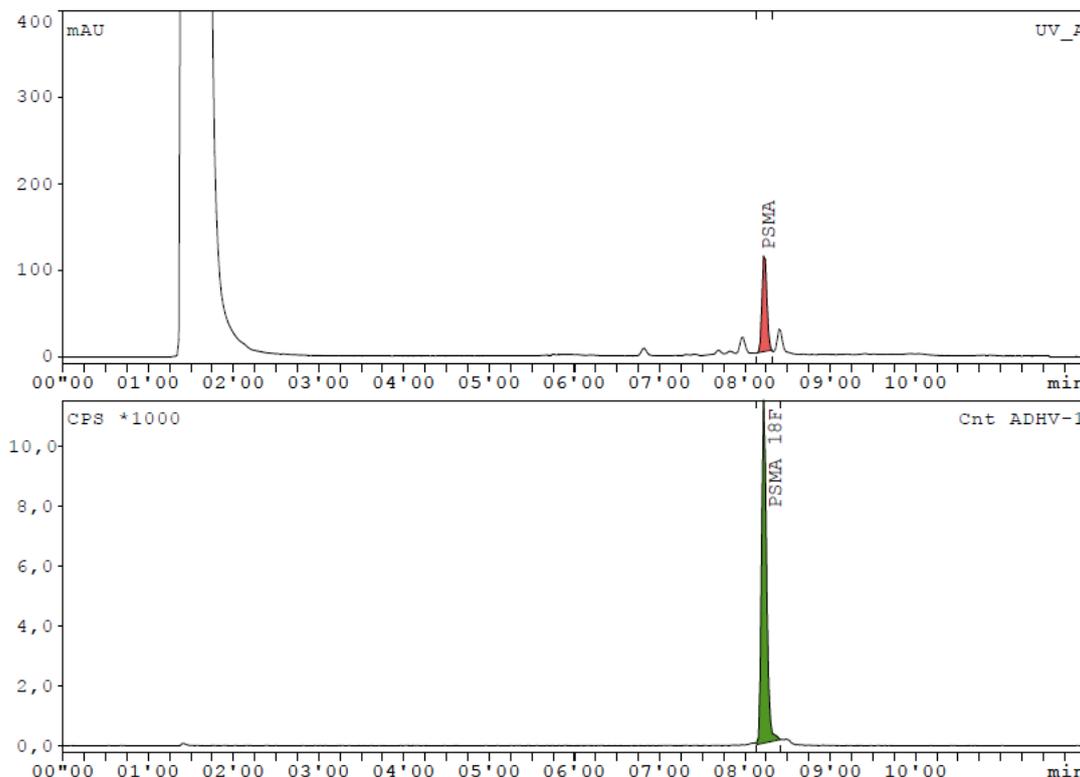
**Tabela 25** - Avaliação de Precisão Intermediária pelo cálculo de DPR (%)

<b>Avaliação da Precisão Intermediária</b>	4,55
	4,33
	4,46
	4,54
	4,46
	4,47
	3,97
	3,82
	3,88
	3,89
	3,82
	3,88
	Média
Desvio Padrão	0,315742
DPR (%)	7,6

O método apresentou precisão satisfatória, uma vez que atendeu os critérios estabelecidos para DPR, tanto para precisão repetibilidade quanto para precisão intermediária.

A Figura 39 mostra um cromatograma obtido na avaliação da precisão repetibilidade. Não foi avaliada a precisão entre as áreas obtidas pelo detector de radioatividade, pois devido ao decaimento radioativo as áreas tornam-se menores a cada injeção. Dessa forma, a precisão intermediária foi avaliada usando as áreas obtidas pelo detector ultravioleta.

**Figura 39** - Cromatograma obtido da amostra do produto  $^{18}\text{F}$  PSMA-1007 para avaliação da precisão. Cromatograma superior corresponde ao detector ultravioleta a 225 nm e o inferior, ao de radioatividade



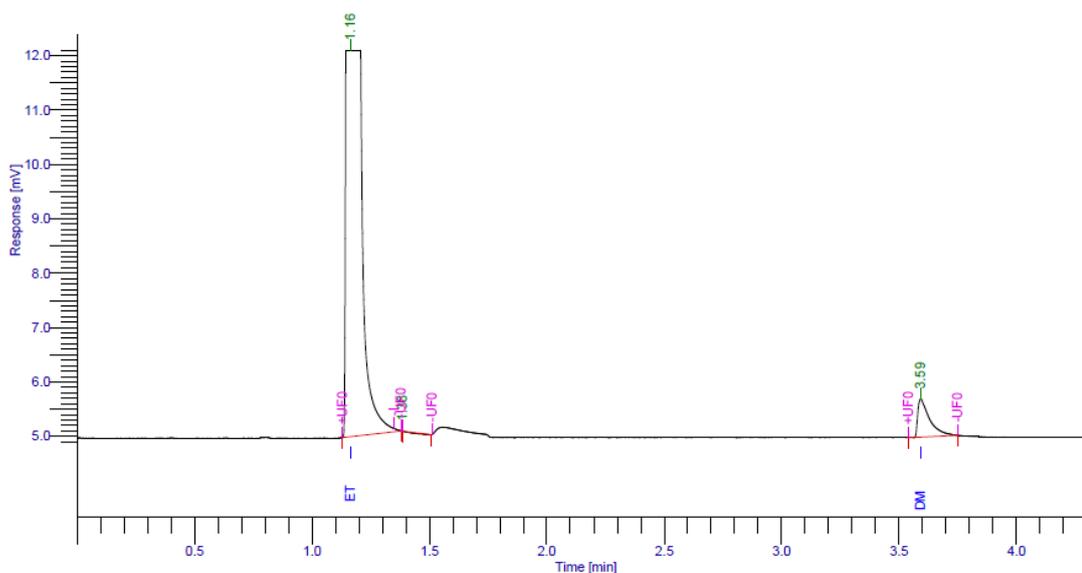
### 5.6 Metodologia analítica para avaliação de solventes residuais – Determinação de etanol e de DMSO

A monografia farmacopeica sugere que para a determinação de solventes seja utilizado um procedimento geral apresentado na Farmacopeia Europeia no capítulo 2.4.24, que utiliza a técnica de cromatografia gasosa com injeção *headspace*, ou que seja desenvolvido e validado outro procedimento. Uma vez que a técnica de *headspace* não é contemplada no cromatógrafo disponível no CDTN, optou-se pelo desenvolvimento de um novo método, que utiliza a injeção líquida.

Buscou-se algumas referências na literatura em trabalhos que determinaram os dois solventes, etanol e DMSO. Werlang (2020) utilizou um método com tempo de corrida de 23 minutos, Naka e colaboradores (2020) utilizaram um diferente método com tempo de corrida de 16 minutos e um terceiro método encontrado foi o usado por Wurzer e colaboradores (2021) com 12 minutos de corrida. Os três autores trabalharam com rampas de variação de temperatura, buscou-se trabalhar, também, com um método com rampa de temperatura, porém que conseguisse a separação em menor tempo de corrida.

A primeira condição desenvolvida foi utilizando a seguinte rampa de temperatura: iniciou-se com 70 °C mantidos por 0.5 minutos, a uma taxa de 40 °C/min elevou-se a temperatura até 170 °C, mantidos por 1 minuto, em seguida a uma taxa de 40 °C/min elevou-se a temperatura até 200 °C, mantidos por 1 minuto. O tempo de corrida total foi de 5,75 minutos e o TR para o etanol de 1,16 minutos e 3,59 minutos para o DMSO (Figura 40).

**Figura 40** - Cromatograma obtido para injeção de padrão de etanol e DMSO em método cromatográfico utilizando rampa de temperatura de 40 a 200 °C

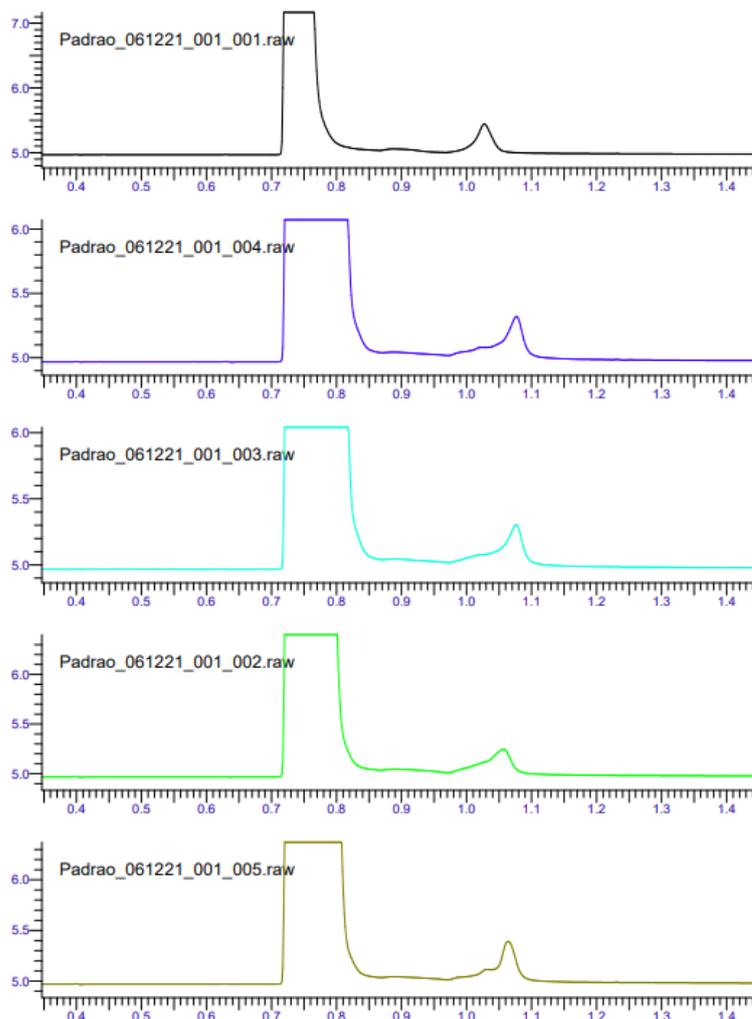


Embora tenha-se alcançado uma separação adequada e uma redução do tempo de corrida, observou-se que o intervalo entre uma injeção e outra estava bastante longo, cerca de 11 minutos, uma vez que a temperatura que era aumentada até 200 °C deveria se resfriada até 70 °C para iniciar a próxima injeção. Sendo assim, embora a corrida estivesse com um tempo curto, o tempo de análise tornou-se longo devido ao intervalo entre as injeções, por isso, foram necessárias novas alterações.

Na tentativa de reduzir a diferença de temperatura de final e início da análise e tendo em vista que a quantidade de analitos que desejava-se separar era pequena, apenas 2 analitos, optou-se por testar um método isotérmico. Foram feitos dois testes um a 170 °C e outro a 200 °C. Em ambos o perfil cromatográfico não se reproduzia entre uma injeção e outra. No método com rampa de variação de temperatura, cujo cromatograma foi mostrado na Figura 40 é possível observar um pequeno pico com TR de aproximadamente 1,6 minutos, não foi possível identificar a origem desse pico, porém ele não interferiu na quantificação de nenhum dos dois analitos. Já para o método isotérmico acredita-se que o TR desse pico desconhecido tenha variado de

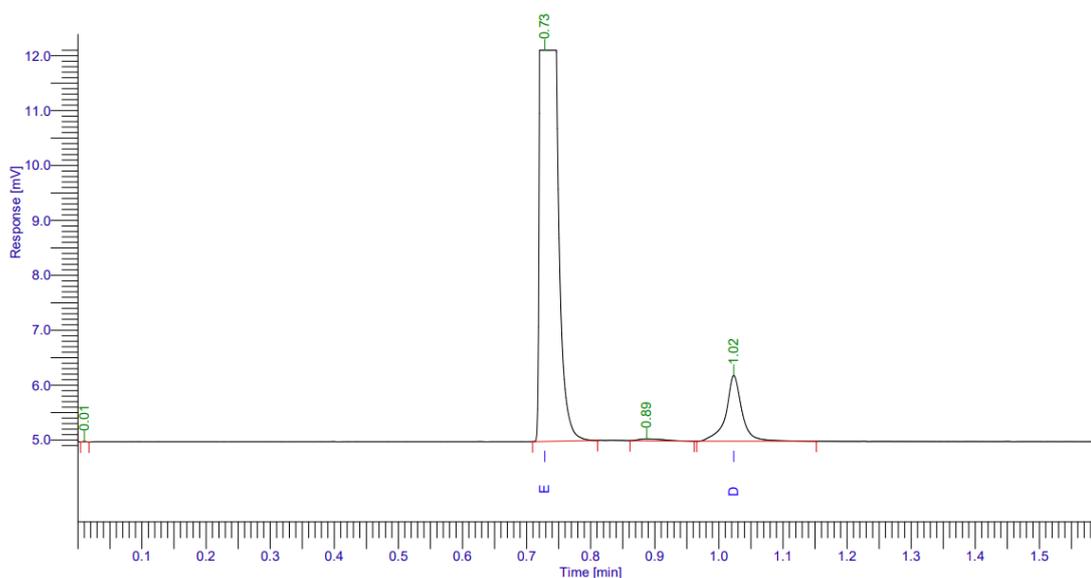
uma injeção para outra, o que tornou não reprodutível o perfil das injeções. Na Figura 41 é mostrada uma sequência de 5 injeções feitas utilizando o método isotérmico a 200 °C, é possível observar a variação do perfil cromatográfico.

**Figura 41** - Cromatogramas obtidos com as injeções de padrão de etanol e DMSO em método isotérmico a 200 °C.



Diante disso, optou-se por testar novamente um método com rampa de temperatura, porém com menor diferença entre a temperatura inicial e final. Iniciou-se com 120°C mantidos e a uma taxa de 45°C/min elevou-se a temperatura até 210°C. Propôs-se também uma variação no fluxo do gás de arraste, que se iniciou com 4mL/min e foi mantido por 0,5 minutos em seguida foi elevado para 8mL/min e mantido até o final da corrida. Nessa condição o tempo total de corrida foi de 2,01 minutos, o TR do etanol foi de 0,73 minutos e do DMSO 1,02 minutos (Figura 42).

**Figura 42** - Cromatograma obtido para injeção de padrão de etanol e DMSO em método cromatográfico utilizando rampa de temperatura de 120 a 210 °C



Considerou-se esse método satisfatório uma vez que a separação foi adequada, o perfil cromatográfico reproduziu entre uma injeção e outra, o tempo de corrida foi curto e o intervalo entre uma corrida e outra foi de 4 minutos.

## 5.7 Validação metodologia analítica para avaliação dos solventes residuais – Etanol e DMSO

### 5.7.1 Linearidade

Para avaliação da linearidade preparou-se uma solução mãe de etanol e uma solução mãe de DMSO e a partir de cada uma dessas fez o preparo de três soluções diluídas utilizadas para o preparo das soluções dos seis pontos da curva de linearidade.

Os dados obtidos para o teste de linearidade do etanol e do DMSO são mostrados nas Tabelas 26 e 27 e dispostos nas Figuras 43 e 44, respectivamente. Ao avaliar visualmente os gráficos obtidos, Figuras 43 e 44, verifica-se que os pontos dispostos no gráfico têm relação linear aparente.

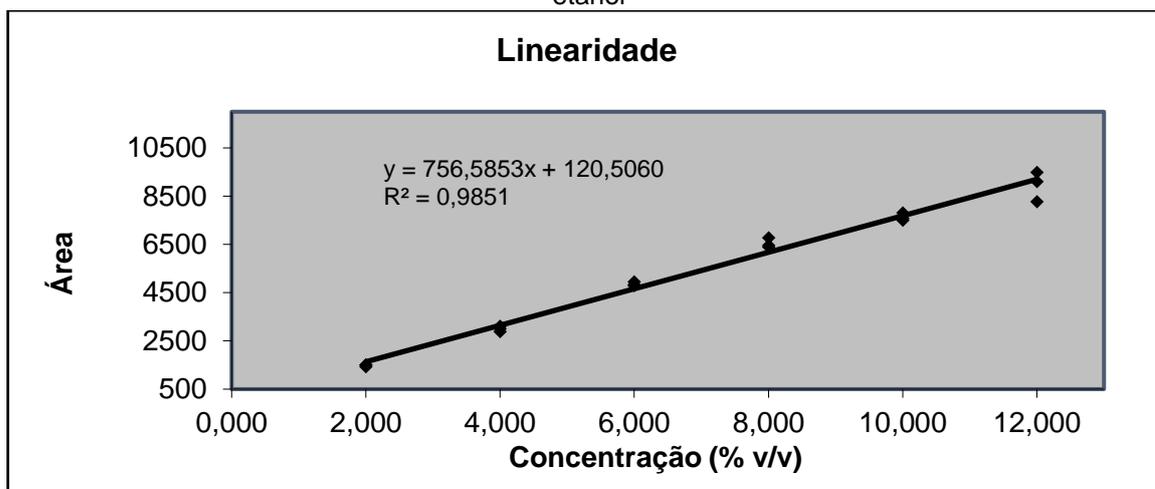
**Tabela 26 - Dados obtidos para Linearidade – Etanol**

Ponto da curva	Concentração (% v/v)	Área
a	2,000	1497,25
b	2,000	1507,5
c	2,000	1.438,3
a	4,000	2.895,2
b	4,000	3.006,8
c	4,000	3.120,0
a	6,000	4.839,6
b	6,000	4.800,0
c	6,000	4.955,6
a	8,000	6.467,9
b	8,000	6.784,1
c	8,000	6.400,4
a	10,000	7.816,6
b	10,000	7.512,4
c	10,000	7.583,5
a	12,000	9.494,0
b	12,000	8.271,9
c	12,000	9.108,0

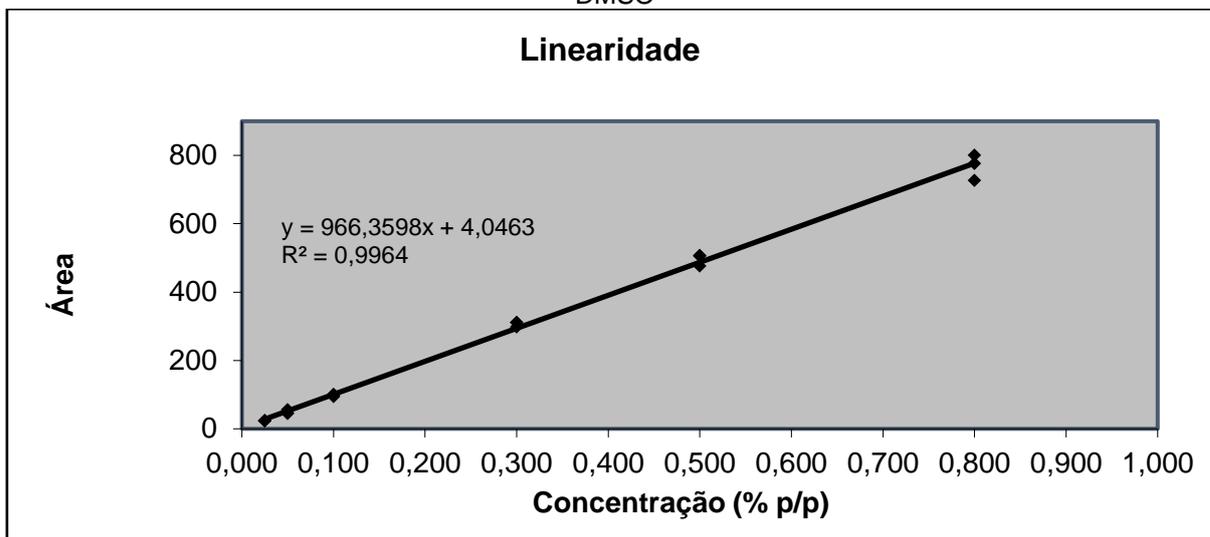
**Tabela 27 - Dados obtidos para Linearidade DMSO**

Ponto da curva	Concentração (% p/p)	Área
a	0,025	23,6
b	0,025	22,7
c	0,025	23,5
a	0,050	55,4
b	0,050	45,5
c	0,050	44,7
a	0,100	93,9
b	0,100	98,3
c	0,100	100,3
a	0,300	297,6
b	0,300	310,4
c	0,300	311,1
a	0,500	505,5
b	0,500	476,4
c	0,500	507,0
a	0,800	726,6
b	0,800	775,8
c	0,800	800,4

**Figura 43** - Gráfico gerado para os dados de linearidade do método de avaliação determinação de etanol



**Figura 44** - Gráfico gerado para os dados de linearidade do método de avaliação determinação de DMSO



A partir da análise de regressão linear obteve-se as equações de reta mostradas a seguir e os coeficientes mostrados na Tabela 28 para o etanol e na Tabela 29 para o DMSO.

**Equação 10** – Equação de reta obtida para o etanol

$$y = 756,5853x + 120,5060$$

**Tabela 28** - Coeficientes obtidos pela regressão linear para o etanol

Coeficientes da reta	
Coeficiente de Pearson (r):	0,9925
Coeficiente de Determinação (R <sup>2</sup> ):	0,9851
Coeficiente angular (Inclinação da Reta)	756,5853
Coeficiente linear (Intercepto da Reta)	120,5060

**Equação 11** – Equação de reta obtida para o DMSO

$$y = 966,3598 + 4,0463x$$

**Tabela 29** - Coeficientes obtidos pela regressão linear para o DMSO

Coeficientes da reta	
Coeficiente de Pearson (r):	0,9982
Coeficiente de Determinação (R <sup>2</sup> ):	0,9964
Coeficiente angular (Inclinação da Reta)	966,3598
Coeficiente linear (Intercepto da Reta)	4,0463

Para definir se o modelo deve ser ajustado conforme MMQO ou MMQP aplicou-se o Teste de Cochran, as hipóteses são as mesmas definidas na Tabela 12 (página 66) e os resultados mostrados na Tabela 30 e 31.

**Tabela 30** - Variâncias calculadas para aplicação do Teste de Cochran para o etanol

Avaliação da igualdade de variâncias - Teste de Cochran			
Variância em 20	1394,80	Maior variância	390233,90
Variância em 40	12631,70		
Variância em 60	6542,30	Soma das variâncias	478097,50
Variância em 80	41972,10		
Variância em 100	25322,70	C calculado	0,8162
Variância em 120	390233,90		

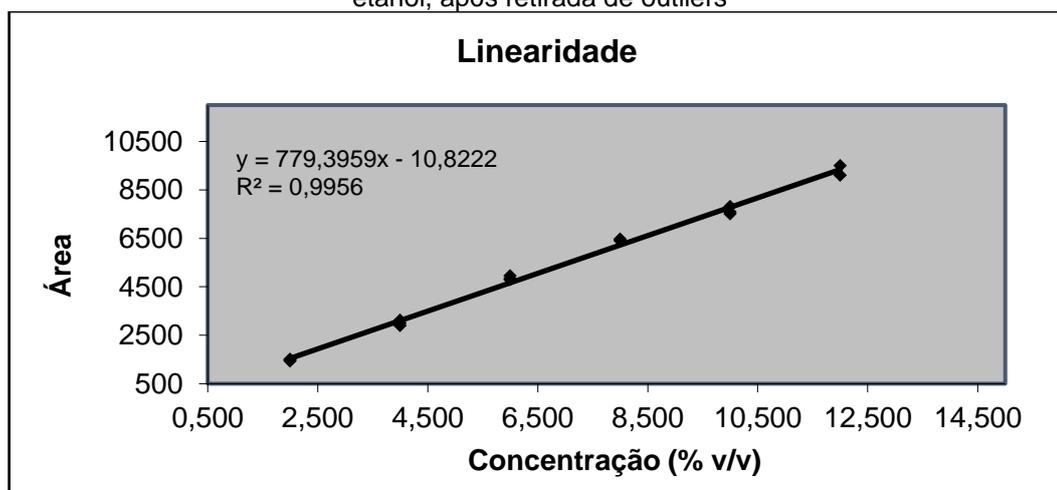
**Tabela 31** - Variâncias calculadas para aplicação do Teste de Cochran para o DMSO

Avaliação da igualdade de variâncias - Teste de Cochran			
Variância em 20	0,20	Maior variância	1412,0
Variância em 40	35,52		
Variância em 60	10,70	Soma das variâncias	1813,90
Variância em 80	57,80		
Variância em 100	297,60	C calculado	0,7785
Variância em 120	1412,00		

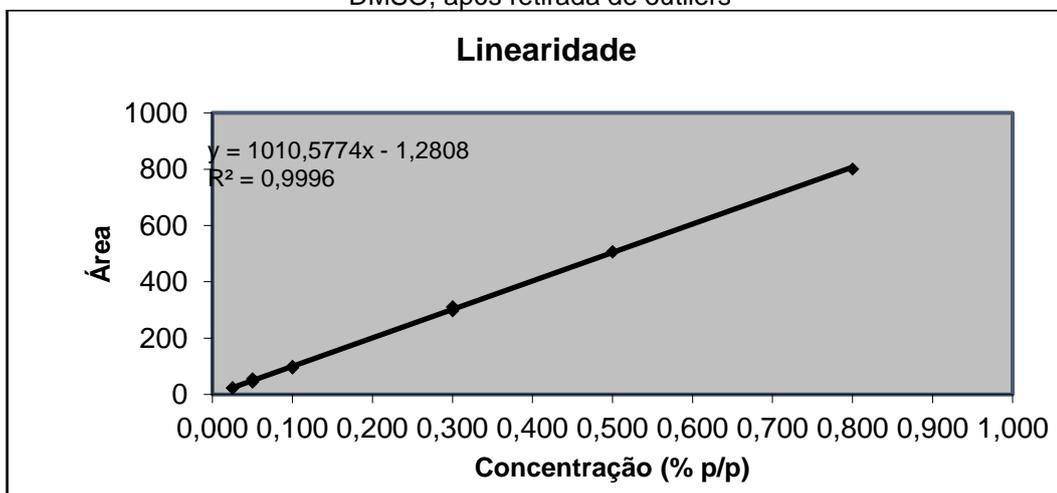
O valor de C tabelado para 6 pontos com 3 réplicas é 0,616, sendo C calculado > C tabelado, portanto, rejeita-se a hipótese nula (H<sub>0</sub>) de que não há diferença estatística significativa entre as variâncias, logo os dados são heterocedásticos, tanto para etanol quanto para DMSO, e recomenda-se utilizar o modelo MMQP. Na validação analítica é desejável que os dados sejam homocedásticos, pois isso significa que a quantificação possa ser realizada pela regressão linear convencional, o que inclui utilizar o método de ponto único, comum em laboratórios farmacêuticos. A presença

de valores extremos, outliers, é uma das possibilidades para que não se tenha obtido dados homocedásticos (SNEDECOR, COCHRAN, 1989). Para confirmar a presença de valores extremos foi aplicado o teste dos resíduos padronizados Jackknife, esse teste pode ser aplicado sucessivamente até que novos valores extremos não sejam detectados ou até que se atinja a exclusão máxima de 22,2% do número original de resultados (BELSEY, KUH, WELSCH, 1980) (SOUZA, 2007). Após aplicar o teste dos resíduos padronizados de Jackknife, verificou-se a presença de dois outliers para a curva do etanol (os pontos 8% v/v e 12% v/v da curva B, correspondentes a 11,1% do número original de resultados) e de três outliers (os pontos 0,5% p/p e 0,8% p/p para a curva B e 0,8% p/p para a curva A, correspondentes a 16,7% do número original de resultados). Esses dados foram retirados e plotou-se novamente os dados para prosseguir a avaliação. As Figuras 45 e 46 mostram os novos gráficos obtidos após a retirada dos valores extremos.

**Figura 45** - Gráfico gerado para os dados de linearidade do método de avaliação determinação de etanol, após retirada de outliers



**Figura 46** - Gráfico gerado para os dados de linearidade do método de avaliação determinação de DMSO, após retirada de outliers



Após a retirada dos valores extremos aplicou-se novamente o teste de Cochran para verificação da homocedasticidade. As Tabelas 32 e 33 mostram os resultados obtidos para o teste.

**Tabela 32** - Variâncias calculadas para aplicação do Teste de Cochran para o etanol

<b>Avaliação da igualdade de variâncias - Teste de Cochran</b>			
Variância em 20	1394,80	Maior variância	74471,00
Variância em 40	12631,70		
Variância em 60	6542,30	Soma das variâncias	122644,70
Variância em 80	2282,20		
Variância em 100	25322,70	C calculado	0,6072
Variância em 120	74471,00		

**Tabela 33** - Variâncias calculadas para aplicação do Teste de Cochran para o DMSO

<b>Avaliação da igualdade de variâncias - Teste de Cochran</b>			
Variância em 20	0,20	Maior variância	57,80
Variância em 40	35,52		
Variância em 60	10,70	Soma das variâncias	105,40
Variância em 80	57,80		
Variância em 100	1,10	C calculado	0,5482
Variância em 120	0,0		

Com os novos valores de C calculado 0,6072 para o etanol e 0,5482 para o DMSO, verificou-se que C calculado < C tabelado (0,616), portanto, aceita-se a hipótese nula ( $H_0$ ) de que não há diferença estatística significativa entre as variâncias, podendo-se aplicar o MMQO.

Para avaliação dos coeficientes angular (b) e linear (a) aplicou-se o teste ANOVA, que foi realizado utilizando o Excel. Os critérios para avaliação do coeficiente angular e do coeficiente linear são os mesmos definidos nas Tabelas 14 e 15, página 67. O valor-p que será usado para tomada de decisão deve ser calculado com nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ).

Os resultados obtidos com aplicação do teste ANOVA são mostrados na Tabela 34 e 35 para o etanol e DMSO, respectivamente.

Tabela 34 - Dados ANOVA para o Etanol

ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	110405484,2	110405484,2	3179,79	6,527E-18
Resíduo	14	486093,9982	34720,99987		
Total	15	110891578,2			
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	
Interseção	-10,82217331	102,7365655	-0,105339061	0,917601	6,53E-18
Variável X 1	779,3958941	13,82161851	56,38962568		

Tabela 35 - Dados ANOVA para o DMSO

ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	772077,582	772077,582	29147,92239	3,59859E-23
Resíduo	13	344,3473065	26,48825435		
Total	14	772421,9293			
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	
Interseção	-1,2808036	1,839969079	-0,696100595	0,498622879	3,59859E-23
Variável X 1	1010,57738	5,919237576	170,7276263		

A comprovação da significância do coeficiente angular obteve-se valor de F tabelado igual a 4,4939 e o valor de F calculado igual a 3179,7900 para o etanol e de 29147,9224 para o DMSO, diante disso, rejeita-se a hipótese de que  $b=0$  e assume-se que  $y$  efetivamente varia em função de  $x$ , e o método pode ser considerado linear. O valor-p obtido para interseção no teste ANOVA foi 0,9176 para o etanol e de 0,4986 para o DMSO, sendo esses maiores que 0,05, aceita-se a hipótese nula e conclui-se que o intercepto é igual a zero ao nível de significância de 5%. Assim, verifica-se que a utilização de um método de ponto único na rotina de análise, ao invés de um método com curva de calibração é adequado.

De acordo com a RDC 166 o valor mínimo do coeficiente de correlação ( $r$ ) deve ser de 0,9900, obteve-se  $r = 0,9978$  para o etanol e  $r = 0,9998$  para o DMSO, o que indica forte correlação entre as duas variáveis, área e concentração, para os dois analitos. Para o etanol obteve-se coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual a 0,9956, esse valor mostra que conhecendo  $x$  é possível prever 99,56% da variação de  $y$ . Para o DMSO o valor obtido foi 0,9996, indicando que é possível prever 99,96% da variação de  $y$ . Diante disso, vê-se que o modelo proposto é significativo, uma vez que a variabilidade que o modelo explica (variância da regressão) é maior que a porcentagem de variabilidade que o modelo não explica (variância dos resíduos).

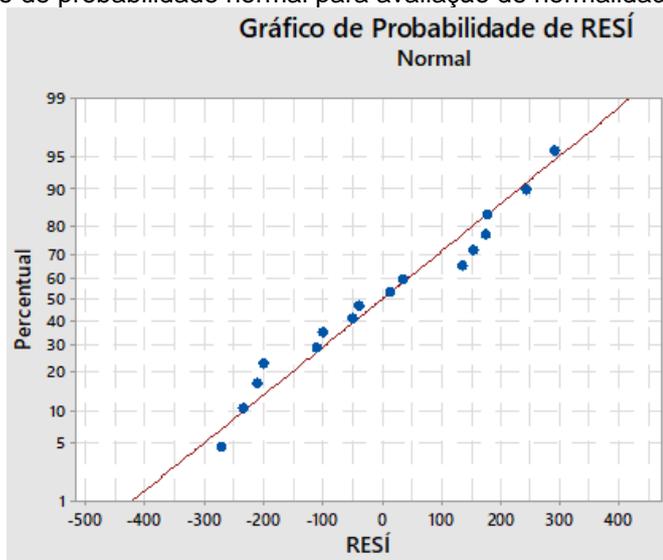
A avaliação da normalidade, homocedasticidade e independência dos resíduos foi feita por análise gráfica, os gráficos foram obtidos com o software Minitab.

Para a avaliação da normalidade dos resíduos utilizou-se um gráfico de probabilidade normal mostrado nas Figuras 47 e 48, a proximidade dos pontos a reta traçada indica normalidade dos resíduos.

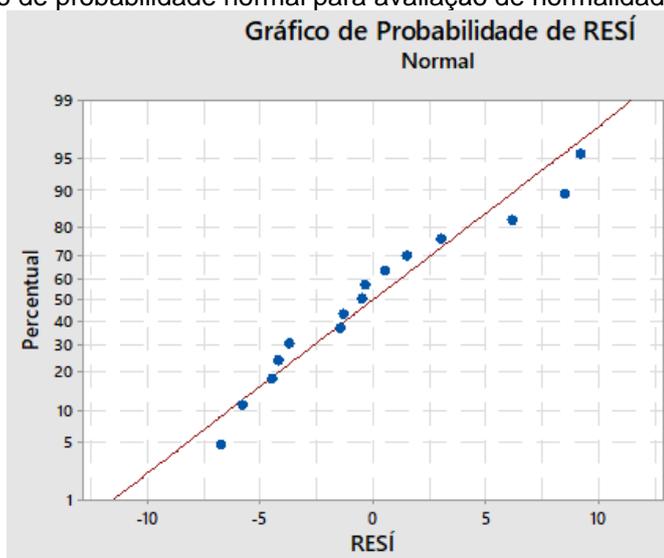
Para avaliação da homocedasticidade utilizou-se o gráfico dos resíduos versus valores preditos, mostrado nas Figuras 49 e 50. Nos gráficos não foi observado comportamento ou tendência, o que indica que a variância dos resíduos é homocedástica.

Para avaliação da independência dos resíduos utilizou-se um gráfico dos resíduos versus a ordem da coleta dos dados, mostrado nas Figuras 51 e 52, não se observa um padrão evidente na distribuição dos pontos, o que sugere a ausência de correlação.

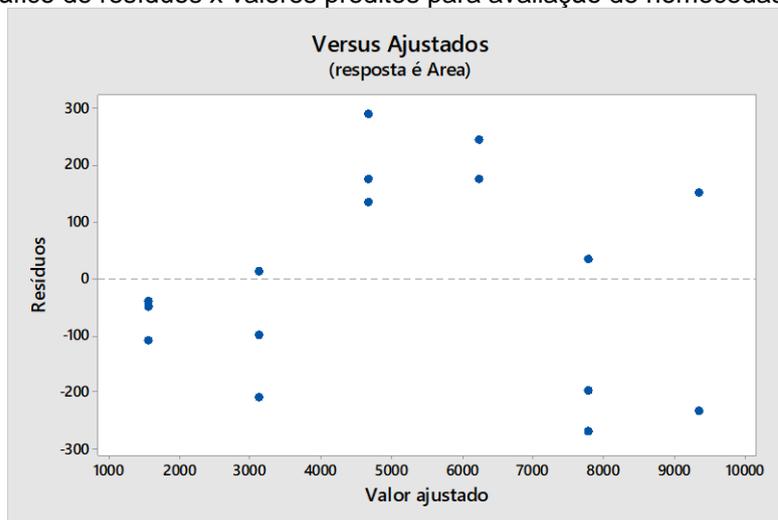
**Figura 47** - Gráfico de probabilidade normal para avaliação de normalidade de dados - Etanol



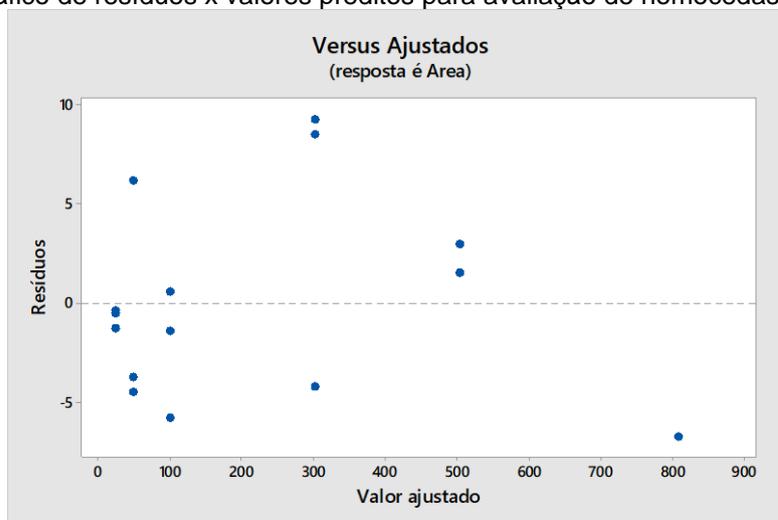
**Figura 48** - Gráfico de probabilidade normal para avaliação de normalidade de dados - DMSO



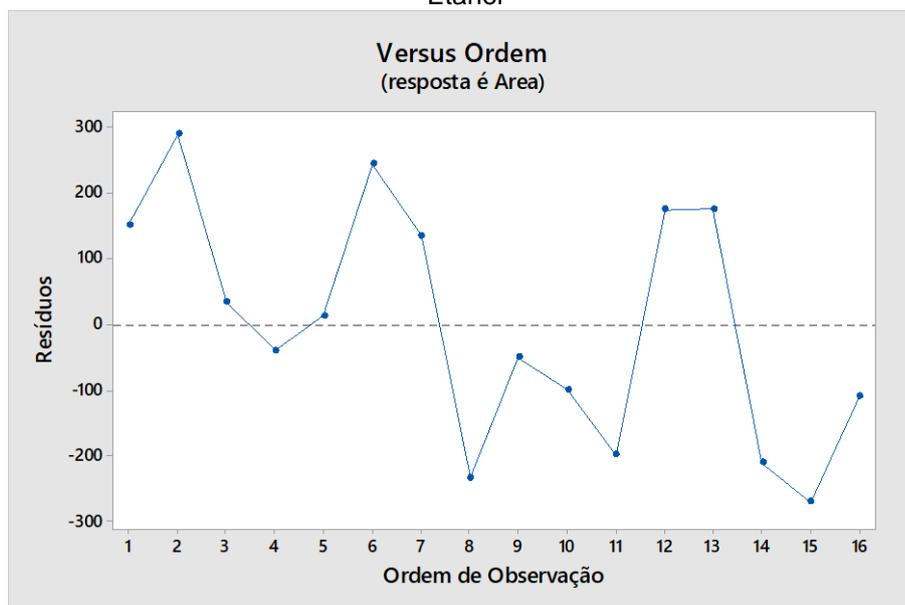
**Figura 49** - Gráfico de resíduos x valores preditos para avaliação de homocedasticidade - Etanol



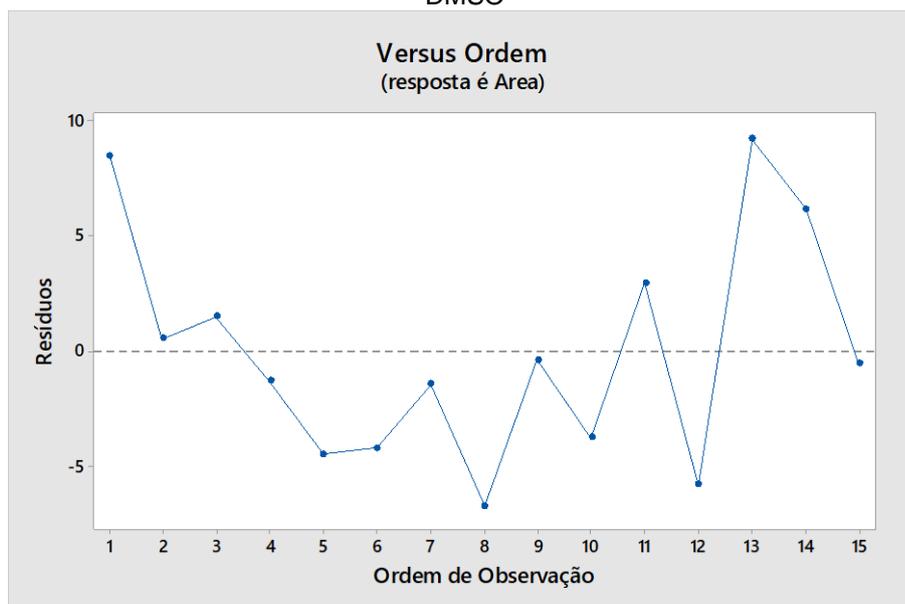
**Figura 50** - Gráfico de resíduos x valores preditos para avaliação de homocedasticidade – DMSO



**Figura 51** - Gráfico de resíduos x ordem de coleta dos dados para avaliação de independência – Etanol



**Figura 52** - Gráfico de resíduos x ordem de coleta dos dados para avaliação de independência – DMSO



### 5.7.2 Seletividade

Para avaliação da seletividade preparou-se solução padrão de etanol e de DMSO em água e em solução matriz, utilizou-se as menores concentrações que foram preparadas para construção da curva de calibração no teste de linearidade, a fim de verificar se a solução matriz poderia interferir nos valores de área obtidos. Optou-se por trabalhar nas menores concentrações da curva de calibração, pois nessas há maior quantidade de matriz e menor quantidade de analito. Os valores de áreas registrados com as injeções dessas soluções são mostrados nas Tabelas 36 e 37.

**Tabela 36** - Resultados de área obtido com as injeções de padrão de etanol para avaliação de seletividade.

	<b>Padrão 2% v/v em diluente</b>	<b>Padrão 2% v/v em solução matriz</b>
Área	1497,2527	1482,7587
	1507,5047	1471,8174
	1438,2988	1433,1593
<b>Média</b>	<b>1481,0187</b>	<b>1462,5785</b>

**Tabela 37** - Resultados de área obtido com as injeções de padrão de DMSO para avaliação de seletividade.

	<b>Padrão 0,025% p/p em diluente</b>	<b>Padrão 0,025% p/p em solução matriz</b>
Área	23,5737	25,5640
	22,6528	20,9268
	23,4525	23,8698
<b>Média</b>	<b>23,2263</b>	<b>23,4535</b>

Aplicou-se teste F para avaliar se a variância dos dois grupos apresentava diferença estatística significativa e teste t para comparação das médias. As hipóteses criadas para o teste F e para o teste t são as mesmas mostradas nas Tabelas 18 e 19, página 72.

Para o etanol após aplicar o teste F (Tabela 38) verificou-se que a variância observada para os dois grupos não apresentava diferença estatística significativa. Em seguida, aplicou-se teste t presumindo variância igual para os dois grupos, os resultados obtidos são mostrados na Tabela 39.

**Tabela 38** - Resultados obtidos para avaliação de variâncias através do teste F para o etanol

<b>Teste F - Avaliação das variâncias</b>		
<b>Média</b>	1481,0187	1462,5785
<b>N</b>	3	3
<b>Desvio Padrão</b>	37,34997	26,05846
<b>(Desvio padrão)<sup>2</sup></b>	1395,02040	679,04354
<b>F</b>	2,05439	
<b>Probabilidade associada (p)</b>	0,32740	
<b>CONCLUSÃO</b>	Não há diferença estatística entre as variâncias	

**Tabela 39** - Resultados obtidos para avaliação de médias através do teste T para o etanol

<b>Teste t - Avaliação das médias</b>		
Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes		
	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	1481,018733	1462,578467
Variância	1395,020404	679,0435369
Observações	3	3
Variância agrupada	1037,03197	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	4	
Stat t	0,701320856	
P(T<=t) uni-caudal	0,260879234	
t crítico uni-caudal	2,131846786	
P(T<=t) bi-caudal	0,521758468	
t crítico bi-caudal	2,776445105	
<b>CONCLUSÃO</b>	Não há diferença estatística entre as médias	

Aplicou-se o mesmo tratamento para o DMSO, o teste F (Tabela 40) mostrou que os dois grupos apresentavam diferença estatística significativa, assim, aplicou-se teste t presumindo variância diferente entre os dois grupos, os resultados obtidos são mostrados na Tabela 41.

**Tabela 40** - Resultados obtidos para avaliação de variâncias através do teste F para o DMSO

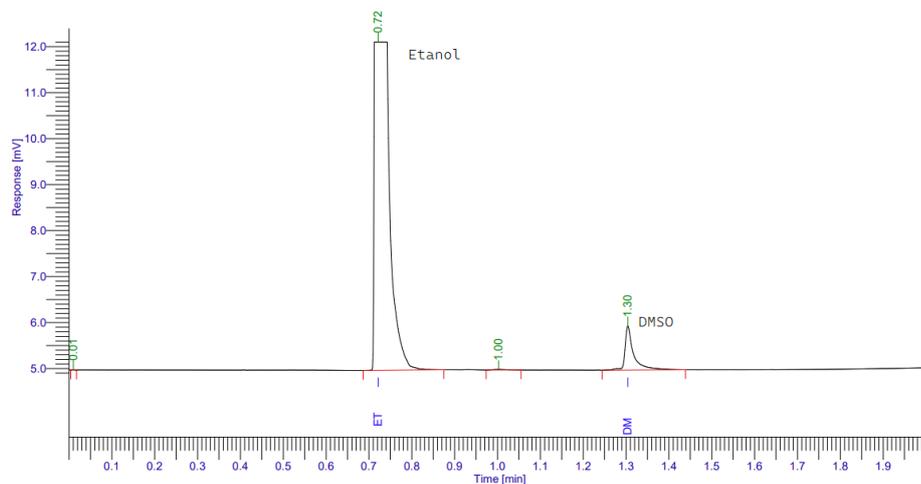
<b>Teste F - Avaliação das variâncias</b>		
<b>Média</b>	23,2263	23,4535
<b>N</b>	3	3
<b>Desvio Padrão</b>	0,50038	2,34646
<b>(Desvio padrão)<sup>2</sup></b>	0,25038	5,50586
<b>F</b>	21,99023	
<b>Probabilidade associada (p)</b>	0,04350	
<b>CONCLUSÃO</b>	Há diferença estatística entre as variâncias	

**Tabela 41** - Resultados obtidos para avaliação de médias através do teste T para o DMSO

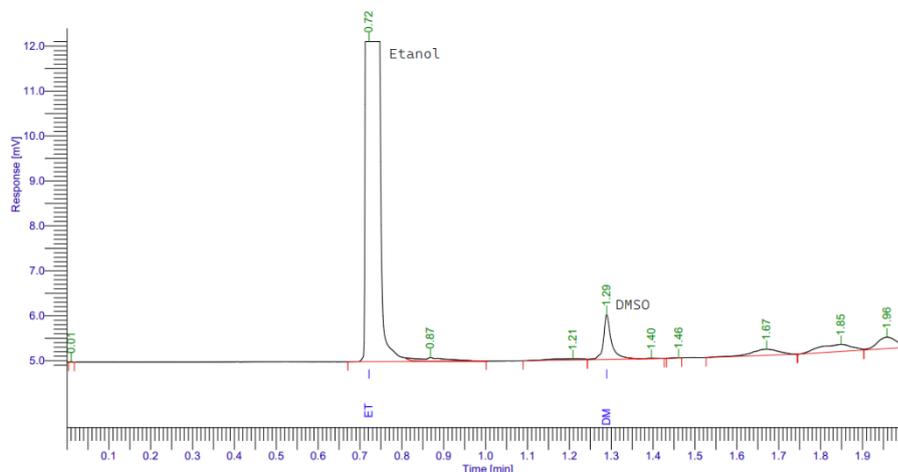
Teste t - Avaliação das médias		
Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes		
	Variável 1	Variável 2
Média	23,22633333	23,45353333
Variância	0,250377723	5,505864413
Observações	3	3
Hipótese da diferença de média	0	
gl	2	
Stat t	-0,164020989	
P(T<=t) uni-caudal	0,442395958	
t crítico uni-caudal	2,91998558	
P(T<=t) bi-caudal	0,884791915	
t crítico bi-caudal	4,30265273	
t crítico bi-caudal	2,776445105	
<b>CONCLUSÃO</b>	Não há diferença estatística entre as médias	

Para os dois analitos, o teste t permitiu concluir que não há diferença entre a média de área da solução padrão preparada em água comparada com a média de área da solução padrão preparada em solução matriz, assim, conclui-se que os componentes da solução matriz não interferem na quantificação dos analitos de interesse.

Nas Figuras 53 e 54 são apresentados os cromatogramas obtidos com a solução padrão preparada em água e com a solução padrão preparada em solução matriz, respectivamente. Pode-se observar na solução matriz a presença de outros picos, referentes a componentes da matriz, porém esses não interferiram na recuperação do analito.

**Figura 53** - Cromatograma obtido com a solução padrão de etanol 2 % v/v e DMSO 0,025 % p/p preparada em água

**Figura 54** - – Cromatograma obtido com a solução padrão de etanol 2 % v/v e DMSO 0,025 % p/p preparada em solução matriz



O método proposto apresentou seletividade adequada para a análise dos solventes.

### 5.7.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Utilizou-se as equações 4 e 5 para cálculo do desvio padrão do intercepto e dos valores de LD e LQ. Os valores obtidos para o etanol e para o DMSO são mostrados nas Tabelas 42 e 43, respectivamente.

**Tabela 42** - valores utilizados e calculados para LQ e LD do etanol

Inclinação (b)	Desvio do intercepto (Sa)	F	
779,39	102,7366	3,3	LD = 0,4350
		10	LQ = 1,3182

**Tabela 43** - valores utilizados e calculados para LQ e LD do DMSO

Inclinação (b)	Desvio do intercepto (Sa)	F	
1010,57	1,8400	3,3	LD = 0,0060
		10	LQ = 0,0182

Os limites estabelecidos permitem que os solventes etanol e DMSO sejam avaliados de forma satisfatória, uma vez que as concentrações que não devem ser ultrapassadas para uso seguro em pacientes são 10% v/v para o etanol e 0,5% p/v para o DMSO (EDQM, 2021) (ICH, 2021). Tendo em vista que os valores que o método é capaz de quantificar encontram-se bem abaixo desses limites, a avaliação dos solventes pode ser realizada de forma satisfatória.

### 5.7.4 Exatidão

Para avaliação da exatidão foram preparadas três replicatas de três concentrações, a solução matriz foi contaminada com a solução de etanol e de DMSO. Para o etanol definiu-se como concentração de trabalho 8% v/v e trabalhou-se com concentrações de 6%v/v e 12%v/v. Para o DMSO definiu-se 0,3% p/v como a concentração de trabalho do método e trabalhou-se com concentrações de 0,1% p/v e 0,5% p/v.

Os dados obtidos são mostrados nas Tabelas 44 e 45.

**Tabela 44** - Resultados obtidos com as injeções para avaliação da exatidão para o etanol

	Concentração (% v/v)	Área	Recuperação (%)	Recuperação Média (%)	DPR (%)
1	6,0	4.264,28	98,18	99,63	3,36
2	6,0	4.224,10	97,25		
3	6,0	4.493,62	103,46		
1	8,0	5.834,85	100,75	100,13	2,65
2	8,0	5.932,14	102,43		
3	8,0	5.630,60	97,22		
1	12,0	7.459,39	85,87	86,28	1,70
2	12,0	7.637,06	87,91		
3	12,0	7.390,00	85,07		

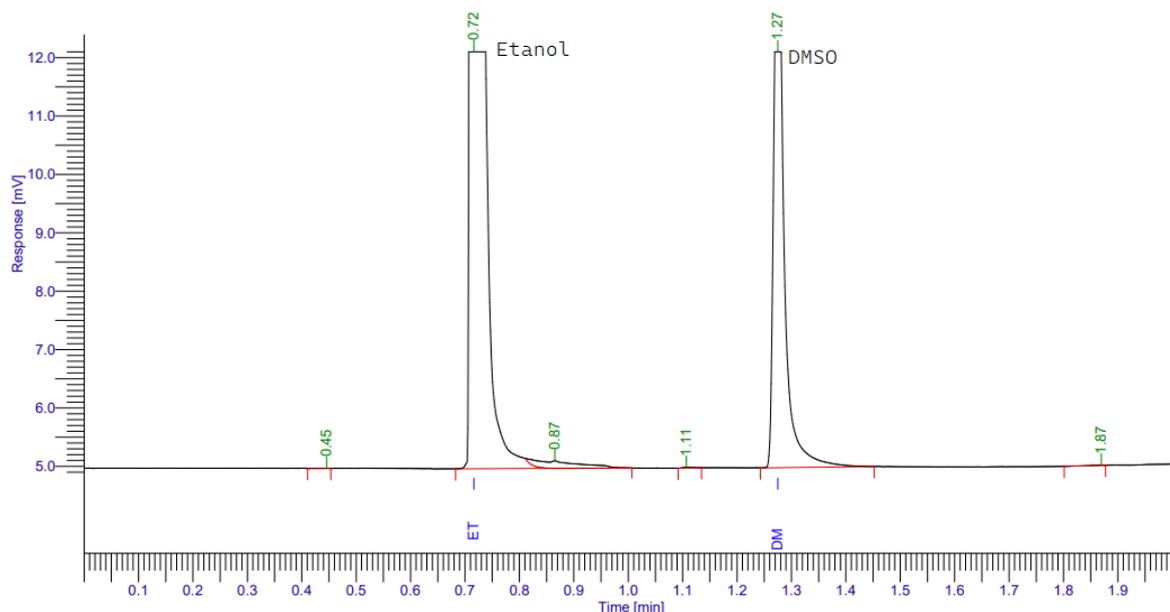
**Tabela 45** - Resultados obtidos com as injeções para avaliação da exatidão para o DMSO

	Concentração (% p/p)	Área	Recuperação (%)	Recuperação Média (%)	DPR (%)
1	0,1	79,35	89,81	84,13	6,29
2	0,1	70,10	79,34		
3	0,1	73,56	83,26		
1	0,3	253,93	95,80	96,68	1,46
2	0,3	254,32	95,94		
3	0,3	260,59	98,31		
1	0,8	586,26	82,94	83,06	1,29
2	0,8	595,11	84,19		
3	0,8	580,02	82,06		

Tendo em vista que a recuperação deve estar entre 80 – 120, todas as concentrações analisadas atendem ao critério de aceitação, assim, pode-se concluir, que mesmo na presença da matriz do radiofármaco o método produz resultados exatos. Observa-se que à medida que as concentrações aumentam há diminuição do DPR entre as injeções, conforme esperado.

Na Figura 55, pode-se observar um cromatograma obtido para as soluções utilizadas para avaliação da exatidão nas concentrações de trabalho do método, 8% v/v para o etanol e 0,3% p/p para o DMSO.

**Figura 55** - Cromatograma obtido para solução padrão de etanol 8% v/v e DMSO 0,3% p/p preparada em solução matriz para avaliação da exatidão.



### 5.7.5 Precisão

Para avaliação da precisão repetibilidade registrou-se as áreas do etanol e do DMSO de seis injeções da solução amostra de  $^{18}\text{F}$ -PSMA-1007, mostradas na Tabela 46.

**Tabela 46** - Resultados obtidos com as injeções de solução amostra de  $^{18}\text{F}$  PSMA-1007 para avaliação da precisão repetibilidade do etanol e do DMSO.

Replicata	Etanol (% v/v)	DMSO (% p/p)
1	7,66	0,0026
2	7,57	0,0026
3	7,28	0,0030
4	7,42	0,0029
5	7,09	0,0030
6	7,73	0,0028
Média	7,46	0,0028
DPR (%)	3,3	5,8

Para avaliação da precisão intermediária foram feitas seis injeções de solução amostra em um dia diferente, por um analista diferente do realizado na precisão repetibilidade, os resultados obtidos são mostrados na Tabela 47.

**Tabela 47** - Resultados obtidos com as injeções de solução amostra de <sup>18</sup>F PSMA-1007 para avaliação da precisão intermediária do etanol e do DMSO.

Replicata	Etanol (% v/v)	DMSO (% p/p)
1	7,45	0,0016
2	6,79	0,0018
3	7,31	0,0008
4	6,87	0,0014
5	6,79	0,0007
6	7,23	0,0008
Média	7,07	0,0012
DPR (%)	4,1	38,7

Avaliou-se o DPR entre as 12 medidas obtidas na precisão, obteve-se DPR de 4,5 %, mostrado na Tabela 47, entre as 12 amostras, o que atende ao parâmetro de precisão intermediária.

**Tabela 47** – Avaliação de Precisão Intermediária pelo cálculo de DPR (%)

<b>Avaliação da Precisão Intermediária</b>	7,66
	7,57
	7,28
	7,42
	7,09
	7,73
	7,45
	6,79
	7,31
	6,87
	6,79
	7,23
Média	7,2658333
Desvio Padrão	0,3254216
DPR (%)	4,5

Para os testes de repetibilidade e precisão intermediária o etanol apresentou DPR satisfatório, < 5%, esse valor é indicado na Farmacopeia Brasileira como valor máximo de DPR para outros radiofármacos que utilizam a mesma técnica para essa avaliação (ANVISA, 2020).

Para o DMSO observa-se valores elevados de DPR, o que era esperado devido a sua baixa concentração, porém como a presença do DMSO é um resíduo da síntese presente na amostra os valores obtidos são muito baixos e menores que o LQ do método. Tendo em vista que são valores menores que o LQ definido não é possível aplicar critérios para avaliação desse.

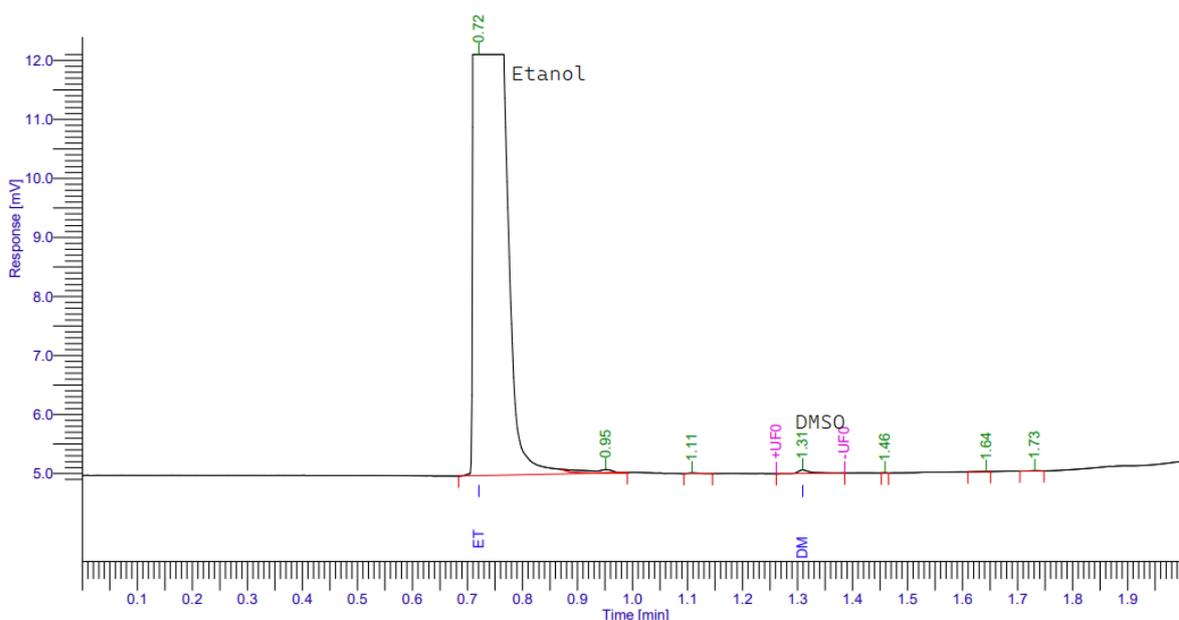
Não foi realizada a comparação entre as médias de etanol obtidas na precisão repetibilidade e precisão intermediária devido as seguintes particularidades do

produto: não seria possível utilizar a mesma amostra para os dois testes, uma vez que o teste é realizado em dias diferentes, e no segundo dia devido a exposição da amostra ao ambiente sua concentração de etanol poderia encontrar-se alterada, além de o produto estar fora de seu prazo de validade, uma vez que o prazo de validade é de 10 horas; não seria possível comparar amostras de duas sínteses diferentes, uma vez que a quantidade de etanol presente na amostra depende do processo de síntese, estando as duas dentro do limite de 10% não necessariamente devem ser iguais estatisticamente.

O método apresentou precisão satisfatória, uma vez que atendeu aos critérios estabelecidos para DPR.

A Figura 56 mostra um cromatograma obtido no ensaio de precisão, nesse é possível observar que o pico referente ao DMSO apresenta intensidade muito baixa, o que impossibilita a quantificação precisa. Vale ressaltar que esse fato não é um problema do método analítico, uma vez que se trata do produto acabado e que a baixa concentração de DMSO presente é desejável, pois se trata de um solvente que tem limites controlados em produtos farmacêuticos, indicando ainda, que o processo de purificação na etapa de síntese se deu de forma efetiva.

**Figura 56** - Cromatograma obtido com a solução amostra de 18F-PSMA 1007 para avaliação da precisão



### 5.8 Validação de processo e Estudo de Estabilidade

Foram produzidos três lotes para execução dos estudos de validação de processo e estabilidade. A Tabela 48 mostra os rendimentos obtidos.

**Tabela 48** - Rendimentos obtidos para as três sínteses realizadas para estudo de validação de processo e estabilidade

Síntese	Atividade inicial ( $^{18}\text{F}$ ) (GBq)	Atividade final (GBq)	Rendimento do processo (%)
1	363002	87428	24,1
2	365181	84911	23,2
3	362449	85358	23,6
<b>Média</b>	<b>363544</b>	<b>85899</b>	<b>23,6</b>

Os resultados obtidos para o rendimento de processo das três sínteses foram próximos, porém mais baixos que outros rendimentos obtidos em sínteses anteriores. Cardinale e colaboradores (2017) descreveram que há grande variação nos rendimentos obtidos para sínteses realizadas no módulo TracerLab MX.

A Quadro 4 resume os resultados obtidos com as três sínteses do radiofármaco  $^{18}\text{F}$  PSMA-1007 realizadas para estudo de validação de processo e estabilidade. São mostrados na Tabela o valor médio, o menor e o maior valor obtido nas três sínteses.

**Quadro 4** - Resultados da caracterização físico-química do radiofármaco  $^{18}\text{F}$  PSMA-1007 obtidos com as três sínteses realizada para estudo de validação de processo e estabilidade

Testes	Especificações	Resultados				
		0h / Inicial	2,5 h	5 h	7,5 h	10 h
Inspeção visual	Solução límpida, incolor ou levemente amarelada.	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
pH	Entre 4,5 e 8,5	Maior: 7,75 Média: 7,61 Menor: 7,36	Maior: 7,62 Média: 7,60 Menor: 7,59	Maior: 7,58 Média: 7,50 Menor: 7,40	Maior: 7,39 Média: 7,37 Menor: 7,35	Maior: 7,29 Média: 7,27 Menor: 7,23
Identificação Radioquímica	O $T_R$ da amostra de PSMA-1007( $^{18}\text{F}$ ) no ensaio de Pureza Radioquímica deve ser semelhante ao $T_R$ de PSMA padrão (aproximadamente 8 minutos).	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Pureza Radioquímica	A radioatividade de $^{18}\text{F}$ -PSMA-1007 não deve ser inferior a 91% da radioatividade total	Maior: 94,96% Média: 94,42% Menor: 94,12%	Maior: 94,81% Média: 94,69% Menor: 94,62%	Maior: 95,60% Média: 95,33% Menor: 95,09%	Maior: 94,33% Média: 93,72% Menor: 93,41%	Maior: 95,41% Média: 94,54% Menor: 94,08%

(continua)

**Quadro 4-** Resultados da caracterização físico-química do radiofármaco 18F PSMA-1007 obtidos com as três sínteses realizada para estudo de validação de processo e estabilidade (continuação)

Testes	Especificações	Resultados				
		0h / Inicial	2,5 h	5 h	7,5 h	10 h
Pureza Química	O tamanho e a intensidade da mancha obtida para amostra de PSMA-1007 (18F) não devem exceder os da mancha obtida para TBA padrão 260 µg/mL	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme

(continua)

**Quadro 4** - Resultados da caracterização físico-química do radiofármaco <sup>18</sup>F PSMA-1007 obtidos com as três sínteses realizada para estudo de validação de processo e estabilidade (continuação)

Testes	Especificações	Resultados				
		0h / Inicial	2,5 h	5 h	7,5 h	10 h
PSMA-1007 e substâncias relacionadas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A área de PSMA na amostra de PSMA-1007 (<sup>18</sup>F) não é superior à área do pico obtido para PSMA padrão 10 g/L.</li> <li>• A área de qualquer outra impureza não é superior à área do pico obtido para PSMA padrão 10 g/L.</li> <li>• Total: A soma das áreas de quaisquer picos significativos não é superior a 5 vezes a área do pico obtido para PSMA padrão 10 g/L.</li> </ul>	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Solventes residuais	Dimetilsulfóxido: < 0,5% p/v	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ

(continua)

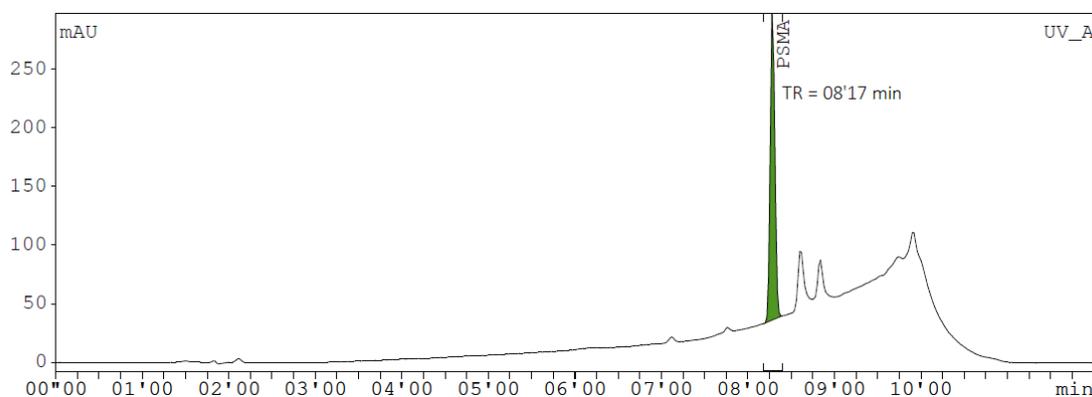
**Quadro 4** - Resultados da caracterização físico-química do radiofármaco 18F PSMA-1007 obtidos com as três sínteses realizada para estudo de validação de processo e estabilidade (conclusão)

Testes	Especificações	Resultados				
		0h / Inicial	2,5 h	5 h	7,5 h	10 h
Determinação de etanol	< 10% v/v	Maior: 9,5% v/v Média: 8,8% v/v Menor: 8,1% v/v	Maior: 8,4% v/v Média: 7,6% v/v Menor: 7,9% v/v	Maior: 8,4% v/v Média: 8,0% v/v Menor: 8,2% v/v	Maior: 7,8% v/v Média: 7,8% v/v Menor: 9,3% v/v	Maior: 7,0% v/v Média: 7,6% v/v Menor: 5,6% v/v
Identificação Radionuclídica	A meia-vida deve estar entre 105 e 115 minutos.	Maior: 112,0 min Média: 108,8 min Menor: 105,8 min	Maior: 108,4 min Média: 107,6 min Menor: 106,1 min	Maior: 110,6 min Média: 110,3 min Menor: 109,7 min	Maior: 111,6 min Média: 110,1 min Menor: 108,8 min	Maior: 112,4 min Média: 110,4 min Menor: 109,1 min
Pureza Radionuclídica	Não menos do que 99,9% das emissões gama devem corresponder a picos de $511,0 \pm 0,5$ keV; $1022,0 \pm 0,5$ keV ou referentes ao espalhamento Compton do flúor-18	100,00%	100,00%	99,99%	99,98%	99,99%

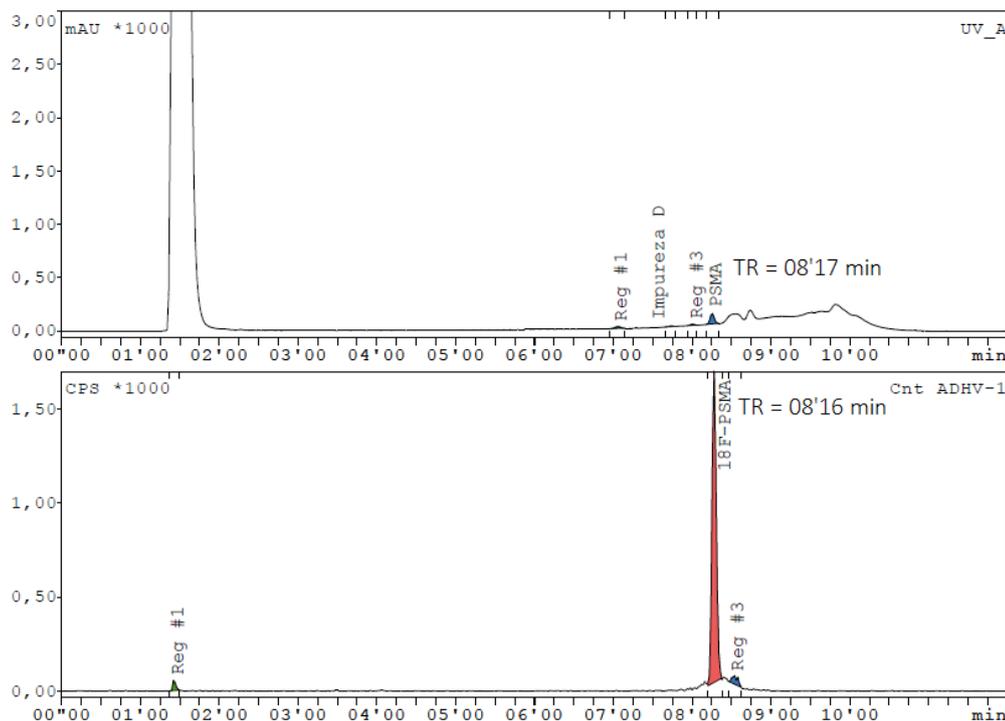
Os três lotes apresentaram a mesma aparência após inspeção visual, mostraram-se límpidos e incolores. Observou-se que com o passar dos dias a solução tornou-se levemente amarelada, acredita-se que esse fato esteja relacionado à presença de ascorbato de sódio na formulação, sendo esse um sal derivado do ácido ascórbico e sabendo que soluções de ácido ascórbico são facilmente oxidadas na presença de ar e que quando isso ocorre essas adquirem coloração amarelada. Porém, mesmo com alteração de coloração o produto mantém-se dentro da especificação (NCBI, 2022). O pH dos três lotes encontra-se dentro da especificação, os valores medidos nos diferentes tempos para os três lotes variaram de 7,23 a 7,75, sendo compatível para o uso como produto injetável.

O teste de identificação radioquímica mostrou-se conforme para todos os tempos, uma vez que em todas as injeções de amostra realizadas no decorrer dos estudos de estabilidade e validação de processo o TR da amostra foi semelhante ao TR obtido com a solução padrão. Nas Figuras 57 e 58 podemos observar um cromatograma de padrão e amostra, respectivamente obtidos durante o estudo.

**Figura 57** - Cromatograma obtido em detector ultravioleta a 225 nm com a solução padrão de PSMA-1007 10 g/L.



**Figura 58** - Cromatograma obtido com amostra do produto 18F PSMA-1007. Cromatograma superior corresponde ao detector ultravioleta a 225 nm e o inferior, ao de radioatividade.

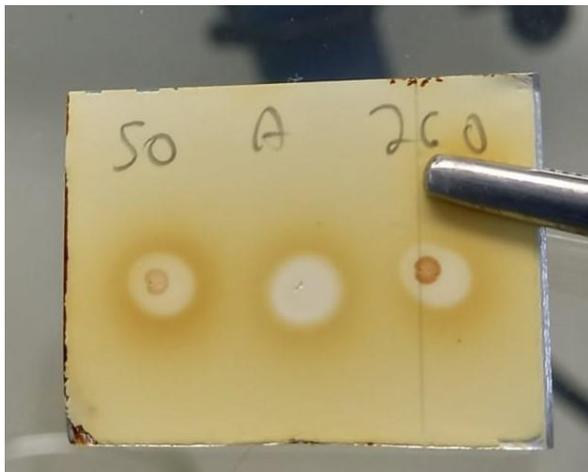


Nos cromatogramas é possível observar o TR do padrão = 8'17 min e da amostra no detector UV TR = 08'17 min e no detector de radioatividade TR = 08'18 min. No detector de radioatividade é possível identificar que o pico presente em maior proporção corresponde ao PSMA radiomarcado.

Para identificação e pureza radionuclídica todos os lotes apresentaram resultados dentro da especificação. O critério de aceitação de tempo de meia-vida, que é comum para outros radiofármacos marcados com flúor foi atendido em todos os tempos, confirmando ser o flúor-18 o radionuclídeo presente na amostra e pelos resultados de pureza radionuclídica esse foi determinado quantitativamente (ANVISA, 2019<sup>a</sup>, EDQM, 2021).

Para avaliação da pureza química os limites de TBA mostraram-se de acordo com a especificação, em todos os pontos analisados as concentrações de TBA na amostra estavam menores que o limite permitido, 260 g/L. Pela intensidade da mancha obtida sabe-se que a concentração de TBA presente na amostra é inferior a 50 g/L. Na Figura 59 é apresentado o resultado obtido para avaliação de TBA.

**Figura 59** - Aplicação de padrão de TBA 50 g/L (50) / aplicação de amostra de  $^{18}\text{F}$  PSMA-1007 (A) / aplicação de padrão de TBA 260 g/L (260).



Os limites de DMSO e etanol atenderam aos critérios definidos. O DMSO está presente em baixas concentrações na amostra, na maioria dos pontos avaliados estava em valores menores que o LQ do método, portanto, não sendo possível quantificá-lo com adequada exatidão e precisão. Diante disso, o resultado das amostras foi reportado como sendo  $< \text{LQ}$ . Para o etanol observou-se variação entre os três lotes e variações entre os pontos do mesmo lote, tendo em vista que os valores são próximos e dentro da especificação, acredita-se que essa variação observada seja intrínseca a técnica de cromatografia gasosa com injeção direta. Cardinale e colaboradores (2017) ao realizar a síntese do  $^{18}\text{F}$  PSMA-1007 em módulo de síntese semelhante ao utilizado obtiveram teores de etanol que variaram de 6,8 a 7,1 % v/v, os valores mais altos observados para as sínteses realizadas podem ser atribuídos ao uso do etanol em várias etapas do processo de síntese.

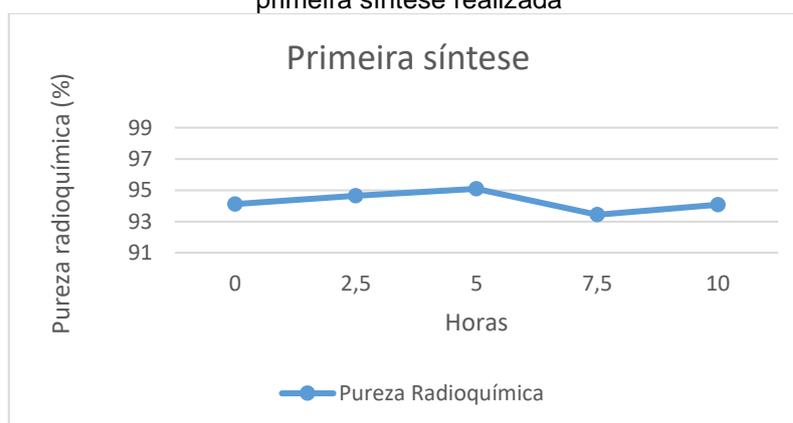
Os valores obtidos para pureza radioquímica encontram-se dentro da especificação e coerentes com valores obtidos por outros autores que utilizaram o módulo de síntese TracerLab MX. Os resultados obtidos no T0 do estudo de estabilidade são os resultados utilizados para compor o estudo da validação de processo, diante disso foram obtidos os valores de 94,12%, 94,96% e 94,17% para os três lotes, respectivamente. Santos (2022) obteve pureza radioquímica de  $95,89 \pm 1,32\%$ , Cardinale e colaboradores (2017) obtiveram pureza radioquímica de  $97,0 \pm 1,1\%$ , os dois trabalhos citados utilizaram o módulo TracerLab e a técnica de cromatografia líquida para análise da pureza radioquímica. Shamni e colaboradores (2019) relataram que ao executar a síntese do  $^{18}\text{F}$  PSMA-1007 os valores obtidos para a pureza

radioquímica eram próximos a 87%, valor esse que não atende ao critério de aceitação, diante disso, propuseram mudanças nas etapas de purificação, a fim de melhorar a pureza, após modificações obtiveram pureza de 94%.

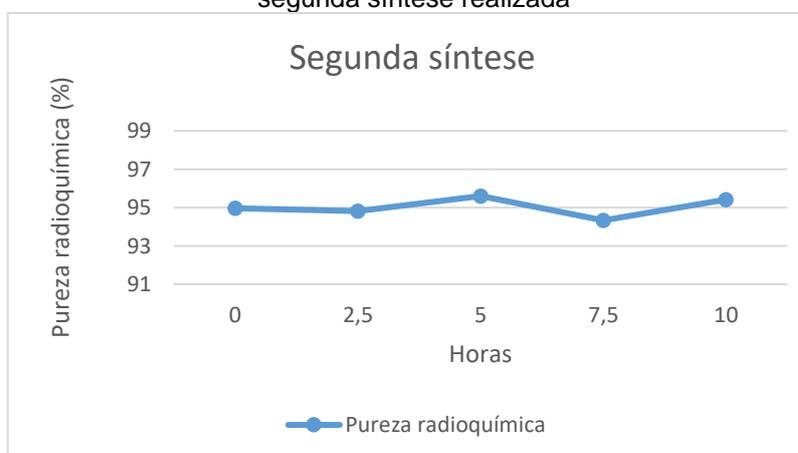
Nos gráficos mostrados nas Figuras 60, 61 e 62 são ilustrados os resultados obtidos para a pureza radioquímica ao longo do estudo de estabilidade, observa-se que os valores se mantiveram estáveis ao longo do estudo, não se observou diminuição considerável da pureza, o que indica a estabilidade do produto radiomarcado.

Acredita-se que um dos fatores que contribuem para a estabilidade do produto ao longo das horas é a presença do ascorbato de sódio na formulação. O ascorbato de sódio pode ser considerado um sequestrador de radicais livres, o que inibe a decomposição radiolítica e fornece soluções estáveis, por pelo menos várias meias-vidas do radionuclídeo, e são, portanto, adequadas para injeção em pacientes (SCOTT *et al.*, 2009).

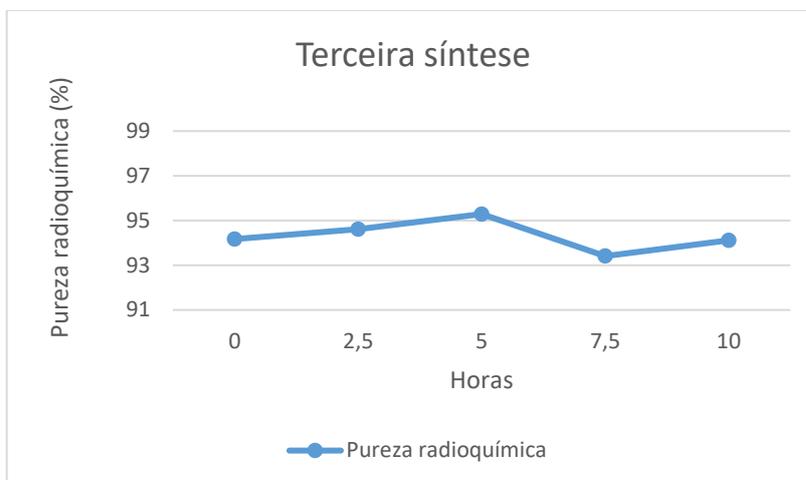
**Figura 60** - Resultados de pureza radioquímica obtidos ao longo do estudo de estabilidade para a primeira síntese realizada



**Figura 61** - Resultados de pureza radioquímica obtidos ao longo do estudo de estabilidade para a segunda síntese realizada



**Figura 62** - Resultados de pureza radioquímica obtidos ao longo do estudo de estabilidade para a terceira síntese realizada



Diante dos resultados obtidos o processo de síntese do radiofármaco  $^{18}\text{F}$  PSMA 1007 no CDTN está validado e desta forma pode-se definir o prazo de validade do produto em 10 horas, uma vez que nesse período de análise os resultados mantiveram-se dentro das especificações exigidas.

## 6 CONCLUSÕES

Um procedimento para síntese do radiofármaco  $^{18}\text{F}$  PSMA-1007 no equipamento TRACERlab FX<sub>pro</sub> foi implantado e se mostrou viável e capaz de ser executado segundo as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos.

Para os testes farmacopeicos em que não foi possível aplicar as metodologias da Farmacopeia Europeia desenvolveu-se metodologias próprias conforme preconizado pela ANVISA. Para o teste de pureza química foi desenvolvido método analítico utilizando a técnica de cromatografia em camada delgada. Para o teste de pureza radioquímica foi desenvolvido método analítico utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. Para o teste de determinação de solventes residuais, etanol e DMSO, foi desenvolvido método analítico utilizando a técnica de cromatografia gasosa. Os métodos analíticos desenvolvidos, apresentam melhorias em relação aos da Farmacopeia Europeia, foram validados e atenderam os critérios de aceitação exigidos pela RDC 166.

O processo de síntese do radiofármaco  $^{18}\text{F}$ -PSMA-1007 está validado para produção no CDTN, os três lotes produzidos para esse estudo foram caracterizados analiticamente e cumpriram com todos os critérios de aceitação estabelecidos pela Anvisa.

O prazo de validade do radiofármaco foi estabelecido como 10 horas. Durante o estudo de estabilidade o produto foi analisado por esse período e cumpriu com todos os critérios de qualidade.

## **7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS**

- Aplicar as avaliações estatísticas cabíveis aos testes de robustez realizados, a fim de fixar nos procedimentos do CDTN condições que não podem sofrer alterações na rotina de análises.
- Investigar parâmetros de síntese que possam proporcionar aumento do rendimento do processo.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, Vivian Mae Schmidt Lima *et al.* Fatores associados à realização dos exames de rastreamento para o câncer de próstata: um estudo de base populacional. **Cadernos de Saúde Pública**, [S.L.], v. 27, n. 2, p. 347-356, fev. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-311x2011000200016>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csp/a/JXrg87pyCb5kMbGcBZdMLQn/?lang=pt>. Acesso em: 28 fev. 2022.

Ansel HC, Popovich NG, Allen-Jr LV. Farmacotécnica: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos. 8. ed. Porto Alegre: Artmed; 2007. P. 775.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**, volume 1. 6ª Ed. Brasília, 2019a.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Instrução Normativa nº 37/2019, de 21 de agosto de 2019**. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação complementares a Medicamentos radiofármacos. Brasília, 2019b.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Instrução Normativa nº 47/2019, de 21 de agosto de 2019**. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação complementares às atividades de qualificação e validação. Brasília, 2019c.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Instrução Normativa nº 80/2020, de 16 de dezembro de 2020**. Regulamenta a documentação necessária para o protocolo de registro de radiofármaco. Brasília, 2020.

BACELAR JÚNIOR, Arilton Januário *et al.* CÂNCER DE PRÓSTATA: MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO, PREVENÇÃO E TRATAMENTO. **Brazilian Journal Of Surgery And Clinical Research - Bjsc**. Paraná, p. 40-46. 2015.

BANERJEE, Sangeeta Ray *et al.* 68Ga-Labeled Inhibitors of Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) for Imaging Prostate Cancer. **Journal Of Medicinal Chemistry**., p. 5333-5341. maio 2010.

BARINKA, C.; *et al.*, Interactions between human glutamate carboxypeptidase II and urea-based inhibitors: structural characterization. **Journal Of Medicinal Chemistry**.,v. 51, p. 7737–7743, 2008.

Bouchelouche K, Choyke PL, Capala J. Prostate specific membrane antigen- a target for imaging and therapy with radionuclides. **Discov Med**. 2010 Jan;9(44):55-61. PMID: 20102687; PMCID: PMC3410553.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - **RDC n. 301**, de 21 de agosto de 2019. “Dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos.”. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2019a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - **RDC n. 451**, de 16 de dezembro de 2020. “Dispõe sobre o registro, notificação,

importação e controle de qualidade de radiofármacos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - **RDC n. 166**, de 24 de julho de 2017. "Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências." Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - **RDC n. 318**, de 6 de novembro de 2019. "Estabelece os critérios para a realização de Estudos de Estabilidade de insumos farmacêuticos ativos e medicamentos, exceto biológicos, e dá outras providências." Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2019b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Programa nacional de controle do câncer da próstata: documento de consenso**. - Rio de Janeiro: INCA, 2002

BRASILEIRO FILHO G. **Bogliolo: Patologia**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

BRITO, Natilene Mesquita *et al.* Validação de Métodos Analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, p. 129-146, dez. 2003.

BRUM I. S.; SPRITZER P.M.; BRENTANI M.M.; *Biologia Molecular das Neoplasias de Próstata*. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 49, n. 5, p. 797-804, out. 2005

CARDINALE, Jens *et al.* Preclinical Evaluation of 18F-PSMA-1007, a New Prostate-Specific Membrane Antigen Ligand for Prostate Cancer Imaging. **Journal Of Nuclear Medicine**, [S.L.], v. 58, n. 3, p. 425-431, 27 out. 2016. Society of Nuclear Medicine. <http://dx.doi.org/10.2967/jnumed.116.181768>.

CARDINALE, Jens *et al.* Procedures for the GMP-Compliant Production and Quality Control of [18F]PSMA-1007: A Next Generation Radiofluorinated Tracer for the Detection of Prostate Cancer. **Pharmaceuticals**. p. 1-18. set. 2017.

CARSON-JURICA, Mary Anne *et al.* Steroid Receptor Family: structure and functions. **Endocrine Reviews**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 201-220, maio 1990. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/edrv-11-2-201>

CUNHA, Gerald R. *et al.* Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. **The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology**, [S.L.], v. 92, n. 4, p. 221-236, nov. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.10.017>.

EANM (European Association of Nuclear Medicine) **Guidelines on Current good radiopharmacy practice (cGRPP) in the preparation of radiopharmaceuticals**.

Version 2, March 2007. [https://www.eanm.org/publications/guidelines/gl\\_radioph\\_cgrpp.pdf](https://www.eanm.org/publications/guidelines/gl_radioph_cgrpp.pdf). Acesso em: 15 jun de 2022.

EDER, Matthias *et al.* 68Ga-Complex Lipophilicity and the Targeting Property of a Urea-Based PSMA Inhibitor for PET Imaging. **Bioconjugate Chemistry**, [S.L.], v. 23, n. 4, p. 688-697, 13 mar. 2012. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bc200279b>.

EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare) European Pharmacopoeia. PSMA-1007 (18F) INJECTION. 10 ED. Council of Europe, 2021. p 5725 -5727

FOSTER, John R. Cell Death and Cell Proliferation in the control of normal and neoplastic tissue growth. **Toxicologic Pathology**, United Kingdom, v. 28, n. 3, p. 441-446, mar. 2000.

GHOSH, Arundhati; HESTON, Warren D.W.. Tumor Target Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA) and its Regulation in Prostate Cancer. **Journal Of Cellular Biochemistry**. Cleveland, p. 528-539. ago. 2003.

GIESEL, Frederik L. *et al.* Detection Efficacy of 18F-PSMA-1007 PET/CT in 251 Patients with Biochemical Recurrence of Prostate Cancer After Radical Prostatectomy. **Journal Of Nuclear Medicine**, [S.L.], v. 60, n. 3, p. 362-368, 24 jul. 2018. Society of Nuclear Medicine. <http://dx.doi.org/10.2967/jnumed.118.212233>.

GIESEL, Frederik L. *et al.* F-18 labelled PSMA-1007: biodistribution, radiation dosimetry and histopathological validation of tumor lesions in prostate cancer patients. **European Journal Of Nuclear Medicine And Molecular Imaging**. Heidelberg, p. 678-688. nov. 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00259-016-3573-4>. Acesso em: 02 mar. 2022.

GILLINGS, Nic *et al.* Guideline on current good radiopharmacy practice (cGRPP) for the small-scale preparation of radiopharmaceuticals. **Ejnmri Radiopharmacy And Chemistry**, [S.L.], v. 6, n. 1, 12 fev. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s41181-021-00123-2>. Acesso em: 17 jun 2022

GIUDICE, Gabriella Hamú. Parâmetros de uma validação analítica: uma revisão bibliográfica. **Acta de Ciências e Saúde**, v. 01, n. 05, p. 130-134, 2016.

HONG, Jun-Jie *et al.* The value of 18F-PSMA-1007 PET/CT in identifying non-metastatic high-risk prostate cancer. **Ejnmri Research**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 10 nov. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13550-020-00730-1>.

ICH, The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use “Impurities: Guideline for Residual Solvents Q3C(R8)” 4<sup>a</sup>.ed. Abril de 2021, disponível em

< [https://database.ich.org/sites/default/files/ICH\\_Q3C\\_R8\\_Guideline\\_Step4\\_2021\\_0422\\_1.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q3C_R8_Guideline_Step4_2021_0422_1.pdf) >. Acesso em 01 de março

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Nuclear Medicine Resources Manual, Non-serial Publications, IAEA, Vienna (2006)

JADVAR, Hossein. Molecular Imaging of Prostate Cancer: pet radiotracers. **American Journal Of Roentgenology**, [S.L.], v. 199, n. 2, p. 278-291, ago. 2012. American Roentgen Ray Society. <http://dx.doi.org/10.2214/ajr.12.8816>.

K. E. R. Silva, L. D. S. Alves, M. F. R. Soares, R. C. S. Passos, A. R. Faria, P. J. Rolim Neto, Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica, **Rev Cien Farm Básica** 30(2), pp. 129-135 (2009).

KELLY, James *et al.* Synthesis and pre-clinical evaluation of a new class of high-affinity 18F-labeled PSMA ligands for detection of prostate cancer by PET imaging. **European Journal Of Nuclear Medicine And Molecular Imaging**. [S. L.], p. 647-661. nov. 2016.

KESCH, Claudia *et al.* Intraindividual Comparison of 18F-PSMA-1007 PET/CT, Multiparametric MRI, and Radical Prostatectomy Specimens in Patients with Primary Prostate Cancer: a retrospective, proof-of-concept study. **Journal Of Nuclear Medicine**, [S.L.], v. 58, n. 11, p. 1805-1810, 4 maio 2017. Society of Nuclear Medicine. <http://dx.doi.org/10.2967/jnumed.116.189233>.

LEE C., COCKETT A., CUSSENOT O., GRIFFTHS K., ISAACS W., SCHALKEN J. Regulation of prostate growth. In: Chatelain C, Denis L, Foo JKT, editors, *et al.* **Fifth International Consultation on Benign Prostatic Hyperplasia**. Plymouth, United Kingdom: Health Publications; 2001. p. 81–106.

LEZE, Eduardo Moussa de Jabur. **O papel da Leptina na hiperplasia prostática benigna humana**. 2011. 45 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011

LIMA H.; LORENZETTI F. Hiperplasia Prostática Benigna. In: **Urologia Fundamental**. São Paulo: PlanMark, 2010. p. 195-204.

LOBO FILHO, Adriano Marcelino *et al.* Uso de Radioisótopos para diagnóstico. **Revista Interdisciplinar do Pensamento Científico**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 5, p. 1899-1909, dez. 2019.

MACÉA J. R., PINTO A. C. Anatomia Cirúrgica dos Tratos Urinário e Genital. In: **Urologia Fundamental**. São Paulo: PlanMark, 2010. p. 18-28.

MAFELD, Sebastian *et al.* Evolving role of positron emission tomography (PET) in urological malignancy. **Bju International**, [S.L.], v. 116, n. 4, p. 538-545, 25 maio 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/bju.12988>.

MARKER, Paul C; A DONJACOUR, Annemarie; DAHIYA, Rajvir; CUNHA, Gerald R. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. **Developmental**

**Biology**, [S.L.], v. 253, n. 2, p. 165-174, jan. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0012-1606\(02\)00031-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0012-1606(02)00031-3).

MARTINS, Patrícia de A. *et al.* RADIOCHEMICAL STABILITY OF RADIOPHARMACEUTICAL PREPARATIONS. In: V INTERNATIONAL NUCLEAR ATLANTIC CONFERENCE, 2011, Belo Horizonte. INAC, 2011. Disponível em: <https://www.ipen.br/biblioteca/2011/inac/17086.pdf>. Acesso em: 24 jun. 2022.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Guia: Validação e Controle de Qualidade Analítica (Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários), Brasília, 2011.

Ministério da Saúde. **Tipos de câncer**: Câncer de próstata. 2021. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-prostata>>. Acesso em: 27 fevereiro 2022

MOLAVIPORDANJANI, Sajjad; HOSSEINIMEHR, Seyed Jalal. Fundamental concepts of radiopharmaceuticals quality controls. **Pharmaceutical And Biomedical Research**, [S.L.], v. 3, n. 4, p. 22-29, 13 mar. 2019. Knowledge E. <http://dx.doi.org/10.18502/pbr.v4i3.538>.

MOORADIAN, A. D. *et al.* Biological Actions of Androgens. **Endocrine Reviews**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1-28, fev. 1987. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/edrv-8-1-1>.

NAKA, Sadahiro *et al.* Automated <sup>18</sup>F PSMA-1007 production by a single use cassette-type synthesizer for clinical examination. **Ejnmri Radiopharmacy And Chemistry**. 2020.

National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 23667548, Sodium ascorbate. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-ascorbate>. Acesso em: 28 jun. 2022

OH, So Won *et al.* Prostate Specific Membrane Antigen PET Imaging in Prostate Cancer: Opportunities and Challenges. **Korean Journal Of Radiology**. Korea, p. 819-831. set. 2018.

OLIVEIRA, Rita *et al.* Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Coimbra, v. 42, n. 2, p. 151-165, abr./jun. 2006.

PIANO, Nikoletta K. *et al.* More advantages in detecting bone and soft tissue metastases <sup>18</sup>F from prostate cancer using F-PSMA PET/CT. **Hell J Nucl Med**. [S. L], p. 6-9. abr. 2019. Disponível em: <https://www.nuclmed.gr/wp/wp-content/uploads/2019/04/04.Pianou-Editorial.pdf> Acesso em: 25 fev. 2022.

REIS R. B.; CASSINI M. F. Antígeno Prostático Específico (PSA). In: **Urologia Fundamental**. São Paulo: PlanMark, 2010. p. 189-194.

ROBILOTTA, C. C., **Rev Panam Salud Publica** vol.20 n.2-3 Washington Aug./Sep. 2006. Positron emission tomography: a new modality in Brazilian nuclear medicine.

RUIVO, Julio C. *et al.* DETERMINAÇÃO DA MEIA VIDA DE ISÓTOPOS DE TELÚRIO: uma proposta para o ensino de física nuclear. In: INTERNATIONAL NUCLEAR ATLANTIC CONFERENCE - INAC, Recife. **INAC**, 2013.

SARRIS, Andrey Biff. CÂNCER DE PRÓSTATA: UMA BREVE REVISÃO ATUALIZADA. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 137-151, mar. 2018.

SCOTT, Peter J.H. *et al.* Studies into radiolytic decomposition of fluorine-18 labeled radiopharmaceuticals for positron emission tomography. **Applied Radiation And Isotopes**, v. 67, n. 1, p. 88-94, jan. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apradiso.2008.08.015>.

SHUKLA, Jaya *et al.* Quality control of positron emission tomography radiopharmaceuticals: An institutional experience. **Indian Journal Of Nuclear Medicine**. p. 200-205.2013.

SOUZA, Scheilla Vitorino Carvalho de. **Procedimento para Validação Intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos**. 2007. 297 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmácia, Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

SROUGI, Miguel *et al.* Doenças da próstata. **Revista de Medicina**, São Paulo, v. 3, n. 87, p. 166-177, set. 2008. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/revistadc/article/view/59075>. Acesso em: 04 mar. 2022.

SUNG, Hyuna *et al.* Global Cancer Statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, [S.L.], v. 71, n. 3, p. 209-249, 4 fev. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21660>.

TAVARES, Jamille A. Lopes; SANTOS, Marcus Aurélio P. dos; LIRA, Renata F. de. Avaliação do controle de qualidade de radiofármacos em serviço de medicina nuclear. **Brazilian Journal Of Radiation Sciences**. Recife, Pe, p. 1-8. mar. 2015.

TING, Elgin; LAHEY, Cynthia. Quantitation of Residual Solvent in Radiopharmaceuticals. **Shimadzu Excellence In Science: Application News**, out. 2021.

TODDE, S. *et al.* Guidance on validation and qualification of processes and operations involving radiopharmaceuticals. **Ejnmri Radiopharmacy And Chemistry**, v. 2, n. 1, 29 jun. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s41181-017-0025-9>. Acesso em: 18 jun 2022

United States Pharmacopeia (2022). *General Chapter, (1467) Residual Solvents—Verification of Compendial Procedures and Validation of Alternative Procedures*. USP-NF. Rockville, MD: United States Pharmacopeia.

VALDERRAMA, P.; BRAGA J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, Vol. 32, No. 5, 1278-1287, 2009.

VALENTINI, Sóstenes Rosa *et al.* Validação de Métodos Analíticos. **Arq Mudi**, Maringá, v. 2, n. 11, p. 26-31, abr. 2007.

VIDEIRA, H. S.; FONDA, U. de S.; ITIKAWA, E. N.; GUIMARÃES, M. I. C. C.; BUCHPIGUEL, C. A.; OKAMOTO, M. R. Y.; SÁ, U. L. D. F.; FILHO, R. M.; VICTORIA, A. F.; FERNANDES, B. L. O cenário mundial de radiofármacos emissores de pósitrons para diagnóstico e estadiamento de câncer de próstata em medicina nuclear. **Brazilian Journal of Radiation Sciences**, [S. l.], v. 8, n. 1, 2020. DOI: 10.15392/bjrs.v8i1.1115. Disponível em: <https://www.bjrs.org.br/revista/index.php/REVISTA/article/view/1115>. Acesso em: 28 mar. 2022.

Vocabulário Internacional de Metrologia: **Conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2012)**. Duque de Caxias, RJ : INMETRO, 2012. 94 p.

W. J. Youden and E. H. Steiner, "Statistical Manual of the AOAC—Association of the Official Analytical Chemists," AOAC-I, Washington DC, 1975.

WERNER, Rudolf A. *et al.* 18F-Labeled, PSMA-Targeted Radiotracers: leveraging the advantages of radiofluorination for prostate cancer molecular imaging. **Theranostics**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-16, 2020. Ivyspring International Publisher. <http://dx.doi.org/10.7150/thno.37894>.

WERNER, Rudolf A. *et al.* Moving into the next era of PET myocardial perfusion imaging: introduction of novel 18f-labeled tracers. **The International Journal Of Cardiovascular Imaging**, [S.L.], v. 35, n. 3, p. 569-577, 17 out. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10554-018-1469-z>.

WURZER, Alexander *et al.* Automated synthesis of [18F]Ga-rhPSMA-7/ -7.3: results, quality control and experience from more than 200 routine productions. **Ejnmri Radiopharmacy And Chemistry**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-15, 23 jan. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s41181-021-00120-5>.

XAVIER, Allan Moreira *et al.* MARCOS DA HISTÓRIA DA RADIOATIVIDADE E TENDÊNCIAS ATUAIS. **Química Nova**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 83-91, 2007.