

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

Gabriela Lemos Ribeiro de Souza

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA APLICADA À
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA
CARACTERIZAÇÃO DO RADIOFÁRMACO PSMA-1007 (^{18}F).**

BELO HORIZONTE

2024

Gabriela Lemos Ribeiro de Souza

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA APLICADA À
CROMATOGRAPHIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA
CARACTERIZAÇÃO DO RADIOFÁRMACO PSMA-1007 (^{18}F).**

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

2024

Souza, Gabriela Lemos Ribeiro de.

S729o Otimização e validação de metodologia analítica aplicada à cromatografia líquida de alta eficiência para caracterização do radiofármaco PSMA-1007 (¹⁸F) / Gabriela Lemos Ribeiro de Souza. – 2024.

85 f. : il.

Orientador: Ildefonso 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, 2024.

Bibliografia.

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

CDD: 615.8424

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Deus, meu Pai Amado, meu alicerce. Sem Ele eu nada seria. Obrigada por me sondar e sustentar em todos os meus momentos de fraqueza. Minha pequenez e Sua grandiosidade se complementaram em tempos difíceis. Graças a Ele, estou realizando mais um sonho e a Ele dedico o presente trabalho e todos os que ainda estão por vir.

Gratidão aos meus queridos e amados pais, Rosemary e Sérgio, que em nenhum momento sequer deixaram de me apoiar, incentivar, cativar e orientar durante todo meu processo. A minha vovó Janette pelas constantes orações, carinho, doçura e proteção. Minha vida sem os três não faz sentido.

Ao meu namorado e grande amor da minha vida, Breno, que em momentos de desespero e ansiedade me abraçou e foi meu porto seguro. A vida ao lado desse grande homem fez a minha caminhada ser menos árdua. Agradeço diariamente à Deus pelo prazer de tê-lo ao meu lado.

Ao meu incrível orientador Ildefonso Binatti, que me direcionou de forma majestosa. Obrigada por ser muito mais que isso, pelo apoio, ensinamentos, oportunidades e confiança. Serei eternamente grata ao meu querido professor, pai científico e futuro orientador de doutorado.

A Marina (coorientadora), Leonardo e Cassiano que abriram as portas do CDTN para mim, confiaram no meu trabalho e tiveram paciência em sentar comigo diversas vezes para sanar minhas dúvidas e me orientar.

A todos os incríveis colaboradores do CDTN, em especial a Ana Clara, Irene, Caio, Ana Olívia, Bruno e Enzo. Pessoas iluminadas que tive o prazer de conhecer, me auxiliaram na execução prática do meu trabalho e se tornaram amigas.

Aos meus professores do CEFET-MG que contribuíram para minha formação.

RESUMO

No Brasil o câncer de próstata é o segundo tipo de tumor maligno mais incidente no sexo masculino e se detectado precocemente a chance de cura aumenta de forma significativa. O Antígeno de Membrana Específico da Próstata marcado com ^{18}F , do inglês *Prostate Specific Membrane Antigen* (PSMA-1007(^{18}F)) é um novo radiofármaco que possui um radionuclídeo emissor de pósitrons é utilizado para fins diagnósticos da doença. Para que a sua utilização seja segura, a ANVISA preconiza testes de controle de qualidade que atendam às Boas Práticas de Fabricação estabelecidas pelo órgão regulador.

Visando otimizar o controle de qualidade, foi desenvolvido um método analítico implementado na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) para determinação da pureza e identificação radioquímica das marcações. O método elaborado no presente trabalho, em relação à metodologia desenvolvida e validada no CDTN, apresenta algumas vantagens como a substituição do solvente orgânico por um mais barato, de mais fácil aquisição e de menor toxicidade, a mudança do solvente aquoso por um que não utiliza tampão, evitando o entupimento de coluna e a diminuição do tempo de eluição de 12 minutos para 10 minutos.

A validação analítica do processo decorreu de forma satisfatória visto que atendeu todos os critérios exigidos na RDC nº 166/2017 da ANVISA. No ensaio de seletividade do método o F_{cal} (20,0937) $>$ F_{tab} (2,2719) e t_{cal} (0,0826) $<$ t_{tab} (1,9666) sendo possível concluir que não houve efeito matriz e há paralelismo das retas. Na linearidade foi possível confirmar que a regressão é estatisticamente significativa pois F_{cal} (24475,52) $>$ F_{tab} (4,49), logo assume-se que y efetivamente varia em função de x e que o método pode ser considerado linear. O método foi considerado preciso e exato, visto que os valores de recuperação e DPR (%) se encontraram dentro da faixa preconizada pela AOAC. Os limites de detecção (0,15ppm) e de quantificação (1ppm) foram determinados mediante dados da curva desenvolvida no teste de linearidade, como coeficiente angular e desvio de intercepto.

Palavras-chave: próstata, radiofármaco, PSMA, HPLC.

ABSTRACT

In Brazil, prostate cancer is the second most common type of malignant tumor in males and if detected early, the chance of a cure increases significantly. The Prostate Specific Membrane Antigen labeled with ^{18}F , from the English Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA-1007(^{18}F)) is a new radiopharmaceutical that has a positron-emitting radionuclide and is used for diagnostic purposes of the disease. For its use to be safe, ANVISA recommends quality control tests that comply with Good Manufacturing Practices established by the regulatory body. Aiming to optimize quality control, an analytical method implemented in High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was developed to determine the purity and radiochemical identification of the markings. The method elaborated in the present work, in relation to the methodology developed and validated at CDTN, presents some advantages such as replacing the organic solvent with a cheaper one, easier to acquire and with lower toxicity, changing the aqueous solvent for one that does not use buffer, avoiding column clogging and reducing running time from 12 minutes to 10 minutes.

The analytical validation of the process was satisfactory as it met all the criteria required in RDC nº 166/2017 of ANVISA. In the method selectivity test, F_{cal} (20.0937) > F_{tab} (2.2719) and t_{cal} (0.0826) < t_{tab} (1.9666) therefore it was possible to conclude that there was no matrix effect and there is parallelism of the lines. In linearity it was possible to confirm that the regression is statistically significant F_{cal} (24475.52) > F_{tab} (4.49), it is assumed that y effectively varies as a function of x and that the method can be considered linear. The method was considered accurate and accurate, since the recovery and DPR values (%) were within the range recommended by the AOAC. The limits of detection (0.15ppm) and quantification (1ppm) were determined using data from the curve developed in the linearity test, such as slope of the line and intercept deviation.

Keywords: prostate, radiopharmaceutical, PSMA, HPLC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sistema reprodutor masculino.....	17
Figura 2 - Zonas prostáticas.....	18
Figura 3 – Representação de uma próstata normal vs próstata aumentada na HPB.....	19
Figura 4 - Câncer de próstata vs HPB.....	20
Figura 5 - Tipos de radiação e seu poder de penetração.....	22
Figura 6 - Processo de decaimento e aniquilação do ^{18}F	24
Figura 7 - Etapas para a produção da imagem PET utilizando a FDG (^{18}F)....	25
Figura 8 - Representação da estrutura do PSMA-1007.....	28
Figura 9 - Descrição do processo de formação, ligação e uso do PSMA.....	31
Figura 10 - Comparação de uso do PSMA-1007 (^{18}F) (A - C) com o PSMA-11 (^{68}Ga) (D - F).....	33
Figura 11 - Mecanismo da reação entre o precursor e o ânion fluoreto levando a obtenção de PSMA-1007 (^{18}F).....	34
Figura 12 - Impurezas conhecidas do PSMA-1007 (^{18}F).....	37
Figura 13 - Triângulo de seletividade.....	39
Figura 14 - Soluções de PSMA-1007 utilizadas para testes de seletividade....	47
Figura 15 - Soluções de PSMA-1007 utilizadas para testes de linearidade.....	49
Figura 16 – Cromatograma de padrões de impureza C, impureza D e PSMA-1007 conforme metodologia gradiente já validada do CDTN.....	53
Figura 17 – Cromatograma de padrões de impureza C, impureza D e PSMA-1007 utilizando sistema isocrático 70% tampão fosfato e 30% ACN.....	54
Figura 18 - Nomográfico de HPLC em fase reversa.....	55
Figura 19 - Triângulo de seletividade projetado para testes.....	56

Figura 20 – Cromatograma de padrões de impureza C, impureza D e PSMA-1007 utilizando sistema isocrático 60% tampão fosfato e 40% MeOH..	57
Figura 21 – Cromatograma de padrões de impureza C, impureza D e PSMA-1007 utilizando sistema isocrático 50% tampão fosfato e 50% MeOH..	58
Figura 22 – Cromatograma de padrões de impureza C, impureza D e PSMA-1007 utilizando sistema isocrático 50% tampão TFA 0,1% e 50% MeOH.	59
Figura 23 - Gráfico área <i>versus</i> concentração do analito com a matriz.....	60
Figura 24 - Gráfico de dispersão dos resíduos.....	62
Figura 25 - Gráfico área <i>versus</i> concentração do analito.....	63

FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 - Processo produtivo do PSMA-1007 (^{18}F) no CDTN.....	35
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Performance diagnóstica do PSMA-1007 (^{18}F) em diferentes localizações conforme reportado na literatura.....	32
Tabela 2 – Volumes das soluções utilizados para o desenvolvimento da curva de calibração do teste de efeito matriz.....	48
Tabela 3 – Resultados obtidos com as injeções de padrões de concentração 2ppm, 7ppm e 12ppm de PSMA-1007 para avaliação da exatidão e precisão.....	65
Tabela 4 - Critério de aceitação para recuperação e repetibilidade.....	65
Tabela 5 – Resultados obtidos com as injeções de padrões de concentração 2ppm, 7ppm e 12ppm de PSMA-1007 para avaliação da precisão intermediária.....	66
Tabela 6 – Resultados obtidos com dados dos testes de linearidade para avaliação do LQ e LD.....	67
Tabela 7 - Resultados obtidos com o teste de LQ a 1ppm.....	67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Comparação entre ^{68}Ga e ^{18}F	29
Quadro 2 - Condições dos métodos da Farmacopeia e do CDTN.....	52
Quadro 3 - Condições finais do método estabelecido.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

^{18}F	Flúor-18
^{68}Ga	Gálio-68
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância
Sanitária BPF	Boas Práticas de Fabricação
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CDTN	Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CP	Câncer de Próstata
CT	<i>Computed tomography</i> (Tomografia
Computadorizada)	DP Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
FDG	Fluordesoxiglicose
HBP	Hiperplasia Benigna da Próstata
ISO	International Organization for Standardization (Organização Internacional para Normalização)
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MeOH	Metanol
MMQO	Método dos Mínimos Quadrados Ordinários
MMQP	Método dos Mínimos Quadrados Ponderados

MN	Medicina Nuclear
PET	<i>Positron Emission Tomography</i> (Tomografia por Emissão de Pósitron)
PSA	<i>Prostate Specific Antigen</i> (Antígeno Específico da Próstata)
PSMA	<i>Prostate Specific Membrane Antigen</i> (Antígeno de Membrana Específico da Próstata)
PR	Pureza Radioquímica
RLT	<i>Radioligant Therapy</i> (Terapia com Radioligante)
SBOC	Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica
SP	Solução Padrão (Solução contendo a Impureza C 1ppm, Impureza D 1ppm e o padrão de PSMA-1007 0,1ppm)
SPECT	<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i> (Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único)
SQR	Solução química de referência
SUS	Sistema Único de Saúde
TFA	Ácido TrifluoroAcético
THF	Tetraidrofurano
TR	Tempo de Retenção

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVO.....	15
2.1	Objetivo geral.....	15
2.2	Objetivos específicos.....	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1	Câncer.....	16
3.2	Estrutura prostática e doenças relacionadas.....	17
3.3	Radiofármacos.....	20
3.4	Radiodiagnóstico na medicina nuclear.....	22
3.4.1	Tomografia por Emissão de Pósitrons.....	23
3.4.2	PET e a detecção do câncer.....	25
3.5	Detecção e diagnóstico do câncer de próstata.....	26
3.6	Antígeno de membrana específico da próstata.....	27
3.7	PSMA-1007 (¹⁸F).....	30
3.7.1	PSMA-1007 (¹⁸F) e a marcação no PET/CT.....	31
3.7.2	Produção do PSMA-1007 (¹⁸F).....	34
3.8	Controle de qualidade de radiofármacos.....	34
3.8.1	Pureza radioquímica.....	36
3.8.2	Cromatografia líquida de alta eficiência.....	37
3.8.2.1	Triângulo de seletividade para planejamento experimental em cromatografia.....	38
3.9	Validação de métodos analíticos.....	39
3.9.1	Seletividade.....	40
3.9.2	Linearidade.....	40
3.9.3	Exatidão.....	41
3.9.4	Precisão.....	42
3.9.5	Limite de detecção e quantificação.....	42
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1	Infraestrutura.....	43
4.2	Reagentes e soluções.....	43

4.2.1	Preparo da solução padrão de PSMA-1007 100ppm.....	44
4.2.2	Preparo da solução padrão de Impureza C 100ppm.....	44
4.2.3	Preparo da solução padrão de Impureza D 100ppm.....	44
4.2.4	Preparo das soluções de fase móvel.....	44
4.3	Equipamento, materiais e sistemas.....	45
4.4	Métodos.....	46
4.5	Validação analítica.....	46
4.5.1	Seletividade.....	46
4.5.2	Linearidade.....	48
4.5.3	Exatidão e precisão.....	49
4.5.4	Limite de detecção e quantificação.....	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	52
5.1	Desenvolvimento do método analítico.....	52
5.2	Validação analítica do método desenvolvido.....	60
5.2.1	Seletividade.....	60
5.2.2	Linearidade.....	61
5.2.3	Exatidão e precisão.....	64
5.2.4	Limite de detecção e quantificação.....	66
6	CONCLUSÕES.....	68
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
	APÊNDICES.....	76

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública, uma das principais doenças causadoras de morte no mundo e, como consequência, um obstáculo eminente para o aumento da expectativa de vida. No Brasil, o tumor maligno da próstata é o terceiro mais incidente no Brasil (10,2% do total de casos), atrás apenas do de pele não melanoma (31,3%) e do de mama feminina (10,5%) (BRASIL, 2023; INCA, 2023).

O aumento da taxa de incidência de câncer no Brasil pode ser parcialmente atribuído ao avanço dos métodos de diagnóstico, à melhoria nos sistemas de informação do país e ao aumento da expectativa de vida. Detectar a doença precocemente aumenta consideravelmente as chances de cura. Portanto, é crucial o desenvolvimento de novos métodos para diagnosticar esta enfermidade em seus estágios iniciais (BRASIL, 2022).

O diagnóstico do câncer de próstata (CP) é tradicionalmente feito a partir de dosagem sérica do antígeno prostático específico, do inglês *Prostate-Specific Antigen* (PSA) e o toque retal. Contudo, nos dias de hoje, alternativas mais eficientes têm sido viabilizadas. O uso de radiofármacos é uma das opções para o diagnóstico precoce, pois produz imagens de tomografia por emissão de pósitron, do inglês *Positron Emission Tomography* (PET) (VIDEIRA, 2020).

O radiofármaco PSMA-1007 (^{18}F) vem sendo utilizado para obtenção de imagens da próstata. Isso propicia vários manejos clínicos, como a biópsia guiada por imagem, estadiamento de tumor primário, a localização de recidiva bioquímica, o planejamento de radioterapia, previsão e avaliação do tumor (HONG *et al.*, 2020).

O antígeno de membrana específico da próstata, do inglês *Prostate-Specific Membrane Antigen* (PSMA) é uma glicoproteína de superfície transmembrana do tipo II, que tem uma expressão aumentada nas células do CP. Moléculas de PSMA marcadas com ^{18}F irão se ligar com alta afinidade, ao PSMA já presente na célula. Tendo em vista que nas células cancerosas o PSMA será superexpresso, haverá um acúmulo de PSMA marcado, o que permitirá a obtenção de imagens por tomografia PET revelando a presença do tumor, assim como sua agressividade e extensão (HOFMAN, 2020; HONG *et al.*, 2020; OH; CHEON, 2018).

Para que a utilização dos radiofármacos se dê de maneira segura em pacientes é necessário que a indústria garanta a qualidade do processo produtivo. O controle de qualidade deve assegurar por meio de testes relevantes e necessários que o produto não seja liberado para uso ou venda, até que sua qualidade seja julgada satisfatória (ANVISA, 2019).

Ensaio analítico e microbiológico devem ser realizados para que a qualidade desses produtos possa ser atestada. Eles podem ser procedentes de compêndios oficiais ou desenvolvidos *in loco*. Caso os ensaios sejam desenvolvidos *in loco*, se faz necessário à validação analítica para que haja uma qualidade comprovada. Ela se dá através da confirmação e fornecimento de evidências de que o método analítico utilizado produz resultados confiáveis e adequados à finalidade a que se destina (BRASIL, 2017).

Mediante ao crescimento da projeção do número de casos de câncer para os próximos anos aliado ao fato de que os radiofármacos tem um tempo de meia vida curto, ou seja, entre a produção e a aplicação há uma perda significativa da radioatividade, faz-se necessário o desenvolvimento de metodologias analíticas para o controle de qualidade que sejam mais rápidas, eficientes e com menor impacto ao meio ambiente para atestar a qualidade do produto acabado (BRASIL, 2023; INCA, 2023).

A comprovação da confiabilidade dos dados obtidos no processo do controle de qualidade se dá mediante a validação analítica, que confirma e fornece evidências claras de que o método em questão gera resultados indubitáveis e adequados à finalidade a que se destina (ANVISA, 2017).

Os critérios preconizados para a validação analítica, de acordo com a RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 da ANVISA, são exatidão, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), seletividade, limite de detecção, limite de quantificação e linearidade e intervalo ou faixa de trabalho (ANVISA, 2017).

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Otimizar um método analítico, a ser implementado na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, para o controle de qualidade do radiofármaco PSMA-1007 (^{18}F).

2.2 Objetivos específicos

- Substituir o solvente orgânico utilizado nas eluições cromatográficas, acetonitrila, por um outro de menor custo, toxicidade e mais fácil aquisição;
- Avaliar a substituição do tampão fosfato nas eluições cromatográficas;
- Validar o método analítico de acordo com os registros e pré-requisitos do radiofármaco junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Câncer

O câncer, também conhecido como neoplasia maligna, é uma doença caracterizada pela mutação no DNA. Nela corre uma ruptura dos mecanismos reguladores da multiplicação celular e, como consequência, há um crescimento descontrolado e desordenado de uma célula anormal, formando tumores malignos no corpo (POPE; LIU, 2020).

Essa doença é um dos principais problemas de saúde pública no mundo, sendo uma das principais causas de morte e, como efeito, um dos principais obstáculos para o aumento da expectativa de vida. De acordo com as estimativas do Observatório Global do Câncer, do inglês *Global Cancer Observatory* (Globocan), desenvolvidas pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, do inglês *International Agency for Research on Cancer* (IARC), foram relatados cerca de 20 milhões de casos novos de câncer no mundo em 2022, com 9,7 milhões de mortes (FERLAY *et al.*, 2021; IARC, 2024; SUNG *et al.*, 2021).

Estima-se que um a cada cinco indivíduos terão câncer no decorrer da sua vida. Os dez principais tipos de câncer representaram mais de 60% do total de casos novos. O câncer de mama feminina é o mais incidente no mundo, com 2,3 milhões (11,7%) de casos novos, seguido pelo câncer de pulmão, com 2,2 milhões (11,4%); cólon e reto, com 1,9 milhão (10,0%); próstata, com 1,4 milhão (7,3%); e pele não melanoma, com 1,2 milhão (6,2%) de casos novos (INCA, 2023).

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2023), no Brasil ocorrerão 704 mil casos novos de câncer no próximo triênio (2023-2025) tendo como os mais incidentes, nos homens, o de pele não melanoma (29,9%), seguido do de próstata (21%). A taxa de incidência está relacionada à capacidade de diagnóstico que está associada à adequação, ao acesso e à utilização dos serviços de diagnóstico.

A Lei nº 14.758 de 19 de dezembro de 2023 institui a Política Nacional de Prevenção e Controle do Câncer no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) e o Programa Nacional de Navegação da Pessoa com Diagnóstico de Câncer (PNNPDC). Os principais objetivos são reduzir a incidência dos vários tipos de

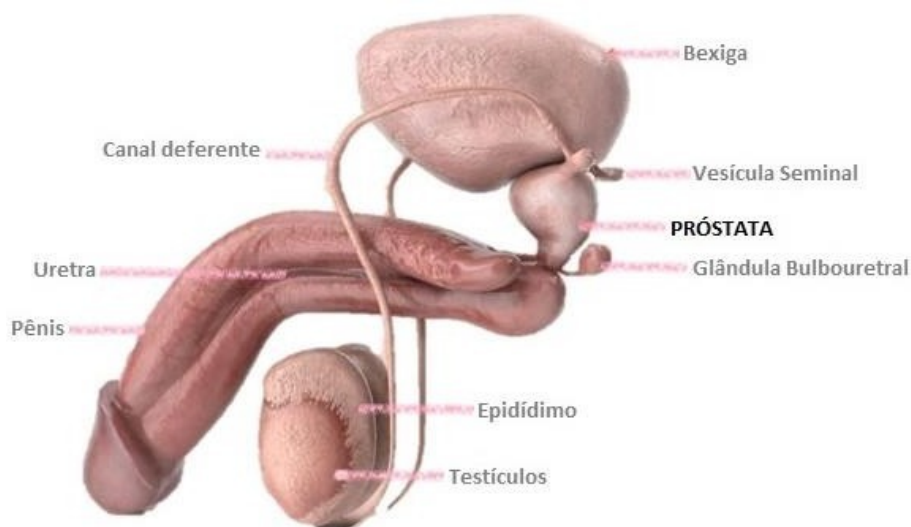
câncer; assegurar o acesso apropriado ao cuidado integral; contribuir para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes diagnosticados com a doença e diminuir a mortalidade e a incapacidade causadas pelo câncer (BRASIL, 2023).

Estratégias de detecção precoce, mudança na atenção oncológica e aumento da capacidade diagnóstica, são capazes de causar um aumento significativo das taxas de incidência, em razão da descoberta de casos de câncer subclínicos. Há uma expectativa de aumento das taxas de incidência de alguns tipos de câncer, visto que está sendo dada uma maior atenção para a doença assintomática e houve um crescimento da quantidade de achados decorrentes da execução de exames mais específicos associado a técnicas de imagem de alta resolução em caso de suspeita. Um exemplo é o CP pelo aumento do teste de PSA (INCA, 2023).

3.2 Estrutura prostática e doenças relacionadas

A próstata é uma glândula do sistema reprodutor masculino que está situada logo abaixo da bexiga e em frente ao reto, justificando o exame de toque retal como forma de avaliação prostática (SARRIS, 2018). Esse pequeno órgão envolve uma porção da uretra, canal que transporta a urina da bexiga para fora, além de produzir o fluido seminal (Figura 1) (INCA, 2022).

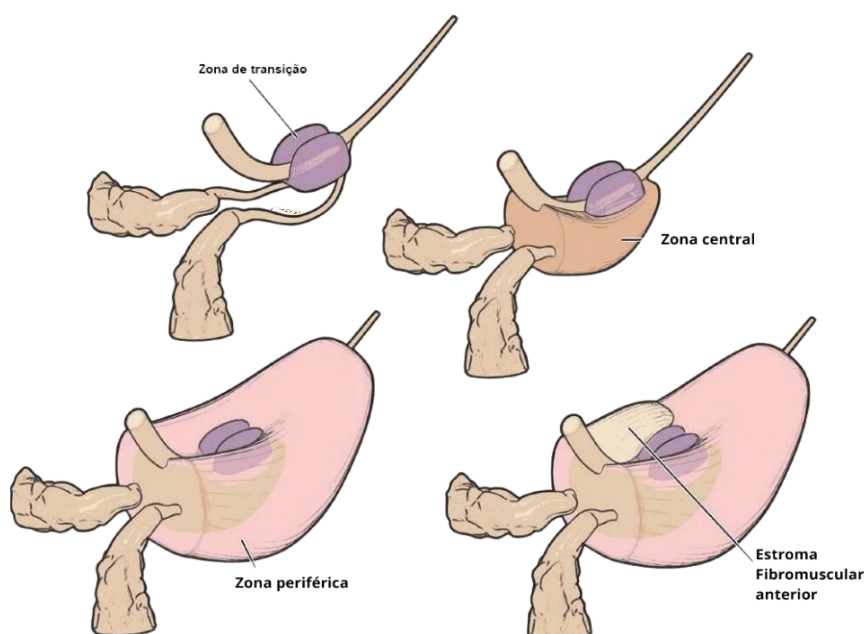
Figura 1 - Sistema reprodutor masculino.



Fonte: Adaptado de Câncer de Próstata. Disponível em: <https://urologosenvallarta.mx/blog/cancer-de-prostata>. Acesso em: 19 jul. 2023.

A próstata é constituída por tecido glandular, tecido conjuntivo/fibroso e fibras musculares. Outra característica importante é sua fragmentação em zonas: periférica, de transição, central e o estroma fibromuscular (Figura 2). A zona periférica é a camada exterior e posterior, corresponde a cerca de 70% do volume da próstata. A região de transição é a menor e a mais interna, envolvendo parte da uretra. A zona central rodeia os ductos ejaculatórios e corresponde a cerca de um quarto da massa prostática. Já o estroma fibromuscular anterior não possui conteúdo glandular (CUNHA *et al.*, 2004).

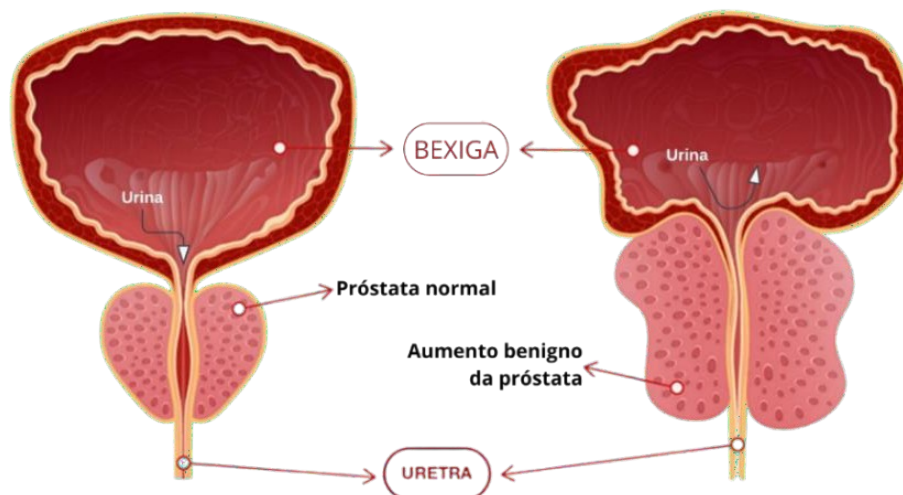
Figura 2 - Zonas prostáticas.



Fonte: Adaptado de Protocolos Clínicos. Disponível em: <https://apurologia.pt/wp-content/uploads/2019/04/Protocolos2.0.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2023.

Este órgão pode sofrer mudanças no decorrer da vida de um homem. A próstata aumentada, também conhecida como Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) ocorre na zona de transição, é uma das doenças mais frequentes e corresponde a uma neoplasia benigna, ou seja, um tumor não-canceroso. Nessa patologia há um crescimento anormal no número de células prostáticas, levando à compressão da uretra e respectivas queixas urinárias (Figura 3). Um conjunto de fatores favorece o aparecimento dessa doença, como por exemplo, a idade, o histórico familiar e as dietas ricas em gordura (LIMA; LORENZETTI 2010).

Figura 3 - Representação de uma próstata normal vs próstata aumentada na HPB.



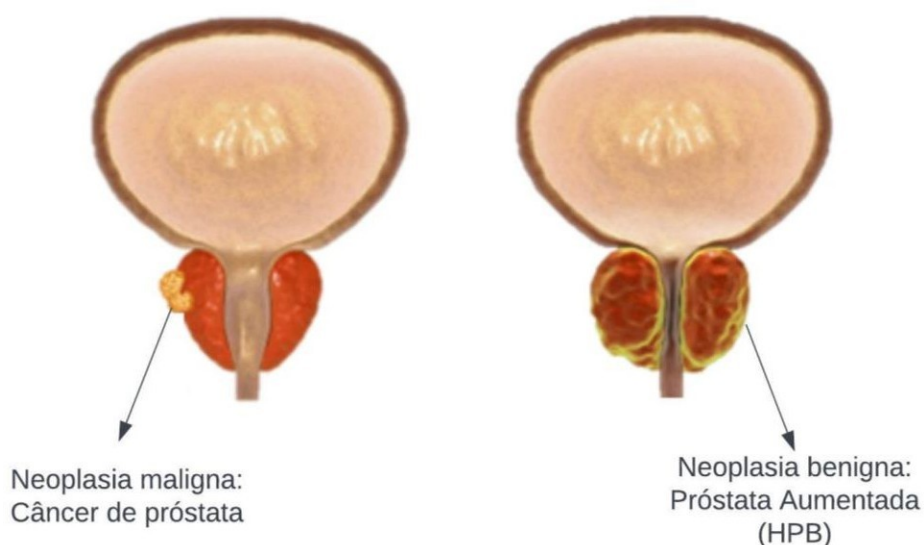
Fonte: Adaptado de Hiperplasia Prostática Benigna. Disponível em: <https://activepharmaceutica.com.br/blog/hiperplasia-prostatica-benigna-voce-ja-ouviu-falar-dessa-condica>. Acesso em: 19 jul. 2023.

Além da HPB, outro acometimento prostático possível é câncer de próstata. O CP ocorre quando células da próstata se multiplicam anormalmente e formam um tumor canceroso, uma neoplasia maligna, ocorrendo predominantemente na zona periférica, longe da uretra. Com isso, os tumores malignos iniciais são potencialmente curáveis e não causam sintomas urinários (INCA, 2022).

Quando o câncer avança e cresce de maneira significativa, o suficiente para originar uma obstrução do canal da uretra provocando sintomas, neste estágio o CP já pode ter se difundido para outros órgãos do corpo próximos à próstata como vesículas seminais e bexiga ou até mesmo os mais distantes como fígado, pulmões e ossos. Caso isso ocorra, o paciente é diagnosticado com câncer metastático de próstata e, por exemplo, não com câncer ósseo, caso o tumor tenha se instalado no osso (TONON *et al.*, 2009).

O CP e a HPB, como já alertado, são doenças distintas e ocorrem em regiões distintas na próstata (Figura 4). Porém há sintomas que são comuns entre elas, como por exemplo, a dificuldade e necessidade frequente de urinar, sensação de esvaziamento incompleto da bexiga e noctúria. É importante salientar que mesmo com essas semelhanças, a gravidade e a progressão dos sintomas podem variar significativamente (INCA, 2022).

Figura 4 - Câncer de próstata vs HPB.



Fonte: Adaptado de Tratamento para Hiperplasia prostática. Disponível em: <https://www.uroville.com.br/tratamentos/tratamentos-para-hiperplasia-prostatica-benigna/>. Acesso em: 19 jul. 2023.

A hiperplasia e o câncer podem surgir simultaneamente ou de forma isolada na próstata. Por esse motivo, é de extrema importância um urologista avaliar e interpretar os sintomas urinários assim como as alterações nos exames de PSA e toque retal para um correto diagnóstico. Em caso de suspeita de tumor é recomendável exames de imagem mais específicos através da administração de radiofármacos para radiodiagnóstico.

3.3 Radiofármacos

Radiofármacos são preparações farmacêuticas, sem atividade farmacológica devido à sua concentração extremamente baixa. Pode ser administrado por via oral, endovenosa ou por inalação. São utilizados na medicina nuclear para fins diagnósticos e/ou terapêuticos de diversas doenças, como o câncer. Sua estrutura é composta por um elemento radioativo (radionuclídeo) e um vetor fisiológico não radioativo (carregador ou ligante). Quando administrado no paciente, se direciona a um órgão de interesse pela função fisiológica ou fisiopatológica da doença (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

No Brasil essa classe de medicamentos é usada há mais de cinquenta anos. O setor de Medicina Nuclear (MN) do país conta com mais de quatrocentos serviços oferecidos em todo território brasileiro. Quase um milhão e meio de

procedimentos de MN por ano são realizados com os radiofármacos fornecidos pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), sendo que em torno de 30% possuem cobertura do SUS (CNEN, 2015; BRASIL, 2022).

Dois grandes grupos categorizam os radiofármacos e suas finalidades de acordo com o tempo de meia vida, ou seja, o período de tempo para que a carga radioativa caia pela metade. O primeiro grupo refere-se aos radiofármacos chamados de diagnósticos que possuem uma meia-vida igual ou inferior a duas horas, ou seja, tem metade de sua carga radioativa a cada duas horas ou menos. Nesse caso há necessidade de uma produção e uso assertivo para que sejam usufruídos da melhor forma (BRASIL, 2021; VITAL *et al.*, 2019).

Nesse grupo encontram-se os radiofármacos que são utilizados em exames de diagnóstico por imagens de forma detalhada do corpo, como por exemplo em PET, cintilografias e tomografias computadorizadas por emissão de fóton único, do inglês *Single Photon Emission Computed Tomography* (SPECT). O monopólio da produção e comercialização desse tipo de medicamento, que era tido pela União, foi quebrado pela Emenda Constitucional nº 49, de 2006, permitindo a inserção de produtores privados no segmento (CNEN, 2015; VITAL *et al.*, 2019).

Um segundo grupo é composto por radiofármacos com mais de duas horas de meia-vida, um período maior em comparação aos de diagnóstico. Nesse caso eles são classificados como terapêuticos, pois são empregados com o objetivo de curar, mitigar e/ou controlar um processo patológico. São utilizados para tratamento de doenças específicas, especialmente do câncer (BRASIL, 2021).

Ambos os tipos de radiofármacos agem na bioquímica, fisiologia ou patologia do corpo sem ocasionar qualquer dano fisiológico. Eles são transcritos como radiotraçadores, pois são administrados em doses subfarmacológicas que “delimitam” um processo patológico ou fisiológico específico no corpo. Dessa forma é possível fazer um diagnóstico precoce ou o tratamento de diversos cânceres, uma vez que a funcionalidade dos órgãos é verificada (ROBILOTTA, 2006; ZIESSMAN, 2014).

A farmacocinética dos radiofármacos, ou seja, sua fixação no órgão alvo, metabolização e eliminação do organismo, será definida de acordo com as características físico-químicas do carreador, ou seja, da parte não radioativa do

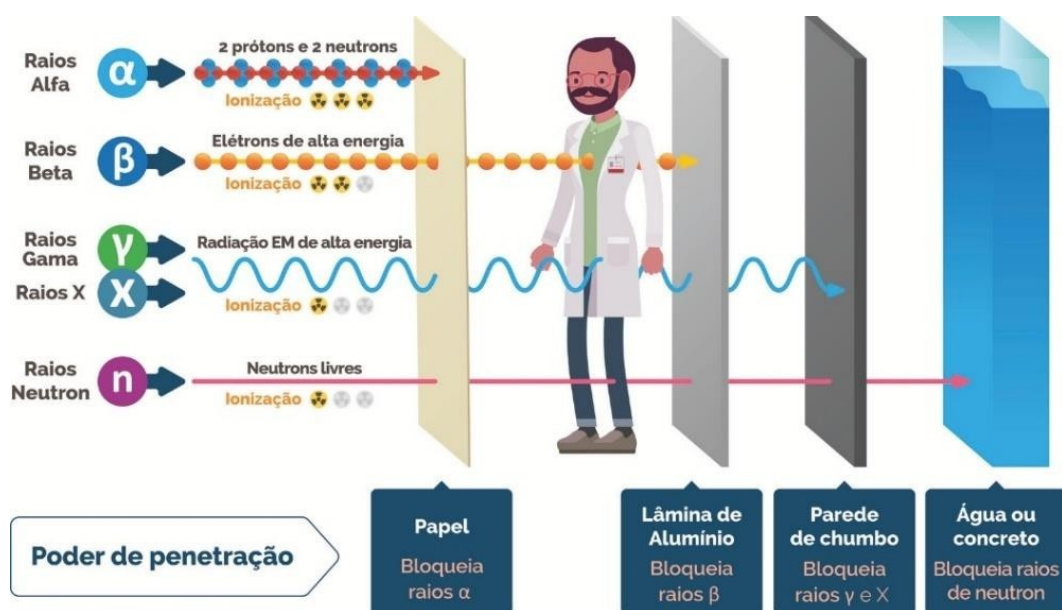
radiofármaco. Ao passo que as características físicas do radionuclídeo serão responsáveis por definir a sua aplicabilidade para diagnóstico ou terapia (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

3.4 Radiodiagnóstico na medicina nuclear

Cerca de 95% de todos os procedimentos envolvendo radiofármacos são representados por diagnóstico por imagens, tornando-se a área mais consolidada da MN (ELGAZZAR, 2006; ROBILOTTA, 2006).

Os diferentes tipos de radiação (alfa, beta e gama) são emitidos pelo núcleo de formas distintas em relação à energia e poder de penetração, permitindo que haja uma distinção na ação de cada uma dessas radiações em seres vivos (Figura 5). A partícula alfa, por exemplo, contém uma grande massa, por esse motivo uma folha de papel já é capaz de barrá-la e no ser vivo ela penetra apenas a camada superficial da pele. A beta é mais penetrante e, dependendo da energia, consegue atravessar o corpo humano, sendo bloqueada por uma lâmina de alumínio. Já a radiação gama, que possui a velocidade da luz, possui um alto poder de penetração sendo bloqueada por uma parede de chumbo. A radiação de nêutrons, que possui um alto poder de penetração, sendo bloqueada por uma parede de concreto (RADIOFARMÁCIA, 2019).

Figura 5 - Tipos de radiação e seu poder de penetração.



Fonte: Radiofarmácia, 2019.

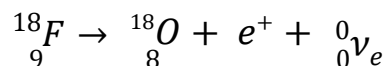
A partícula alfa (α) é composta por dois prótons e dois nêutrons, emitida com alta frequência, baixo poder de penetração, alto poder ionizante e é utilizada na medicina para tratamento de doenças como o câncer. A radiação beta (β) é subdividida em dois tipos. A β^+ , que consiste na transformação de um próton em um nêutron e um pósitron, devido à instabilidade do núcleo com seu elevado número de prótons. Já a β^- que é a transformação do nêutron em um elétron e um próton, devido à instabilidade do núcleo com seu elevado número de nêutrons. Da mesma forma que a radiação α , os emissores de β^- são utilizados para tratamento de doenças e os emissores β^+ são usados na medicina diagnóstica na obtenção de imagens. Já a radiação gama (γ) são ondas eletromagnéticas emitidas no núcleo do átomo com energias superiores e alto poder de penetração, por se tratar de uma radiação ionizante por ser direcionada para o tratamento de tumores malignos ou para obtenção de imagens. Ao passo que os raios X são uma forma de radiação eletromagnética menos energética, com alto poder de penetração e, portanto, utilizadas na obtenção de imagens (RADIOFARMÁCIA, 2019).

A SPECT e a PET, por exemplo, são duas técnicas de radiodiagnóstico de imagem na MN onde os radiofármacos são empregados. Ambas concedem informações funcionais e moleculares sobre o corpo humano, todavia a principal diferença entre elas é o tipo de radioisótopo empregado (KHALIL, 2010).

No procedimento SPECT o isótopo radioativo emite radiação gama (e.g., ^{99m}Tc , ^{67}Ga , ^{127}Xe , ^{133}Xe , ^{123}I , ^{111}In) em um espectro amplo, capturando as emissões de múltiplas posições em equipamentos conhecidos como gama-câmaras. Já na PET o isótopo radioativo libera pósitrons, partículas subatômicas positivamente carregadas quando o mesmo encontra um elétron, no corpo do paciente, ocorre aniquilação de ambos, resultando na emissão de dois fótons gama, também denominados raio gama (γ) (SAHA *et al.*, 2013).

3.4.1 Tomografia por Emissão de Pósitrons

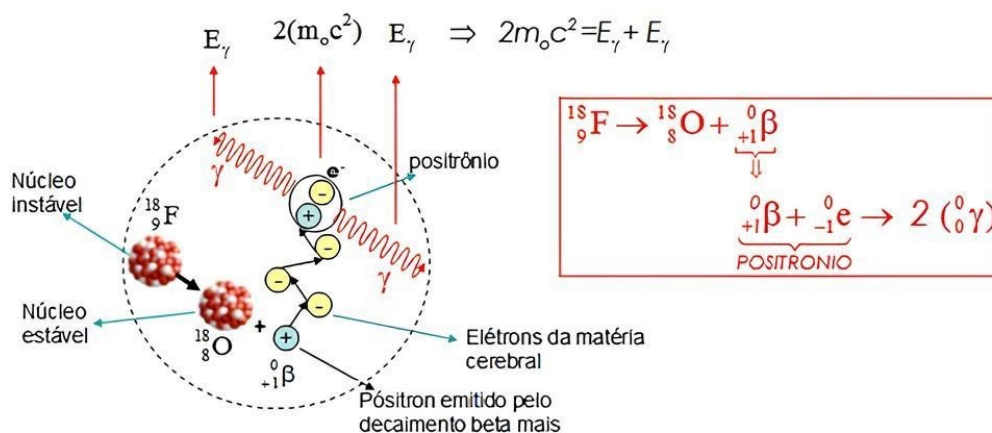
As imagens PET são obtidas a partir do emprego de radiofármacos emissores de pósitron, ou emissores β^+ , (e.g., ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F , ^{124}I , ^{64}Cu ou ^{68}Ga) onde um dos prótons do núcleo emite um pósitron e um neutrino, como por exemplo na reação a seguir com o decaimento do flúor:



onde ${}^{18}_{9}\text{F}$ representa o isótopo de flúor-18, ${}^{18}_{8}\text{O}$ representa o oxigênio-18 (produto do decaimento), e^{+} é o pósitron e ν_e é o neutrino. O neutrino é uma partícula que divide, com o elétron emitido, a distribuição da energia liberada pelo núcleo no processo de decaimento. O neutrino não possui carga e tem massa muito pequena em relação ao elétron (TAUHATA *et al.*, 2003).

Na emissão beta, por tratar-se de uma partícula de massa significativa e carga positiva, as partículas perdem sua energia cinética até interagir com um elétron. Esse é o chamado processo de aniquilação e ao ocorrer produz dois fótons gama (γ) de alta energia, 511 keV, que se propagam em sentidos diametralmente opostos, como pode ser visto na imagem abaixo (Figura 6) (GUTFILE *et al.*, 2014; MILLER *et al.*, 2008).

Figura 6 - Processo de decaimento e aniquilação do ${}^{18}\text{F}$.



energia dos raios gama:

$$E_{\gamma} = m_0c^2 = (9,11 \times 10^{-31} \text{ kg}) \times (3 \times 10^8 \text{ m/s})^2$$

$$E_{\gamma} = 8,2 \times 10^{-14} \text{ J} = \frac{8,2 \times 10^{-14} \text{ J}}{1,6 \times 10^{-19} \text{ J/eV}} \approx 0,512 \text{ MeV}$$

Fonte: Aniquilação do par elétron-pósitron. Disponível em: http://www.projetos.unijui.edu.br/formacao/_medio/fisica/_RADIA%C3%87AO/7.2.4/08_avaliacao_03.htm. Acesso em: 01 out. 2023.

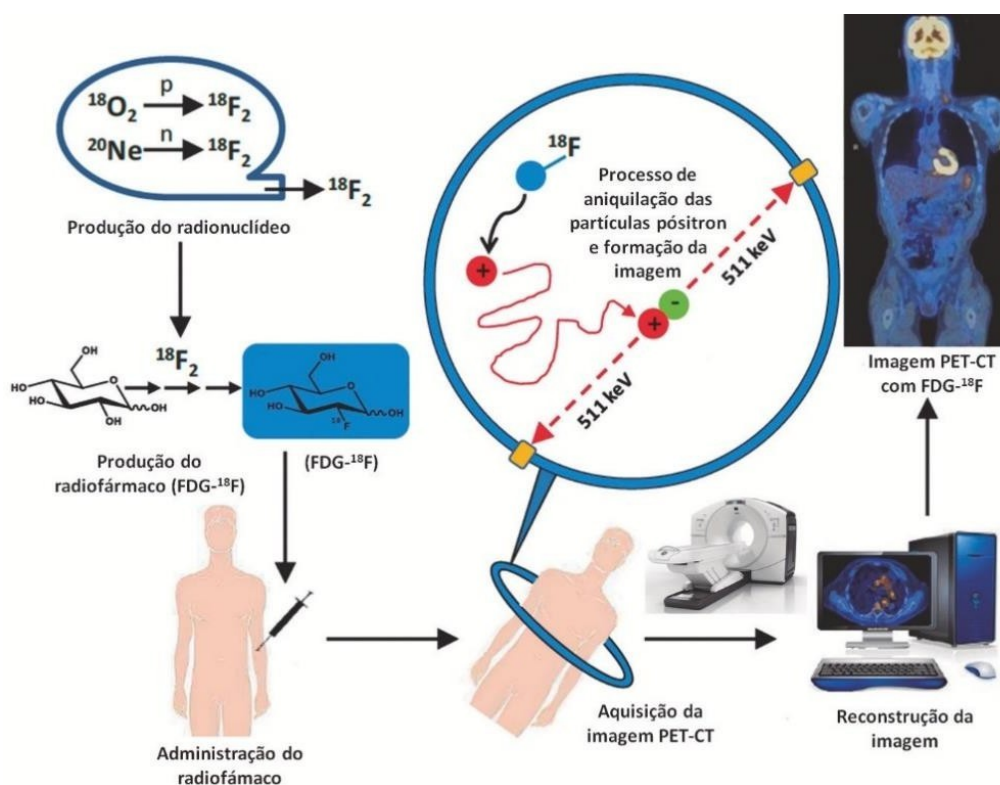
onde a equação da energia dos raios gama descreve que a energia (E) está diretamente relacionada à sua massa (m) e à velocidade da luz (c) ao quadrado. Os raios γ são reconhecidos e detectados externamente como fótons de coincidência por um aparelho circular que coleta e gera imagens tridimensionais.

Com isso, obtém-se um mapa de distribuição do radiofármaco emissor de pósitrons pelos órgãos e tecidos do corpo, o que possibilita a avaliação da função e morfologia de órgãos, permitindo, por exemplo, a localização de tumores (HAEDICKE *et al.*, 2018; ROBILOTTA, 2006).

3.4.2 PET e a detecção do câncer

Na atualidade, o radiofármaco mais utilizado na tomografia PET é a fluordesoxiglicose marcada com flúor 18 (FDG (^{18}F)). Ela possui um mecanismo de ação análogo ao da glicose com substituição do oxigênio na posição C-2 por um flúor 18 (Figura 7) e permite o mapeamento do metabolismo celular para inúmeras funcionalidades (RADIOFARMÁCIA, 2019).

Figura 7 - Etapas para a produção da imagem PET utilizando a FDG (^{18}F).



Fonte: Adaptado de PATCHING Simon G, 2015.

A FDG (^{18}F) tem sido vastamente aplicada na rotina de diagnóstico com essa técnica, pois permite a captação de imagens de uma ampla gama de tumores em geral, como os cerebrais, de mama, pulmão, pescoço, cabeça e esôfago. Uma das consequências de vários tipos de do câncer é o metabolismo aumentado da glicose devido a sua elevada taxa de multiplicação, o que faz com

que quando administrada a FDG (^{18}F) se acumule nessas células. O aumento da captação de glicose se torna elevada especialmente em metástases e em lesões primárias de certos tipos de câncer (LOVELAND *et al.*, 2017).

Entretanto existem alguns tipos de tumores que não aumentam a captação de glicose, quando comparadas com as células sadias, exigindo que o diagnóstico da doença-alvo seja mais preciso e seletivo. Por esse motivo outros radiotraçadores em sido investigados. Novos marcadores tumorais capazes de avaliar a funções e estrutura através de receptores de CP, por exemplo, potencializaram os estudos nessa linha de pesquisa (BARBOSA *et al.*, 2018; CAZZATO *et al.*, 2018).

3.5 Detecção e diagnóstico do câncer de próstata

A detecção do CP de maneira precoce é uma alternativa para aumentar as chances de um tratamento bem-sucedido e melhorar de forma significativa seu prognóstico e chegar à cura. A taxa de cura dos pacientes é de quase 100% quando a doença é detectada precocemente, enquanto em fase metastática a taxa cai para menos de 30% (KELLY *et al.*, 2017).

A tática mais efetiva para a detecção do câncer nas fases iniciais é o diagnóstico precoce, quer seja pela abordagem de pacientes com sinais e/ou sintomas iniciais da doença ou pelo rastreamento por meio da execução de exame, ou teste em um paciente assintomático, aparentemente saudável, com o propósito de identificar lesões sugestivas de pré-câncer e câncer. Dentre os quais podemos destacar: o toque retal, o teste de PSA e a ressonância magnética nuclear (RMN), no caso do CP (WHO, 2008).

O exame de toque retal avalia a zona periférica da próstata, examinando o tamanho, forma e consistência da próstata, o que possibilita a identificação de anormalidades como caroços ou endurecimentos, que podem sugerir a presença de um tumor maligno. O exame é recomendado principalmente para homens acima dos 50 anos ou 45 anos em caso de pacientes com histórico familiar de CP antes dos 60. Uma das limitações desse exame é que ele é eficaz para detecção do CP somente em estágios mais avançados em que o tumor já cresceu suficientemente para ser palpável. Tumores menores e em locais menos acessíveis podem passar despercebidos possibilitando um falso negativo na detecção do câncer e por isso, em caso de suspeitas, é recomendável que seja

feito um exame mais específico como o PSA (JÚNIOR, Arilton Januário *et al.*, 2015).

O PSA é uma proteína produzida pelas células epiteliais da próstata e excretada pelo fluido seminal. Os seus níveis sanguíneos aumentados podem indicar a presença de um câncer, uma vez que homens saudáveis ela se apresenta em baixas concentrações de circulação. Apesar do PSA ser um importante marcador sérico por apresentar uma alta sensibilidade, ele não é específico e pode estar relacionado com outras patologias como prostatite, hiperplasia benigna, trauma prostático e infecção da próstata. Se constatada uma elevação dos níveis séricos de PSA e/ou uma maior consistência na glândula, recomenda-se fazer uma biópsia da próstata (AMORIM *et al.*, 2011).

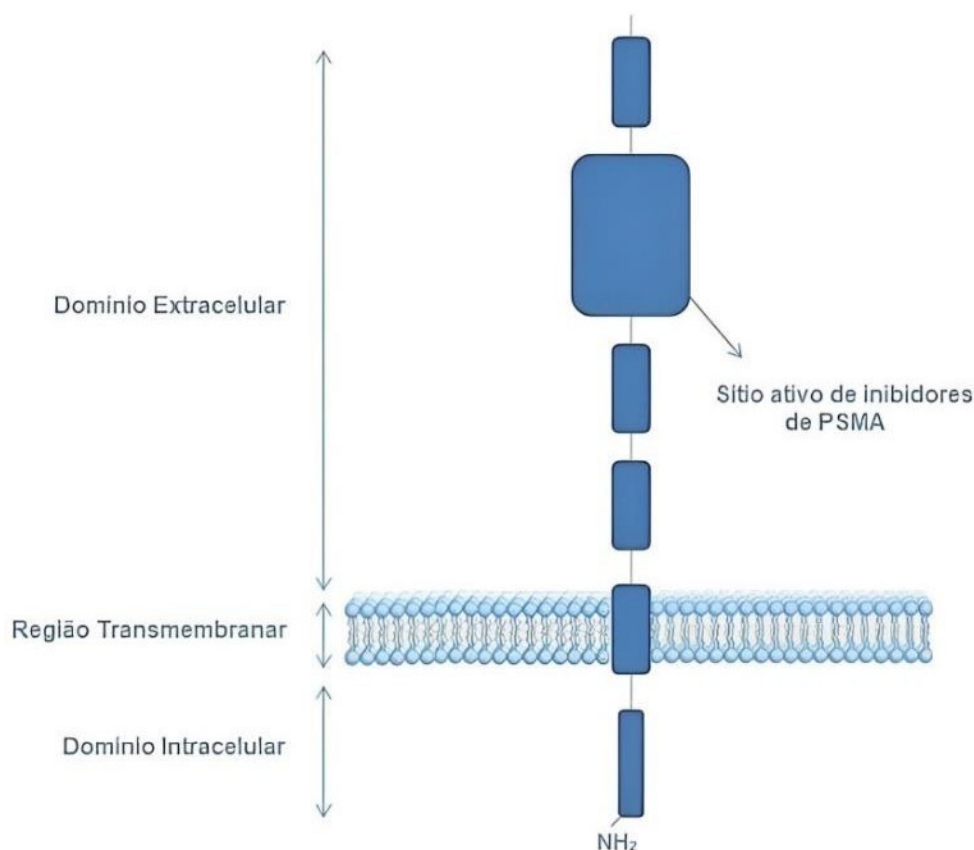
Por outro lado, os exames de estadiamento, de imagem e laboratoriais, são feitos para monitorar a disseminação do câncer no paciente. Dependendo do grau da doença e da condição do paciente diferentes tipos de tratamento são indicados, podendo compreender a prostatectomia radical, radioterapia externa, braquiterapia e terapia hormonal. Em casos de recidiva bioquímica, há indicação para realização do exame PET associado à tomografia computadorizada, do inglês *Computed Tomography* (CT). A indicação deste exame se dá ao fato que mesmo após a retirada cirúrgica da próstata, os níveis de PSA podem aumentar, o que indica presença da lesão metastática, o que dificulta a sua localização da mesma (ROWE, *et al.*, 2016).

A Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica (SBOC) propõe diretrizes de tratamento oncológico para próstata. Após atualização, seus guias de conduta para doença localizada (SBOC, 2021b) e doença avançada (SBOC, 2021a) incluem exames de imagem/CT, utilizando radiofármaco à base de PSMA marcado com gálio-68.

3.6 Antígeno de membrana específico da próstata

O antígeno de membrana específico da próstata foi identificado como um marcador específico da próstata por volta do ano de 1980 e foi clonado no início de 1990. O PSMA é uma glicoproteína transmembrana do tipo II que, como pode ser visto na Figura 8, possui uma região citoplasmática curta (19 aminoácidos) e um único domínio transmembranar (24 aminoácidos) e uma grande fração extracelular (707 aminoácidos) (GHOSH; HESTON, 2004; LAPIDUS, 2000).

Figura 8 - Representação da estrutura do PSMA-1007.



Fonte: SANTOS, Carolina Silva Ferreira dos., 2022. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85131/tde-29042022-132946/>. Acesso em: 24 jul. 2023.

O PSMA se tornou um alvo promissor para detecção em exames de imagens e terapia da próstata uma vez que se encontra altamente expresso em quase todos os tipos de CP, em especial em carcinomas pouco diferenciados e metastáticos. O antígeno de membrana específico da próstata não é um marcador específico, embora seu nome nos conduza a essa conclusão. Entretanto, ele é super expresso na superfície celular do CP, aproximadamente 1000 vezes maior do que a expressão em outras regiões como cérebro, rins, glândulas salivares e intestino delgado, justificando a sua denominação (OKARVI, 2019).

A expressão do PSMA aumenta conforme os estágios do CP, sendo diretamente proporcional aos aumentos das lesões ocasionadas pela doença. Além dessa característica, o PSMA se destaca por ser capaz de captar um ligante direcionado a ele de forma extremamente efetiva, ocorrendo através de uma reciclagem endossômica, aumentando a captação e retendo-o ainda mais

no tumor. Essa ligação proporciona uma imagem mais qualificada para procedimentos diagnósticos e uma alta dose local para aplicações terapêuticas (EIBER *et al.*, 2017).

A localização do sítio catalítico no domínio extracelular no PSMA (Figura 8) possibilita o desenvolvimento de moléculas que ao se ligarem à proteína serão internalizadas para as células. Tais moléculas podem ser radiofármacos, dos quais são captados no exame PET/CT, localizando lesões e acompanhando a evolução do tumor nos órgãos afetados (CECI, *et al.*, 2017).

Existem diversos tipos de radiofármacos que utilizam o PSMA como alvo, como por exemplo PSMA-617 (^{225}Ac) e PSMA-617 (^{177}Lu) utilizados para terapia de CP. O PSMA-11 (^{68}Ga) e o PSMA-1007 (^{18}F) estão entre os mais estudados atualmente, sendo que o PSMA-11 (^{68}Ga) tem grande papel na medicina nuclear atual como o agente mais utilizados para imagens PET/CT (BOIS *et al.*, 2020).

Ao comparar os radionuclídeos flúor-18 e gálio-68, que são principais radioisótopos para traçadores à base de PSMA, percebe-se que mesmo com uma maior utilização do radioisótopo ^{68}Ga há desvantagens em relação ao ^{18}F (Quadro 1).

Quadro 1 - Comparação entre ^{68}Ga e ^{18}F .

Propriedades	^{68}Ga	^{18}F
Tempo de meia-vida	68 min (decaimento completo em algumas horas após o exame; transportável apenas para centros próximos)	110 min (possível envio para centros mais distantes; imagem tardia possível)
Energia do Pósiton	1,90 MeV (profundidade de penetração do pósiton teoricamente maior, mas amplamente desprezível em tecidos sólidos na reconstrução da imagem)	0,65 MeV (menor carga de radiação, apesar de meia vida mais longa; resolução teoricamente maior)
Investimento inicial e custos operacionais	Geradores (~50.000 dólares para ~2 geradores por ano); módulo de síntese ou produção de kit	Ciclotron (~1.000.000-3.000.000 dólares); radiossintetizadores conectados ao ciclotron; ^{18}O como material alvo por produção
Escalabilidade	Capacidade definida pelo gerador	Demanda de produção escalável que se adapta ao número solicitado de exames

Fonte: Adaptado de KESCH *et al.*, 2017a.

Diante das limitações, como o menor tempo de meia-vida e menor resolução que o ^{68}Ga apresenta, torna-se pertinente estudos para estabelecer uma maior exploração de PSMA capaz de carregar o ^{18}F visando obter um melhor desempenho na detecção de lesões de recorrência e metastáticas, um diagnóstico mais preciso e estratificação do tratamento mais certa.

3.7 PSMA-1007 (^{18}F)

O PSMA-1007 (^{18}F) (((3S, 10S, 14S)-1-(4-(((S)-4-carboxi-2-((S)-4-carboxi-2-(6- ^{18}F -fluoronicotinamido)butanamido)butanamido)metil)fenil)-3-(naftaleno-2-ilmetil)-1, 4, 12-trioxo-2, 5, Ácido 11, 13-tetraazahexadecano-10, 14, 16-tricarboxílico)) é a terceira geração de compostos inibidores de PSMA radiomarcados com ^{18}F . Ele foi descoberto em 2016 na Alemanha, com sua patente publicada em 2017, como fruto de uma pesquisa direcionada ao desenvolvimento de inéditos ligantes de PSMA radiofluorados para diagnóstico de CP (CARDINALE *et al.*, 2020).

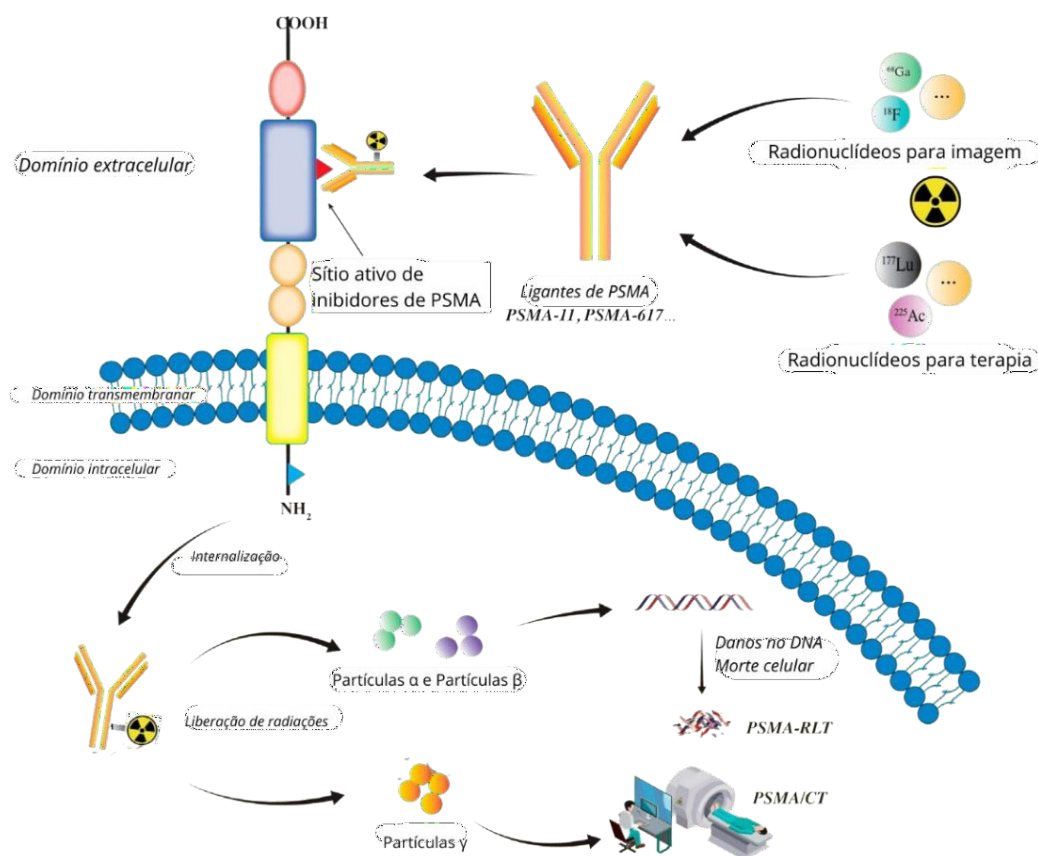
Há outros radiofármacos marcados com ^{18}F de gerações anteriores ao do PSMA-1007 (^{18}F) que também são estudados com o intuito de auxiliar no diagnóstico do CP, como o DCFBC (^{18}F) da primeira geração e o DCFPyL (^{18}F) da segunda. O PSMA-1007 (^{18}F) ao ser comparado com o DCFPyL (^{18}F), por exemplo, demonstra vantagens como excreção reduzida na urina após as duas primeiras horas após a injeção. Ele apresenta excreção hepatobiliar, o que diminui seu acúmulo em células normais do leito prostático e auxilia na detecção do CP, estadiamento primário e casos de suspeita de recidiva local (GIESEL *et al.*, 2018; HONG *et al.*, 2020).

Analisando o atenuado acúmulo de PSMA-1007 (^{18}F) em tumores de próstata, constatou-se que há uma correlação positiva entre o radiofármaco com outras formas de avaliação e detecção do CP, como por exemplo, o exame de nível de PSA. Tal fato, como consequência, corrobora para um diagnóstico mais assertivo (GIESEL *et al.*, 2018; KESCH *et al.*, 2017a).

A ligação do PSMA-1007 (^{18}F), emissor de partículas γ , na célula funciona de forma similar aos demais tipos de radiofármacos a base de PSMA, como por exemplo, o PSMA com radionuclídeos emissores de partículas α e β para terapia com radioligantes, do inglês *radioligand therapy* (RLT). O PSMA pode ser ligado

a um radionúclideo para geração de imagem (como o ^{68}Ga e ^{18}F) e/ou terapia (como ^{177}Lu e ^{225}Ac) como pode-se observar na Figura 9.

Figura 9 - Descrição do processo de formação, ligação e uso do PSMA.



Fonte: Adaptado de ZHOU *et al.*, 2021.

Logo após, os ligantes de PSMA radiomarcados se ligam ao sítio ativo de inibidores de PSMA e são internalizados nas células cancerígenas da próstata, liberando diferentes partículas. As partículas α e β podem causar danos ao DNA, resultando na morte celular das células cancerígenas sendo aplicadas em PSMA RLT. Já as emissões γ podem ser detectadas usando varreduras PET e usadas em imagens PET/CT (ZHOU *et al.*, 2021).

3.7.1 PSMA-1007 (^{18}F) e a marcação no PET/CT

Pesquisando na literatura o uso do PET/CT com PSMA-1007 (^{18}F) constata-se que é bem expressivo em diversos países, totalizando mais de 600 pacientes que receberam injeção do radiofármaco. Sua performance diagnóstica

tem sido descrita na detecção de recorrência em quatro locais diferentes (leito prostático, linfonodos, metástase óssea, e outras metástases) como mostrado na Tabela 1. Outras metástases incluem tecido mole e metástase visceral.

Tabela 1 - Performance diagnóstica do PSMA-1007 (^{18}F) em diferentes localizações conforme reportado na literatura.

Referência	Taxa de detecção (nº de pacientes com PET positivo dividido por todos os pacientes escaneados)				
	Total (todas as localizações)	Recorrência local	Linfonodos	Metástase óssea	Outras metástases
<i>Giesel 2019</i>	81,3% (204/251)	24,7% (62/251)	40,6% (102/251) ^a 19,5% (49/251) ^b 12% (30/251) ^c	40,2% (101/251)	3,6% (9/251)
<i>Rahbar 2018</i>	95% (95/100)	37 das 213 lesões ^d	107 das 213 lesões ^d	67 das 213 lesões ^d	2 das 213 lesões ^d
<i>Rauscher 2019</i>	80,4% (82/102)	26,5% (27/102)	53,9% (55/102)	21,6% (22/102)	4,9% (5/102)
<i>Giesel 2018</i>	75% (9/12)	25% (3/12)	42% (5/12)	25% (2/12)	Não reportado
<i>Sachpekidis 2019</i>	47% (8/17)	18% (3/17)	35% (6/17)	18% (3/17)	6% (1/17)
<i>Witkowska-Patena 2019</i>	60% (24/40)	27,5% (11,40)	35% (14/40)	32,5% (13/40)	Não reportado
<i>Meshcheriakova 2019</i>	77,8% (7/9)	55,6% (5/9)	22,2% (2/9)	44,4% (4/9)	Não reportado
^a linfonodos pélvicos					
^b linfonodos do retroperitônio					
^c linfonodos supradiagmáticos					
^d número de pacientes com recorrência em diferentes localizações não reportada, somente o número absoluto de lesões encontradas em diferentes localizações reportada.					

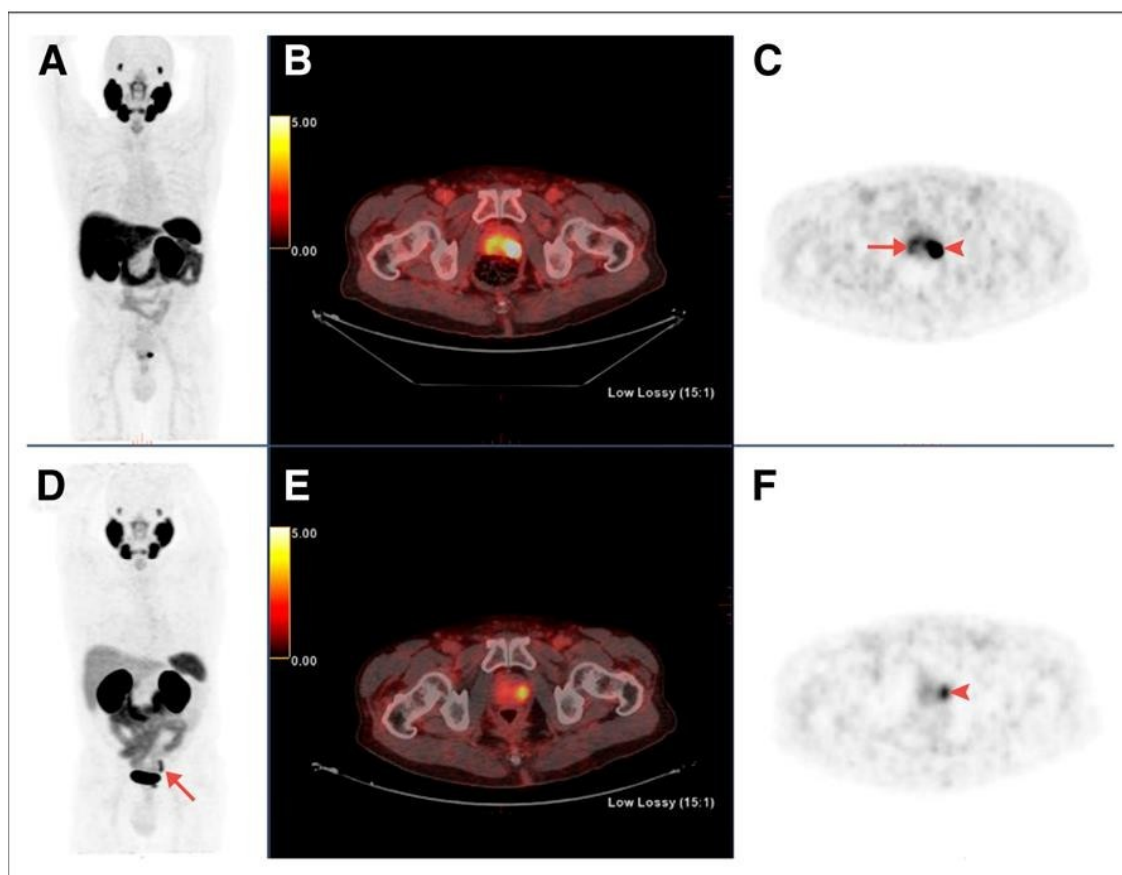
Fonte: Adaptado de informação técnica ao profissional da saúde. 20--. Elaborada por r2ibf. Disponível em: <https://www.r2ibf.com.br/r2ibf-rio-de-janeiro-home-pt>. Acesso em: 01 ago. 2023.

O uso do PSMA-1007 (^{18}F) no PET/CT vem sendo cada vez mais pertinente, uma vez que, ele promove um estadiamento preciso, pois auxilia na determinação da extensão do CP; no monitoramento de metástases para outras áreas do corpo; apresenta uma maior sensibilidade, permitindo uma detecção precoce da doença mesmo em pequenos tumores e possui uma alta especificidade para o antígeno de membrana da próstata, diminuindo a chance

de resultados falsos positivos. Além disso, ele consegue ser efetivo para um bom planejamento e monitoramento de tratamento (KESCH *et al.*, 2017b).

Na Figura 10, observa-se um exame PET/CT de um paciente de 67 anos com suspeita de ter CP onde é comparado o emprego do PSMA-11 (^{68}Ga) com PSMA-1007 (^{18}F), ambos radiofármacos emissores de partículas γ utilizados para diagnóstico.

Figura 10 - Comparação de uso do PSMA-1007 (^{18}F) (A - C) com o PSMA-11 (^{68}Ga) (D - F).



Fonte: KUTEN *et al.*, 2020.

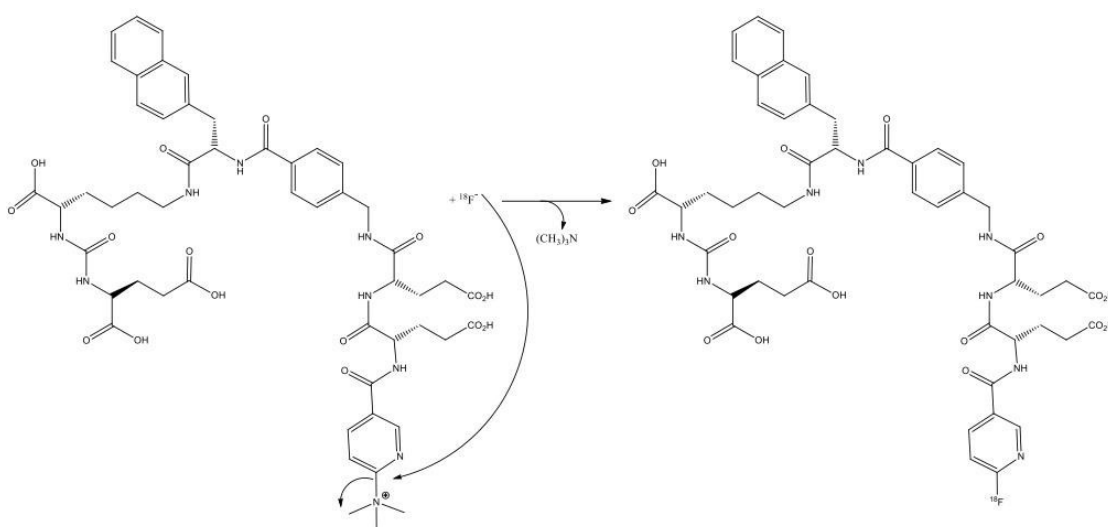
É possível constatar uma captação acentuada na bexiga urinária e no ureter esquerdo (seta vermelha) na imagem (D) de projeção de intensidade máxima de PSMA-11 (^{68}Ga), em oposição à excreção urinária quase insignificante de PSMA-1007 (^{18}F) (A). A lesão dominante no lobo prostático esquerdo é evidente em ambas as varreduras (setas em C e F). No entanto, e extensão da lesão, bem como uma segunda lesão no lobo direito é vista apenas na varredura de PSMA-1007 (^{18}F) (setas em C), posteriormente verificada na patologia como verdadeira lesão maligna (KUTEN *et al.*, 2020).

3.7.2 Produção do PSMA-1007 (^{18}F)

A produção do radioisótopo no acelerador de partículas, que é primeiro passo a ser dado, é feita utilizando água enriquecida com ^{18}O para obtenção do ^{18}F , onde há ganho de um próton e a perda de um nêutron.

A síntese do PSMA-1007 (^{18}F) é realizada em uma etapa única (CARDINALE *et al.*, 2017). Ocorre uma substituição nucleofílica por meio da adição-eliminação aromática em que o fluoreto radiomarcado ($^{18}\text{F}^-$) ataca o precursor da reação $\text{C}_{54}\text{H}_{64}\text{F}_3\text{N}_9\text{O}_{18}$ e após a saída da trimetilamina há a formação do produto PSMA-1007 (^{18}F) ($\text{C}_{49}\text{H}_{55}^{18}\text{FN}_8\text{O}_{16}$), como mostrado na Figura 11.

Figura 11 - Mecanismo da reação entre o precursor e o ânion fluoreto levando a obtenção de PSMA-1007 (^{18}F).



Fonte: Adaptado da European Pharmacopoeia, 2021.

Ao término da síntese há o fracionamento do radiofármaco, seguindo para controle de qualidade.

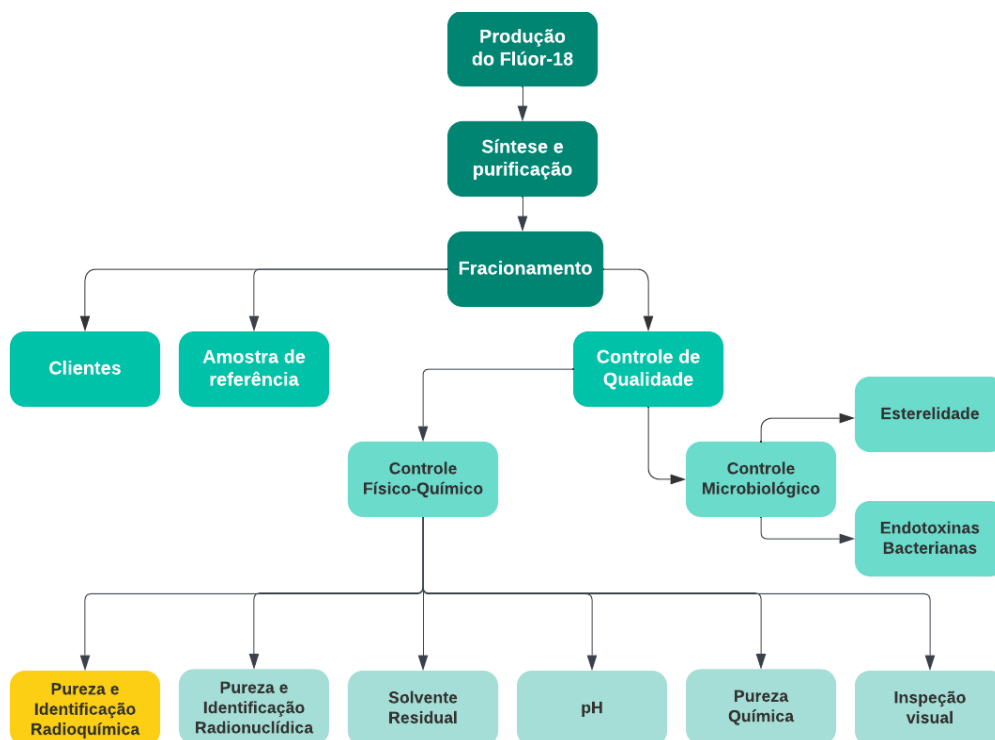
3.8 Controle de qualidade de radiofármacos

No Brasil, a ANVISA é a responsável pelo registro, notificação e pós registro dos radiofármacos e regula o setor por meio de Resoluções de Diretoria Colegiada (RDC) e Instruções Normativas (IN). A Agência avalia, conforme a regulamentação vigente, os requisitos de qualidade, eficácia e segurança

indispensáveis para a aprovação e disponibilização dos produtos no mercado (BRASIL, 2022).

A RDC nº 738, de 28 de julho de 2022, dispõe sobre o registro, notificação, importação e controle de qualidade de radiofármacos e a IN nº 128, de 30 de março de 2022, que disserta acerca das Boas Práticas de Fabricação (BPF) complementares a medicamentos radiofármacos são as principais normas vigentes no setor (ANVISA, 2022b). As Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos presentes na RDC nº 658, de 30 de março de 2022, preconizam importantes regras que devem ser seguidas durante o processo de produção de radiofármacos. Averiguando o Art. 13 da RDC nº 658 constata-se que o controle de qualidade faz parte das BPF quando se diz respeito à coleta de amostras, às especificações e à execução de testes, bem como à organização, à documentação e aos procedimentos de liberação que asseguram 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 (ANVISA, 2022a).

Fluxograma 1 - Processo produtivo do PSMA-1007 (^{18}F) no CDTN.

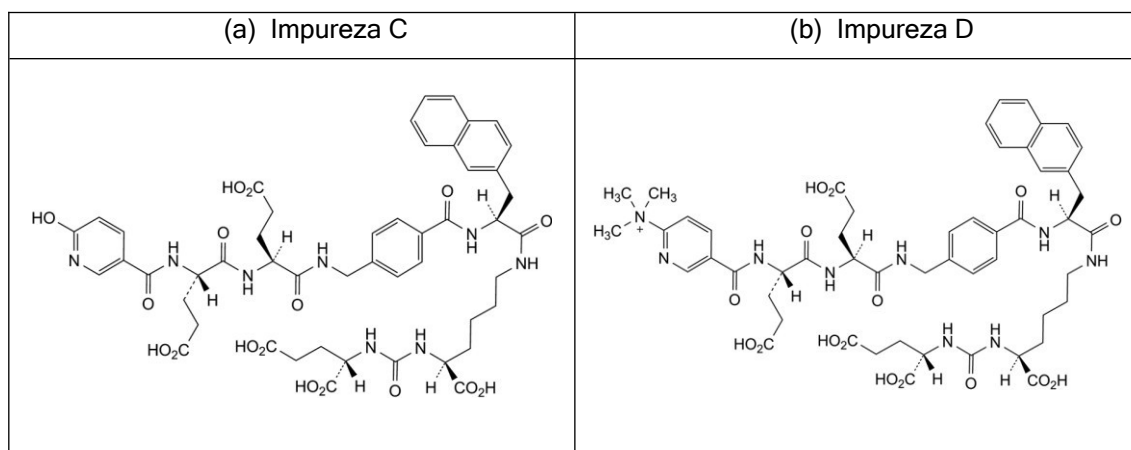


Para os radiofármacos são feitos todos os testes de controle de qualidade, que também são aplicados a produtos farmacêuticos, somados os testes de pureza radioquímica (PR) e radionuclídica necessários para essa categoria. De maneira geral, os testes são divididos em duas categorias: ensaios físico-químicos e ensaios microbiológicos (SAHA, 2010). Acima no Fluxograma 1, pode-se observar os testes que são realizados em ambos os grupos para o radiofármaco de interesse nesse estudo, PSMA-1007(^{18}F), no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN).

3.8.1 Pureza radioquímica

A PR é a razão percentual de radioatividade do radionuclídeo de interesse em relação à radioatividade total da preparação farmacêutica. Impurezas radioquímicas podem surgir em decorrência da sua decomposição, pH, luz, presença de oxidantes ou redutores, reação incompleta e radiólise. A existência de tais impurezas pode resultar na presença indesejada de espécies marcadas, resultando em um aumento desnecessário na dose de radiação no paciente, expondo assim alguns órgãos. Além disso pode atrapalhar a biodistribuição do radiofármaco, prejudicando as imagens obtidas nos exames e, conseqüentemente, desencadeando uma possível falha no diagnóstico (SAHA, 2010; ANVISA, 2019).

Sendo o método analítico mais utilizado na radiofarmácia, a PR garante a qualidade, seletividade e efetividade do radiofármaco em questão (Sharp *et al.*, 2005). Diversos métodos de análise são utilizados para determinar a PR, entretanto a cromatografia é o mais comum e amplamente utilizado devido à sua simplicidade com que realiza separações, identificações e quantificações das espécies químicas (COLLINS *et al.*, 2006).

Figura 12 - Impurezas conhecidas do PSMA-1007 (^{18}F).

Fonte: Adaptado da European Pharmacopoeia, 2021.

Segundo a monografia do PSMA-1007 (^{18}F) presente na Farmacopeia Europeia as possíveis impurezas, que podem ser encontradas por cromatografia são a impureza B (^{18}F) o ânion $^{18}\text{F}^-$, que pode ser determinada via Cromatografia em Camada Delgada (CCD), e as impurezas C, o produto de hidrólise (Figura 12a) e D, o material de partida (Figura 12b) que são determinadas via HPLC.

3.8.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida emprega duas fases, uma fase estacionária e outra fase móvel. Os componentes de uma mistura se distribuem entre as fases de tal forma que cada um deles é retido seletivamente na fase estacionária, resultando em migrações diferenciais, que ocorrem por diferença de afinidade promovendo assim a separação dos componentes individuais de uma mistura complexa (AMORIM, 2019; COLLINS *et al.*, 2006).

Uma vez separados, os analitos podem ser identificados e quantificados. Graças a estes atributos, esta técnica se consagrou como um dos métodos instrumentais mais importantes e utilizados em diversas áreas da Química, sobretudo da Química Analítica (VITHA, 2017).

A cromatografia líquida de alta eficiência, pode empregar coluna de fase normal ou reversa, sendo classificadas como um método físico-químico para separação. Em HPLC empregando fase normal a separação se dá por meio das

interações intermoleculares (como dispersões, ligação de hidrogênio, forças dipolo-dipolo). Já, na fase reversa a separação se dá por meio da partição.

3.8.2.1 Triângulo de seletividade para planejamento experimental em cromatografia

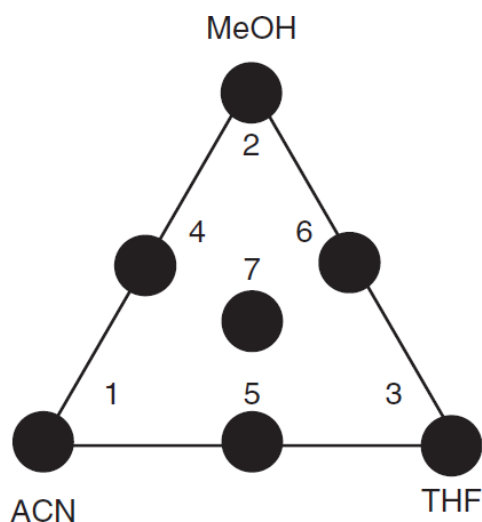
Snyder e Kirkland (1979) elaboraram o Triângulo de Seletividade, uma ferramenta muito útil para alterar o solvente orgânico, checar a melhor composição da fase móvel e desenvolver um novo método. Nele as propriedades mais importantes dos solventes estão organizadas, afetando assim a seletividade em HPLC.

A seletividade ou fator de separação (α) é um parâmetro que quantifica o grau de separação entre quaisquer dois solutos A e B, conforme descrito na equação abaixo:

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A}$$

onde “k” é o fator de retenção, “A” é o soluto com menor tempo de retenção (T_R) e “B” é o soluto com maior T_R e, conseqüentemente, maior fator de retenção. O tipo de solvente, tipo de coluna e o pH da fase móvel são parâmetros que alteram a seletividade. Por esse motivo há um triângulo para HPLC de fase reversa e outro para HPLC de fase normal (SNYDER; KIRKLAND, 1979; VITHA, 2017).

No triângulo de seletividade estão presentes as principais classes de solventes localizadas de acordo com a sua proporção de suas propriedades. Em HPLC de fase reversa, as três propriedades que mais são relevantes na hora de alterar a seletividade são: caráter básico, caráter ácido e propriedade dipolar. Como constituintes do triângulo de seletividade de fase reversa tem-se a ACN (caráter dipolar), o THF (caráter básico) e MeOH (caráter ácido), conforme pode ser visto na Figura 13.

Figura 13 - Triângulo de seletividade.

Fonte: SNYDER; KIRKLAND, 1979.

O triângulo nada mais é do que um planejamento experimental de misturas de coordenadas triangulares. Nele são realizados, no mínimo, 7 experimentos (3 nos vértices, 3 nas faces centrais e 1 no ponto central) em modo isocrático para achar a melhor condição para o método. Inicia-se, geralmente, com um método isocrático usando acetonitrila, pois esse solvente orgânico tem caráter dipolar e neutro). Depois utiliza-se o monográfico de solventes para fase reversa (ANC, THF e MeOH) para determinar a proporção de solvente dos outros vértices.

3.9 Validação de método analítico em radiofármacos

A validação analítica é guiada pela RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, que a define como sendo uma “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”. A validação é utilizada para se certificar que o método gera resultados fidedignos e é apropriado à finalidade a que se destina de forma documentada e mediante critérios objetivos (ANVISA, 2017).

Para a execução dos testes de validação analítica é importante se ater aos parâmetros requeridos em cada ensaio, porém todos devem estar de acordo com a RDC nº 166/2017 da ANVISA. Habitualmente os critérios a serem

considerados para a validação são exatidão, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), seletividade, limite de detecção, limite de quantificação e linearidade e intervalo ou faixa de trabalho (ANVISA, 2017).

3.9.1 Seletividade

A seletividade é a capacidade de um método em identificar e/ou quantificar o analito de interesse, indubitavelmente, na presença de outros analitos, matrizes ou de outro material potencialmente interferente (INMETRO, 2020). Em métodos cromatográficos devem ser atestados a pureza cromatográfica do sinal do analito, exceto para produtos biológicos (ANVISA, 2017). Dentre os vários possíveis interferentes, um consiste na própria matriz da amostra que pode conter componentes que venham a afetar o desempenho da medição, podendo aumentar ou reduzir o sinal do analito de interesse, comprometendo o resultado (INMETRO, 2020). Para avaliação desse parâmetro em matrizes complexas realiza-se curvas analíticas com e sem a matriz e compara-se as inclinações, caso não haja grande discrepância entre elas, conclui-se que não há efeito matriz. Segundo a ANVISA, deve ser adotado o nível de significância 5% nos testes dos radiofármacos (ANVISA, 2017).

3.9.2 Linearidade

A linearidade é a capacidade de um método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra dentro de uma dada faixa de aplicação (GUIDELINE, 2005; INMETRO, 2020). Geralmente pode ser inferida pela análise dos parâmetros como o coeficiente angular “a”, o coeficiente linear “b” e o coeficiente de correlação “R” (VALDERRAMA *et al.*, 2009). Abaixo podemos visualizar a equação da reta que relaciona as duas variáveis:

$$y = ax + b$$

onde:

y: resposta medida (sinal instrumental como absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x : concentração;

a : coeficiente angular (inclinação da curva analítica = sensibilidade);

b : coeficiente linear (interseção com o eixo y , quando $x = 0$).

De acordo com o Artigo 27 da RDC nº 166/2017 da ANVISA a linearidade deve ser avaliada mediante a apresentação dos seguintes dados:

- I. Representação gráfica das respostas em função da concentração do analito;
- II. Gráfico de dispersão dos resíduos, acompanhado de sua avaliação estatística;
- III. Equação da reta de regressão de y em x , estimada pelo método dos mínimos quadrados;
- IV. Avaliação da associação linear entre as variáveis por meio dos coeficientes de correlação (R) e de determinação (R^2);
- V. Avaliação da significância do coeficiente angular.
 - ✓ A homoscedasticidade dos dados deve ser investigada para a utilização do modelo adequado;
 - ✓ Nos testes estatísticos, deve ser utilizado um nível de significância de 5% (cinco por cento);
 - ✓ O coeficiente de correlação deve estar acima de 0,990;
 - ✓ O coeficiente angular deve ser significativamente diferente de zero.

3.9.3 Exatidão

A exatidão é um parâmetro obtido por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em relação a um valor aceito como verdadeiro ou aceito como referência (ANVISA, 2017; GUIDELINE, 2005). A exatidão do método analítico deve ser apresentada pela relação percentual de recuperação do analito de concentração conhecida adicionado à amostra ou pela relação entre a concentração média, determinada experimentalmente, e a concentração teórica correspondente. O desvio padrão relativo (DPR) para cada concentração deve ser calculado e os critérios de aceitação para o percentual de recuperação e DPR adquirido devem ser justificados mediante:

- I - Objetivo do método;
- II - Variabilidade intrínseca do método;

- III - Concentração de trabalho; e
- IV - Concentração do analito na amostra.

3.9.4 Precisão

O parâmetro que avalia a proximidade entre vários resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas é a precisão do método analítico, que deve ser expressa via repetibilidade, precisão intermediária ou reprodutibilidade (ANVISA, 2017). A RDC nº 166/2017 da ANVISA preconiza que na repetibilidade as amostras devem ser analisadas sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única eluição analítica. Já na precisão intermediária as amostras devem ser avaliadas no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes, realizada por operadores distintos; e contemplar as mesmas concentrações e o mesmo número de determinações descritas na avaliação da repetibilidade. Na reprodutibilidade a avaliação é feita em laboratórios distintos.

3.9.5 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) refere-se a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob as condições estabelecidas para o ensaio. O estabelecimento desse parâmetro pode se dar por meio de método visual, da razão sinal-ruído, baseado na determinação do branco ou em parâmetros da curva de calibração, considerando-se as particularidades do método utilizado (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020).

No que se refere ao limite de quantificação (LQ), a RDC nº 166/2017 da ANVISA o define como a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão, é determinado baseado em parâmetros da curva analítica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Infraestrutura

O presente trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de Pesquisa e Desenvolvimento e Controle de Qualidade Físico-Químico da Unidade de Pesquisa e Produção de Radiofármacos (UPPR). Essas dependências situam-se no CDTN, localizado dentro do campus da UFMG, e disponibiliza uma infraestrutura adequada para manipulação, produção e descarte de materiais radioativo, assim como soluções químicas, células e animais. A UPPR atende às exigências estabelecidas pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) e da ANVISA e possui licença de funcionamento.

4.2 Reagentes e soluções

- Acetonitrila grau HPLC (Merck, Alemanha);
- Ácido Fosfórico 85% (Millipore, Alemanha);
- Ácido Trifluoroacético 99% (Sigma-Aldrich, EUA);
- Água purificada - Purificador Milli-RX 45 (Millipore, EUA);
- Cloreto de Potássio P.A (Merck, Alemanha);
- Cloreto de Sódio P.A (Merck, Alemanha);
- Diidrogenofosfato de Sódio Monoidratado (Merck, Alemanha);
- Etanol grau HPLC (JT Baker, EUA);
- Etanol 40% (Millipore, Alemanha);
- Fosfato Dissódico Anidro P.A (Merck, Alemanha);
- Fosfato de Potássio monobásico P.A (Merck, Alemanha);
- Metanol grau HPLC (Millipore, Alemanha);
- Padrão desfluorohidroxi-PSMA-1007 (*Advanced Biochemical Compounds* ABX, Alemanha);
- Padrão desfluorotrimetil-PSMA-1007 (*Advanced Biochemical Compounds* ABX, Alemanha);
- Padrão PSMA-1007 (*Advanced Biochemical Compounds* ABX, Alemanha);
- Tetraidrofurano grau HPLC (JT Baker, EUA);

4.2.1 Preparo da solução padrão de PSMA-1007 100ppm

- Solução 1: Foram medidos 20 mg de cloreto de potássio, 800 mg de cloreto de sódio, 20 mg de fosfato de potássio monobásico e 114 mg de fosfato dissódico, os quais foram solubilizados em água deionizada e a mistura transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL.
- Solução 2: Foram transferidos 40 mL de etanol + 60 mL de água deionizada para um balão volumétrico de 100 mL;
- Solução A: Transferiu-se 30 mL de solução 1 + 10 mL de solução 2 para um balão volumétrico de 50 mL.

Pesou-se 1 mg de padrão de PSMA-1007 e transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL. Foram adicionados 5 mL da solução A, levado em ultrassom por 5 minutos e completado o volume com solução A. Para as demais soluções estoque utilizou-se cálculos de diluição (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021).

4.2.2 Preparo da solução padrão de Impureza C 100ppm

Pesou-se 1 mg de desfluoro-hidroxi-PSMA-1007 (Impureza C), transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL e foi adicionado 4 mL de etanol. A solução foi levada em ultrassom por 5 minutos e completou-se o volume com água deionizada. Para as demais soluções estoque utilizou-se cálculos de diluição (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021).

4.2.3 Preparo da solução padrão de Impureza D 100ppm

Pesou-se 1 mg de desfluorotrimetil-PSMA-1007 (Impureza D), transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL e foi adicionado 4 mL de etanol. A solução foi levada em ultrassom por 5 minutos e completou-se o volume com água deionizada. Para as demais soluções estoque utilizou-se cálculos de diluição (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021).

4.2.4 Preparo das soluções de fase móvel

- ❖ Preparo da fase móvel A1 (tampão fosfato):
 - Solução de dihidrogenofosfato de sódio monoidratado: Pesou-se 3,59 g de dihidrogenofosfato de sódio monoidratado, os quais foram

solubilizados em água deionizada e a mistura transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 1000 mL.

- Solução de ácido fosfórico: Transferiu-se 6,2 mL de ácido fosfórico para um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água deionizada;

Transferiu-se a solução de dihidrogenofosfato de sódio monoidratado para um béquer de 1000 mL com o auxílio de uma proveta, e foi adicionado 10 mL da solução de ácido fosfórico. Ajustou-se o pH para 2,5 utilizando aproximadamente 400 µL da solução de ácido fosfórico preparada. Filtrou-se a solução em uma membrana filtrante (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021).

❖ Preparo da fase móvel A2 (TFA 0,1%):

Em um balão volumétrico de 500 mL adicionou-se 500 µL de TFA 99% e avolumou-se com água deionizada. A solução resultante foi submetida à filtração à vácuo (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021).

❖ Preparo da fase móvel B1 (ACN) e B2 (MeOH):

Filtrou-se quantidade suficiente de acetonitrila e metanol em uma membrana filtrante e em frascos separados (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021).

4.3 Equipamentos, materiais e sistemas

- Balança analítica (Mettler Toledo, EUA)
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo Agilent HP 1200, equipado com bomba G1311A (Quat Pump), injetor manual de mostras G1328B e detector UV G1314B (Agilent Technologies, EUA);
- Coluna de fase reversa modelo Eclipse XDB-C18 4,6 x 150 mm 5µm (Agilent Technologies, EUA);
- Detector de radioatividade modelo Gabi Star (Raytest, Alemanha);
- Medidor de pH (Mettler Toledo, EUA);
- Pipetas automáticas (Eppendorf, EUA);
- Tiras indicadoras de pH (Merck, Alemanha);

- Vidraria em geral, tais como béqueres, erlemeyers, balões volumétricos e provetas.

4.4 Métodos

O presente trabalho tem como objetivo otimizar e validar uma metodologia analítica a ser implementada em HPLC. Essa técnica está sendo utilizada no controle de qualidade físico-químico do PSMA-1007 (^{18}F) e o foco do trabalho é no processo destacado em amarelo no Fluxograma 1, p. 35.

A HPLC é a técnica analítica utilizada para determinar a PR do marcador molecular e analisar a estabilidade das marcações. Os parâmetros foram estabelecidos com base no método encontrado na dissertação desenvolvida na UPPR (OLIVEIRA, 2022) uma adaptação da monografia oficial do radiofármaco da Farmacopeia Europeia 10ª edição (2021). Utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo Agilent HP 1200, equipado com bomba G1311A (Quat Pump), injetor manual de amostras G1328B e detector UV G1314B (Agilent Technologies, EUA) e, de radioatividade modelo Gabi Star (Raytest, Alemanha) acoplado ao sistema. A coluna utilizada foi a de fase reversa modelo Eclipse XDB-C18 4,6 x 150 mm 5 μm (Agilent Technologies, EUA).

Os fatores estudados na técnica para o desenvolvimento do método foram sistema de eluição, composição das fases móveis A e B e tempo de corrida.

4.5 Validação analítica

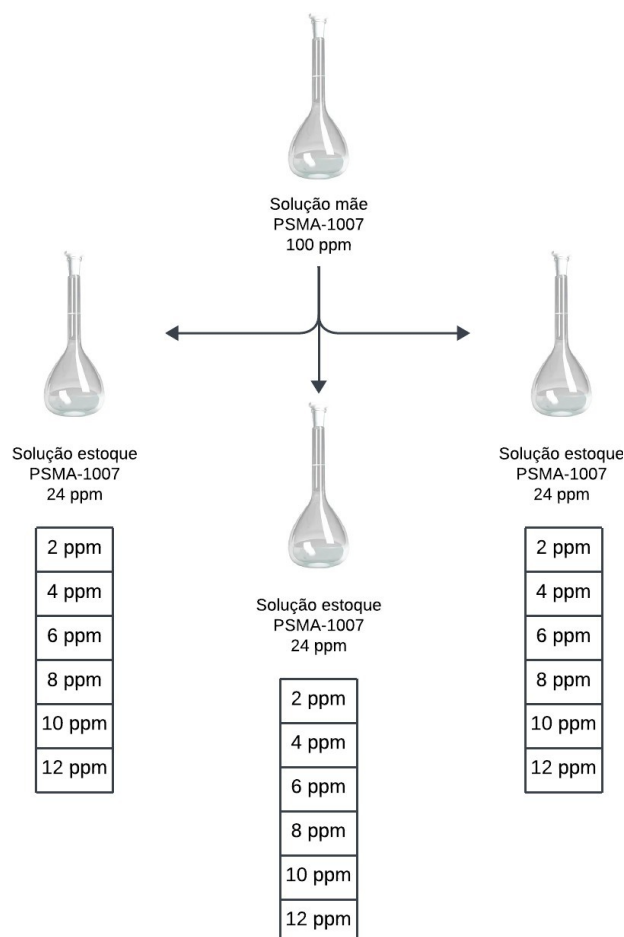
4.5.1 Seletividade

A ANVISA preconiza que para avaliação do efeito matriz deve ser realizada uma comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com a solução química de referência (SQR) do analito em solvente e com a amostra fortificada com a SQR do analito. Deve-se estabelecer as curvas com 5 concentrações diferentes da substância química de referência preparadas em, no mínimo, triplicatas (ANVISA, 2017).

Para desenvolver a curva de analítica da amostra fortificada com a SQR do analito foram feitas seis soluções de concentrações diferentes do PSMA-1007 sem radiomarcagem dentro da faixa estabelecida para o método. Uma solução mãe de 100ppm foi preparada e diluída posteriormente produzindo três soluções

estoques de mesma concentração (24ppm). A partir das soluções estoques preparou-se cada um dos seis níveis da curva de calibração, como apresentado na Figura 14.

Figura 14 - Soluções de PSMA-1007 utilizadas para testes de seletividade.



Os níveis de calibração foram preparados em eppendorfs® com concentrações apresentadas mediante diluição da solução estoque de 24ppm com uma amostra de referência de PSMA-1007 (matriz) e o diluente utilizado na produção do radiofármaco (KCl, NaCl, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, H₂O e EtOH). Os volumes utilizados são expostos na Tabela 2, a seguir.

Tabela 2 - Volumes das soluções utilizados para o desenvolvimento da curva de calibração do teste de efeito matriz.

Concentração	Volume da solução estoque (µL)	Volume da amostra de referência (µL)	Volume do Diluente	Volume final
2ppm	12,5	45	92,5	150 µL
4ppm	25	45	80	
6ppm	37,5	45	67,5	
8ppm	50	45	55	
10ppm	62,5	45	42,5	
12ppm	75	45	30	

A metodologia utilizada para desenvolvimento da curva de calibração do PSMA-1007 em solvente que foi utilizada para fins comparativos do teste é descrita no item 4.5.2 nos testes de linearidade. Não houve aleatoriedade na leitura das amostras.

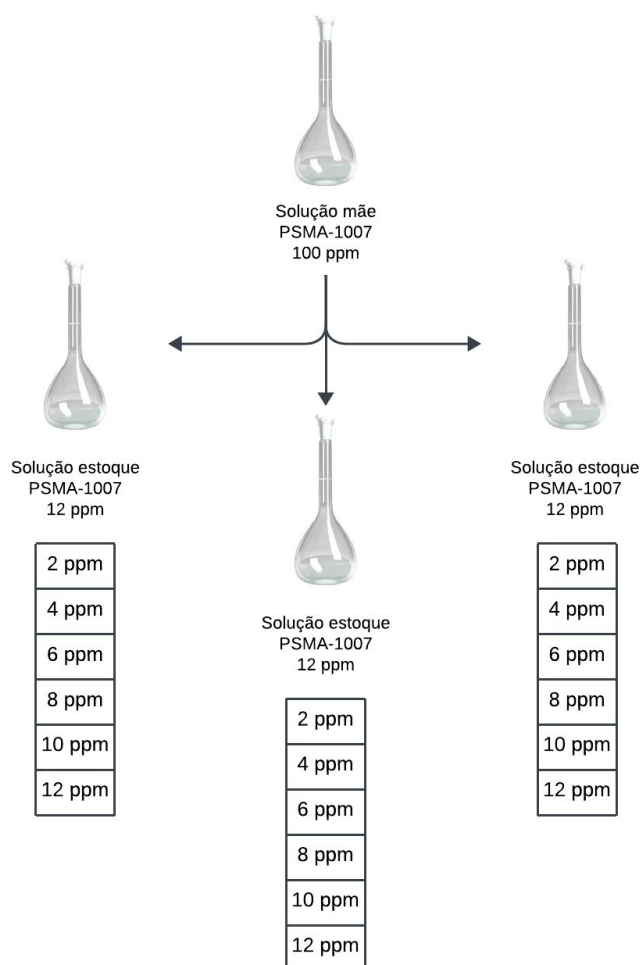
Para confirmar a obtenção de um modelo adequado, utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA) do software Excel®. Para avaliar as variâncias da regressão e o efeito matriz pela comparação entre os coeficientes angulares das curvas obtidas, aplicou-se o teste F (*Fisher-Snedecor*) e o teste t (*Student*) respectivamente. O nível de confiança adotado foi de 95%.

4.5.2 Linearidade

De acordo com a RDC nº 166/2017, para determinar a linearidade também é necessário utilizar, no mínimo, 5 concentrações diferentes da substância química de referência preparadas em, no mínimo, triplicatas. As soluções usadas devem ser feitas de maneira independente, podendo ser diluídas de uma mesma solução mãe (ANVISA, 2017).

Para estabelecer a linearidade do método analítico foram feitas seis concentrações diferentes do PSMA-1007 sem radiomarcagem dentro da faixa estabelecida para o método. Uma solução mãe de 100ppm foi preparada e diluída posteriormente produzindo três soluções estoques de mesma concentração (12ppm). A partir das soluções estoques preparou-se cada um dos seis níveis da curva de calibração, como apresentado na Figura 15.

Figura 15 - Soluções de PSMA-1007 utilizadas para testes de linearidade.



A ausência de valores discrepantes, do inglês *outliers*, foi avaliada com base nos resíduos padronizados Jackknife e a homoscedasticidade (igualdade das variâncias) pelo teste de Levene no Excel. A equação da reta de regressão foi estimada pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). Para confirmar a obtenção de um modelo adequado, utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA) do software Excel. O nível de confiança dos testes foi de 95%.

4.5.3 Exatidão e precisão

A exatidão e a precisão de um método, segundo a RDC nº 166/2017, devem ser investigadas a partir de, no mínimo, 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 concentrações: baixa, média e alta, com 3 réplicas em cada nível. As amostras devem ser preparadas de maneira independente, podendo ser utilizadas soluções diluídas de uma mesma solução mãe da SQR (ANVISA, 2017).

O processo utilizado para avaliar a exatidão do método foi realizado por meio de ensaios de recuperação, estimada pela análise de substância de pureza conhecida (SQR). Contemplando o intervalo linear do método analítico (2ppm – 12ppm), três soluções de concentrações diferentes de PSMA-1007 sem radiomarcagem foram preparadas de maneira independente a partir de uma diluição de uma solução mãe de 100ppm, são elas: 2ppm (baixa), 7ppm (média) e 12ppm (alta).

A determinação da recuperação (%) foi feita mediante a relação entre a concentração média, determinada experimentalmente, e a concentração teórica em cada concentração correspondente, dada pela equação a seguir:

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

A precisão foi estabelecida em condição de repetibilidade e em condição de precisão intermediária, contemplando as mesmas concentrações e o mesmo número de determinações descritas na avaliação da exatidão do método. Foi comprovada a precisão do método mediante a dispersão dos resultados calculando-se o DPR, como expresso na fórmula abaixo:

$$DPR = \left(\frac{DP}{CMD} \right) \times 100$$

onde:

DPR: desvio padrão relativo;

DP: desvio padrão;

CMD: concentração média determinada.

4.5.4 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção e quantificação foram determinados baseados nos parâmetros da curva analítica, calculando-os utilizando os dados do estudo de linearidade pela fórmula a seguir:

$$L = \frac{s_b \times F}{a}$$

onde:

L : limite;

S_b : desvio padrão do intercepto;

F : fator, igual 3,3 para o limite de detecção e 10 para o limite de quantificação;

a : coeficiente angular.

O desvio padrão (s) foi obtido através do desvio padrão do intercepto (s_b) que é determinado pela equação mostrada abaixo:

$$S_b = S_y \sqrt{\frac{\sum(x)^2}{n \sum(x - \bar{x})^2}}$$

onde:

x : valor individual de concentração;

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

n : número de medições.

Para confirmar o valor obtido na LD foi feita uma solução de PSMA-1007 sem radiomarcagem de concentração 0,15ppm e a mesma foi injetada 6 vezes. Para o teste de LQ foi utilizada uma de solução de 1ppm que também foi injetada 6 vezes no HPLC.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Desenvolvimento do método analítico

Na monografia do PSMA-1007 (^{18}F) retratada na Farmacopeia Europeia são descritas a presença de duas impurezas que devem ser avaliadas na hora da análise cromatográfica via HPLC. Uma delas é chamada de impureza C (Figura 12a, p. 36) obtida quando o precursor reage com um grupo hidroxila proveniente, provavelmente, de traços de água presentes no meio reacional ao invés do ânion fluoreto ^{18}F . A outra é a impureza D (Figura 12b, p. 36) que é o próprio precursor da reação.

A Farmacopeia Europeia propõe um método analítico para o controle físico-químico da pureza e identificação radioquímica do PSMA-1007 (^{18}F), conforme descrito, no Quadro 2, abaixo. Porém o Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN) desenvolveu e validou um método baseado na Farmacopeia Europeia que já está sendo utilizado na produção do PSMA-1007 (^{18}F) (OLIVEIRA, 2022; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021).

Quadro 2 - Condições dos métodos da Farmacopeia e do CDTN.

Parâmetros	Método da Farmacopeia	Método do CDTN
<i>Comprimento de onda</i>	225 nm	225 nm
<i>Coluna cromatográfica</i>	C18 (150 x 4,6 mm), 2,7µm de partícula	C18 (150 x 4,6 mm), 5µm de partícula
<i>Fluxo</i>	1,3 mL/min	1 mL/min
<i>Sistema</i>	Gradiente	Gradiente
<i>Fase móvel A</i>	Tampão Fosfato pH 2,5	Tampão Fosfato pH 2,5
<i>Fase móvel B</i>	Acetonitrila	Acetonitrila
<i>Volume de injeção</i>	20 µL	20 µL
<i>Tempo de eluição</i>	21 minutos	12 minutos
<i>Tempo de retenção do padrão de PSMA-1007</i>	11 min	8 min

Fonte: European Pharmacopoeia, 2021 e documentos internos do CDTN.

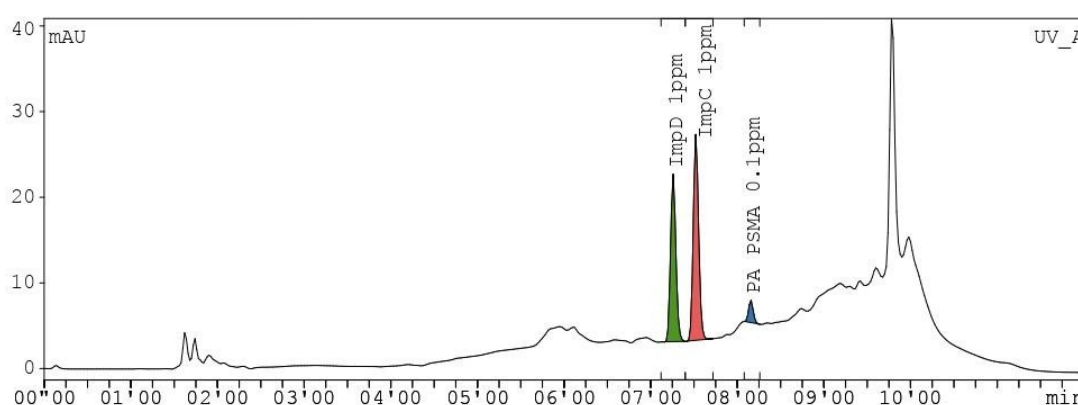
Uma limitação de ambos os métodos é a utilização de Acetonitrila (ACN) como solvente constituinte da fase móvel B. Embora seja amplamente utilizada na cromatografia líquida de fase reversa, seu custo é elevado e sua aquisição

tem sido dificultada devido a diminuição da oferta internacional. Além disso, na Ficha de Informação de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) da ACN, é possível constatar que se trata de um reagente com perigo de toxicidade aguda por via inalatória, oral e dérmica (categoria 4) (LANÇAS, 2009; SIGMA-ALDRICH, 2020).

O Limite Inferior de Tolerância Imediata, do inglês *Immediately Dangerous to Life or Health* (IDLH), que é uma medida usada pelo Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional, do inglês *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH) nos Estados Unidos, da ACN é de 137ppm. Portanto a ideia inicial do presente trabalho era substituir a ACN como eluente, alterando a composição da fase móvel para otimizar o método (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2023).

O primeiro passo dado na pesquisa foi analisar os dados dos cromatogramas com o método já validado e que está em uso no CDTN, cujos parâmetros estão descritos no Quadro 2, p. 52. Utilizando o sistema gradiente com tampão fosfato e ACN, injetou-se uma solução contendo a impureza C 1ppm, impureza D 1ppm e o padrão de PSMA-1007 0,1ppm, identificado como solução com padrões (SP) e gerou-se o cromatograma que pode ser observado na Figura 16.

Figura 16 - Cromatograma de padrões de impureza C, impureza D e PSMA-1007 conforme metodologia gradiente já validada do CDTN.



Optou-se por injetar uma solução contendo as impurezas já conhecidas e identificadas na Farmacopeia Europeia, pois elas têm T_R próximos e eluem antes do pico de PSMA-1007. Dessa forma é possível observar não só o T_R do padrão, mas também a resolução entre os picos, que é um fator de extrema importância

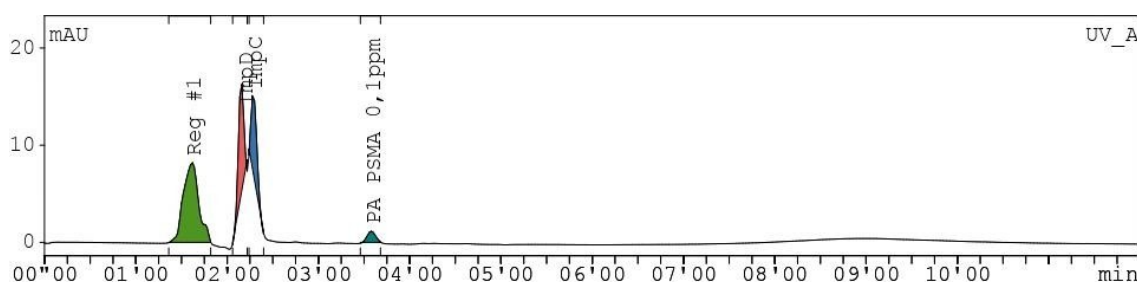
para a validação do método. O fator de separação (α) e o fator de retenção (k) tem grande influência sobre a resolução, como é possível observar na equação abaixo, e são fortemente influenciados pela fase móvel.

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k}{1 + k} \right)$$

onde “N” é o número de pratos teóricos, “ α ” é a fator de separação ou seletividade e “k” é o fator de retenção.

Analisando o cromatograma obtido, percebeu-se que o T_R dos analitos se deu entre 7'16 e 8'10 e nesse tempo de eluição o gradiente se encontrava em torno de 70% tampão fosfato e 30% ACN. Para respeitar as condições para a aplicação do triângulo de seletividade, que é projetado para um sistema isocrático, optou-se por testar uma condição isocrática 70% tampão fosfato e 30% ACN, mantendo-se as demais condições. Para observar o comportamento da amostra mediante ao novo cenário foi injetada a mesma SP e obteve-se o cromatograma da Figura 17.

Figura 17 - Cromatograma de padrões de impureza C, impureza D e PSMA-1007 utilizando sistema isocrático 70% tampão fosfato e 30% ACN.

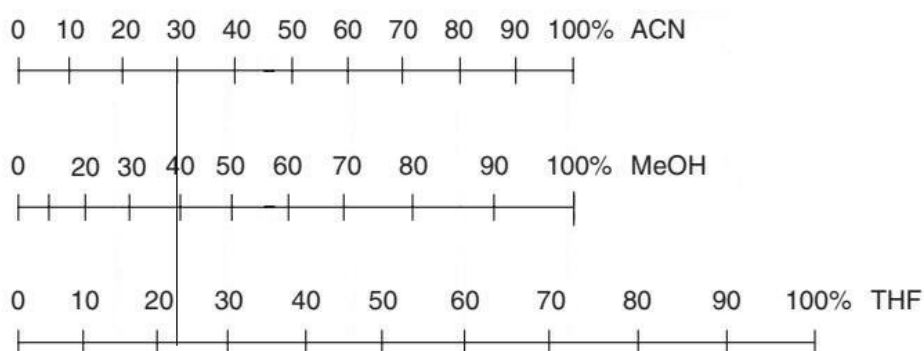


Percebeu-se que as impurezas que antes estavam separadas com resolução de 1,15 no método gradiente, estavam coeluídas. O pico denominado “Reg #1” é referente à fase móvel e os demais foram identificados por meio da comparação das injeções isoladas da impureza C, impureza D e padrão PSMA-1007, respectivamente.

A partir desses dados utilizou-se o monográfico para que as proporções dos outros solventes fossem planejadas e testadas mediante o triângulo de seletividade. O monográfico é uma ferramenta útil para estimar a composição de

uma nova fase móvel com solvente orgânico diferente que resultará em um comportamento semelhante, ou seja, um T_R próximo ao da fase móvel original que se deseja substituir. Levando em consideração uma composição de 70% tampão fosfato como solvente aquoso e 30% de ACN, obteve-se o monográfico para as soluções aquosas dos solventes orgânicos metanol e tetrahidrofurano (THF), conforme pode ser observado, a seguir, na Figura 18.

Figura 18 - Nomográfico de HPLC em fase reversa.



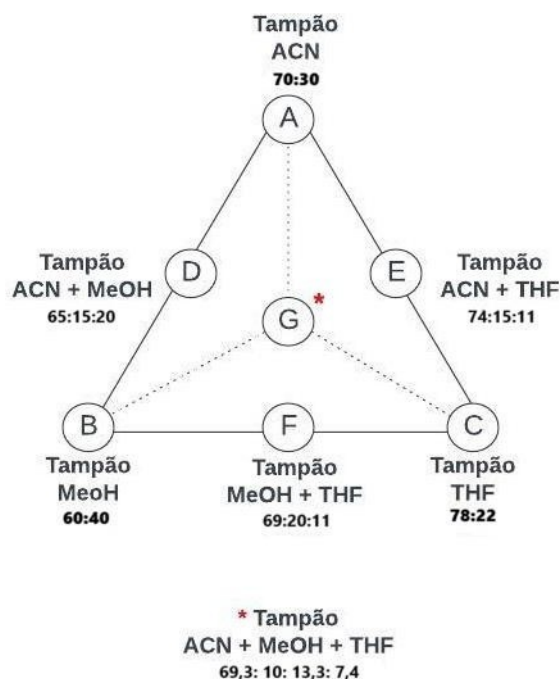
Fonte: Adaptado de SNYDER; KIRKLAND, 1979.

O monográfico revela que pode se esperar uma retenção semelhante para os mesmos compostos na mesma coluna se for utilizado cerca 30% ACN e 70% de tampão, ou 40% MeOH e 60% tampão fosfato, ou 22% THF e 78% tampão fosfato. Na Figura 19, são demonstradas essas proporções representadas nos vértices que gera os experimentos A, B e C. Os experimentos D, E e F da face do triângulo são uma mistura na proporção 1:1 de cada solução que foi escolhida nos vértices. Por fim, uma mistura 1:1:1 das três soluções dos vértices é feita para gerar o experimento G. Os sete cromatogramas gerados devem ser comparados para escolher a melhor condição de separação.

O experimento A já tinha sido realizado, conforme visto na Figura 17. O segundo experimento foi o do vértice C (78% tampão fosfato e 22% de THF) e os resultados foram insatisfatórios uma vez que não foi possível separar as impurezas C e D do PSMA, conforme esperado, pois utilizando-se do triângulo era esperado um comportamento semelhante pensando apenas na força do solvente. Tal fato pode ser explicado pelo caráter mais básico de THF, que é uma molécula que consiste em um anel de quatro átomos de carbono e um de oxigênio. A doação de pares de elétrons não ligantes é possível graças ao átomo

de oxigênio, tornando então a molécula uma base de Lewis. Levando em consideração que o pH está ácido, devido ao emprego tampão fosfato que o mantém a 2,5, a justificativa pode ser pautada na polaridade. Dentre MeOH, ACN e THF, o THF é o mais forte, pois é o menos polar dentre os demais e com isso não há tantas interações entre o analito e a fase estacionária (C18) devido a competição (SNYDER; KIRKLAND, 1979).

Figura 19 - Triângulo de seletividade projetado para testes.

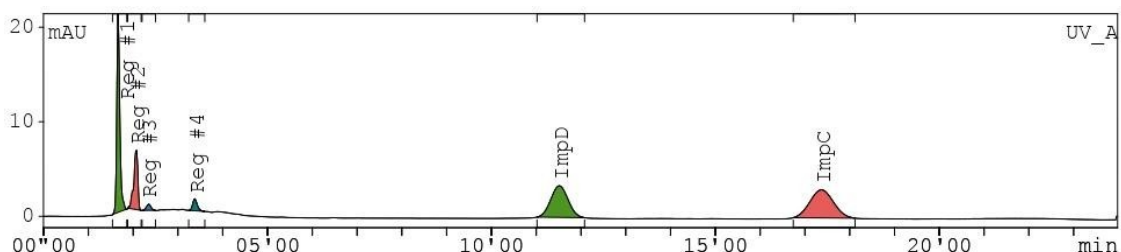


Fonte: Adaptado de SNYDER; KIRKLAND, 1979.

O terceiro experimento feito foi o do vértice B (60% tampão fosfato e 40% MeOH) injetando a SP. Apesar de se esperar um T_R semelhante, o tempo de eluição foi alterado de 12 para 25 minutos, Figura 20, uma vez que não foi observado o pico do PSMA, mostrando que a força do eluente não é o fator mais determinante para separação dos analitos. A explicação deve ser em relação ao caráter ácido do metanol e o caráter dipolo do ACN. O PSMA é uma molécula contendo vários átomos de carbono e grupos funcionais polares, desta forma o caráter dipolo parece ter grande influência sobre a molécula, logo a substituição dos eluentes parece ter prejudicado a interação entre os analitos e a fase móvel aumentando o T_R . Ao aumentar a quantidade de MeOH na mistura aumentou-

se a fração orgânica do eluente, este aumento pode ter favorecido as interações dipolo do metanol que apesar das características ácidas, o também tem características dipolo (SNYDER; KIRKLAND, 1979).

Figura 20 - Cromatograma de padrões de impureza C, impureza D e PSMA-1007 utilizando sistema isocrático 60% tampão fosfato e 40% MeOH.



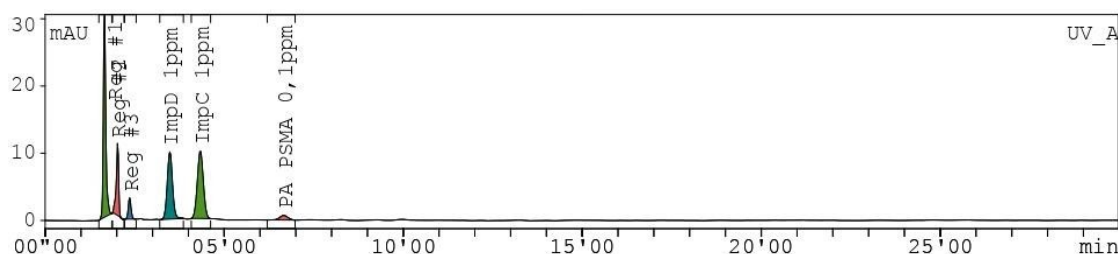
Os picos Reg #1, #2, #3 e #4 são referentes à fase móvel e os das impurezas C e D foram identificados mediante injeção isolada de cada impureza e padrão PSMA-1007. O pico do PSMA-1007 não pode ser observado, pois o seu T_R foi maior do que o tempo de eluição. Diante o resultado satisfatório e promissor da composição de tampão fosfato e MeOH, grande disponibilidade de MeOH grau HPLC no estoque do CDTN e uma dificuldade de obtenção do THF, decidiu-se por investir esforços na otimização do método isocrático com MeOH e não dar prosseguimento nos experimentos no triângulo de seletividade.

Como o tempo de eluição estava muito longo (25 minutos) e o pico do padrão de PSMA-1007 ainda não havia aparecido, optou-se por aumentar a porcentagem de solvente orgânico para 50% de MeOH e foi injetado a mesma SP. A motivação para essa decisão é explicada pelo fato da molécula de PSMA-1007 ter característica pouco polar, visto que ela possui cadeias grandes e grupos funcionais hidrofóbicos na sua estrutura molecular. Conclui-se, então, que o PSMA-1007 possui uma tendência de ser mais miscível em solventes orgânicos do que em água, ou seja, o coeficiente de partição será maior em solventes orgânicos (SNYDER; KIRKLAND, 1979).

Logo, esperava-se que ao aumentar a proporção de MeOH (%B) haveria redução uma redução do T_R , pois haveria o aumento da fase orgânica menos polar que a água. Deste modo, aumentar a força do solvente ao aumentar a concentração do solvente orgânico, diminuindo a polaridade do eluente e

favorecendo a sua interação com o analito acelerando sua eluição e diminuindo seu TR. O seguinte cromatograma, da Figura 21, ratifica o que era previsto.

Figura 21 - Cromatograma de padrões de impureza C, impureza D e PSMA-1007 utilizando sistema isocrático 50% tampão fosfato e 50% MeOH.



O resultado foi satisfatório com picos com resolução acima de 1, o que garante uma eficiência da separação entre os dois picos adjacentes, e com T_R 03'29 para a impureza D, 04'20 para a impureza C e 06'40 para o padrão de PSMA-1007. Com isso o tempo total da eluição pôde ser reduzida de 12 minutos para 10 minutos. Os picos Reg #1, #2, #3 e são picos referentes à fase móvel e os das impurezas C e D foram identificados mediante injeção isolada de cada impureza e padrão PSMA-1007. Mediante os dados recolhidos, concluiu-se que um dos objetivos do projeto havia sido alcançado, a mudança do ACN como solvente orgânico da fase móvel (VITHA, 2017).

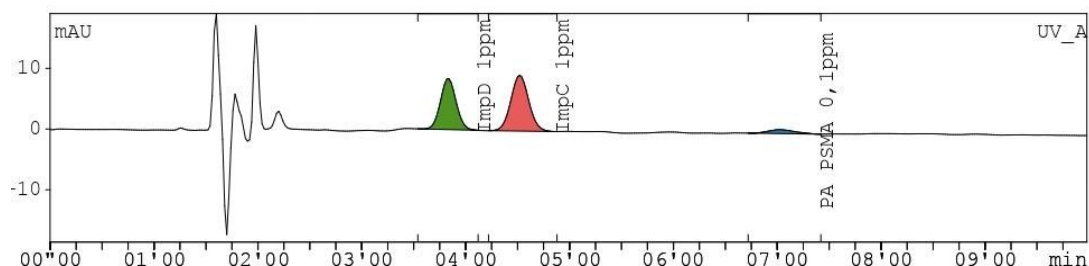
Na literatura são relatados problemas com o uso do tampão fosfato solubilizado solvente aquoso constituinte da fase móvel (CARDINALE *et al.*, 2017; KATZSCHMANN *et al.*, 2021; MAISTO *et al.*, 2021). A presença desses sais do tampão pode resultar na formação de precipitados quando mesclado com solventes orgânicos, como por exemplo acetonitrila e metanol que são os mais utilizados em HPLC de fase reversa. Como resultado pode haver danos à coluna cromatográfica, o que ocasiona uma coluna obstruída e com a eficiência reduzida. Além disso o pH de 2,5, que é o previsto na Farmacopeia Europeia, pode variar ao longo do tempo, podendo afetar a reprodutibilidade das análises. Com isso torna-se necessário o controle do pH com precisão (DCTECH, 2017; MODUM TECH, 2022).

Cardinale *et al.* (2017), Katzschnmann *et al.* (2021) e Maisto *et al.* (2021) utilizam uma solução de TFA 0,1% como substituinte do solvente aquoso tampão fosfato na fase móvel. Tal alteração é coerente visto que ele também ajuda a

ajustar o pH da fase móvel para uma faixa mais ácida, porém sem causar precipitação de sais e, conseqüentemente, sem entupir a coluna.

Como teste foi feito uma injeção de SP com 50% TFA 0,1% e 50% MeOH no sistema isocrático. Como resultado foi obtido o cromatograma apresentado na Figura 22.

Figura 22 - Cromatograma de padrões de impureza C, impureza D e PSMA-1007 utilizando sistema isocrático 50% TFA 0,1% e 50% MeOH.



Ao término desse teste encontrou-se uma condição favorável onde a resolução entre as impurezas era de 1,19 e entre elas e o padrão era de 3,46, valores obtidos a partir do software Gina Star 4.0. Apesar da resolução entre as impurezas não ser o ideal (1,5), tal fato não é um impeditivo para a continuidade do desenvolvimento deste método, uma vez que, as impurezas não são quantificadas. Com isso foi estabelecido o novo método utilizando metanol acidificado com TFA e sem a adição de tampão. Todos os parâmetros são descritos no Quadro 3 abaixo.

Quadro 3 - Condições finais do método estabelecido.

Parâmetros analisados	
Comprimento de onda (nm)	225
Fluxo da FM	1 mL/min
Sistema de eluição	Isocrático 50:50
Fase móvel A	TFA 0,1%
Fase móvel B	Metanol
Volume de injeção (µL)	20
Tempo de eluição (min)	10

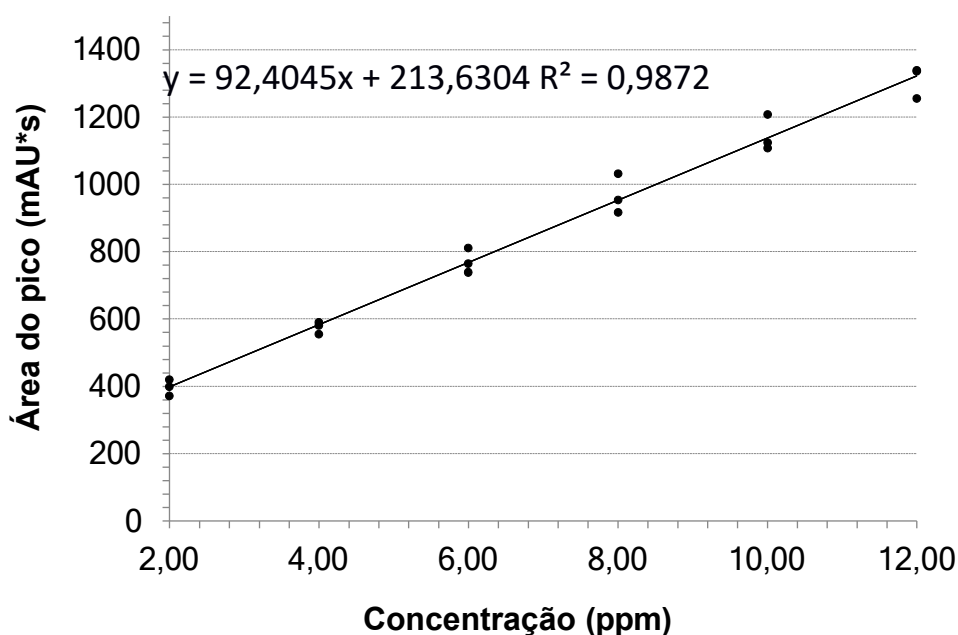
5.2 Validação analítica do método desenvolvido

5.2.1 Seletividade

Para o estudo de efeito de matriz, o procedimento empregado depende da disponibilidade do analito, da matriz sem o analito e das amostras de referência nas concentrações de interesse (INMETRO, 2020). Como, nesse caso, a matriz sem o analito não era disponível, preparou-se duas curvas analíticas, que continham a mesma adição de analito para cada nível de concentração. Uma curva foi preparada com adição de analito na matriz da amostra de referência (que já continha um nível do analito). A outra curva analítica não incluiu a matriz de amostra, que foi elaborada no teste de linearidade, cujos dados são encontrados no Apêndice C.

A curva de calibração contendo a matriz e a regressão linear podem ser encontrados, na Figura 23, abaixo.

Figura 23 - Gráfico área *versus* concentração do analito com a matriz.



Obteve-se a equação da reta apresentada acima cujos dados são apresentados no Apêndice G. Comprovou-se a premissa de ajuste ao modelo da curva analítica contendo a matriz, cujos testes podem ser encontrados nos Apêndices E, F, G e H, em que o coeficiente angular não seja zero, considerando

95% de confiança. Não é encontrado na ANVISA restrições quanto o valor para o R^2 . Logo após o Teste F foi realizado para avaliar se as variâncias da regressão são estatisticamente iguais ou diferentes. Em seguida, aplicou-se o teste t de Student ($\alpha = 0,05$) descrito por Andrade e Estévez-Pérez (2014) para avaliar o efeito da matriz pela comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração obtidas pela adição de padrão em uma amostra de referência do radiofármaco (com matriz) e o padrão (sem matriz), ambos sem radiomarcagem. Nos resultados, encontrados no Apêndice I, pode-se perceber que $F_{cal} (20,0937)$

$> F_{tab} (2,2719)$, logo rejeita-se que a variância dos dados seja igual, com 95% de confiança. No teste t constata-se que $t_{cal} (0,0826) < t_{tab} (1,9666)$ (bicaudal), portanto não há indício da diferença entre os coeficientes angulares, com 95% de confiança e aceita-se a hipótese nula. É possível concluir que não há efeito matriz e há paralelismo das retas. Os componentes da solução matriz não interferem na quantificação do analito de interesse PSMA-1007.

5.2.2 Linearidade

Em um método analítico, a linearidade não pode ser analisada somente pelo gráfico dos resultados de resposta em função da concentração do analito, isso porque os desvios são difíceis de serem detectados visualmente. Antes delinear a regressão linear, é necessário verificar a ausência de valores discrepantes, do inglês *outliers*, para cada nível de concentração e a homoscedasticidade, ou seja, a igualdade das variâncias dos dados (INMETRO, 2020).

A ausência de *outliers* pode ser verificada pelo teste de Grubbs (ISO 5725-3,1994 e ISO 5725-2, 1994) ou com base nos resíduos padronizados Jackknife (DE SOUZA; JUNQUEIRA, 2005) e a homoscedasticidade, isto é, homogeneidade da variância dos resíduos pelos testes de Cochran (ISO 5725-3:1994), de Levene (DE SOUZA; JUNQUEIRA, 2005) ou de Brown-Forsythe (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

A investigação de *outliers* foi realizada pelo teste de resíduos padronizados Jackknife, que é uma técnica estatística utilizada para estimar a variância e a tendência de um estimador qualquer, cujos dados encontrados no Apêndice A. Nenhum J_{ei} da replicata foi maior que o $J_{crítico} (2,13)$, logo conclui-se que não houve a presença de *outlier*, sugerindo, portanto, que todos os dados

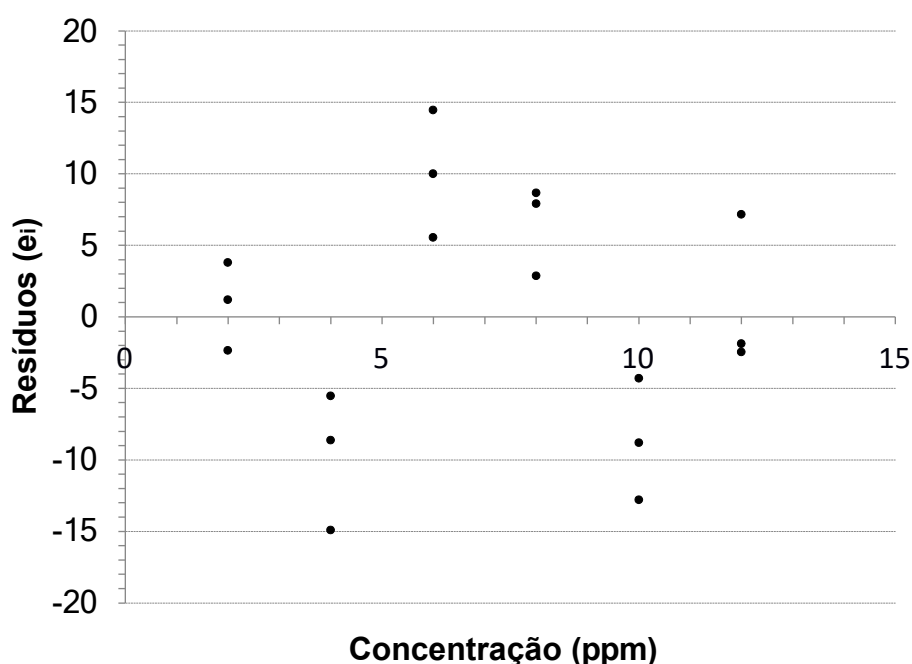
são provenientes da mesma população e aceita-se a hipótese nula (H_0 : Todos os valores de dados são provenientes da mesma população) (BELSLEY, KUH & WELSCH, 2005).

Para verificar sua adequação da linearidade, o cálculo de resíduos entre os valores medidos e os valores calculados a partir da equação de regressão é feito. Os resíduos devem ser representados graficamente, observado se há comportamento aleatório. Caso haja alguma tendência no gráfico de resíduo, pode ter indício de que o modelo linear seja inadequado (INMETRO, 2020).

Caso os desvios-padrão (DP) de repetibilidade da resposta instrumental em cada nível de concentração da curva de calibração não sejam estatisticamente iguais, sugerindo heteroscedasticidade, os dados da calibração devem ser tratados pelo método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP). No caso de homoscedasticidade podem ser usados ambos os métodos dos mínimos quadrados: MMQP ou MMQO (MILLER; MILLER, 2018).

O gráfico de dispersão dos resíduos bem como a representação gráfica das respostas em função da concentração do analito com os dados da equação da reta estão mostrados nas Figuras 24 e 25 respectivamente.

Figura 24 - Gráfico de dispersão dos resíduos.

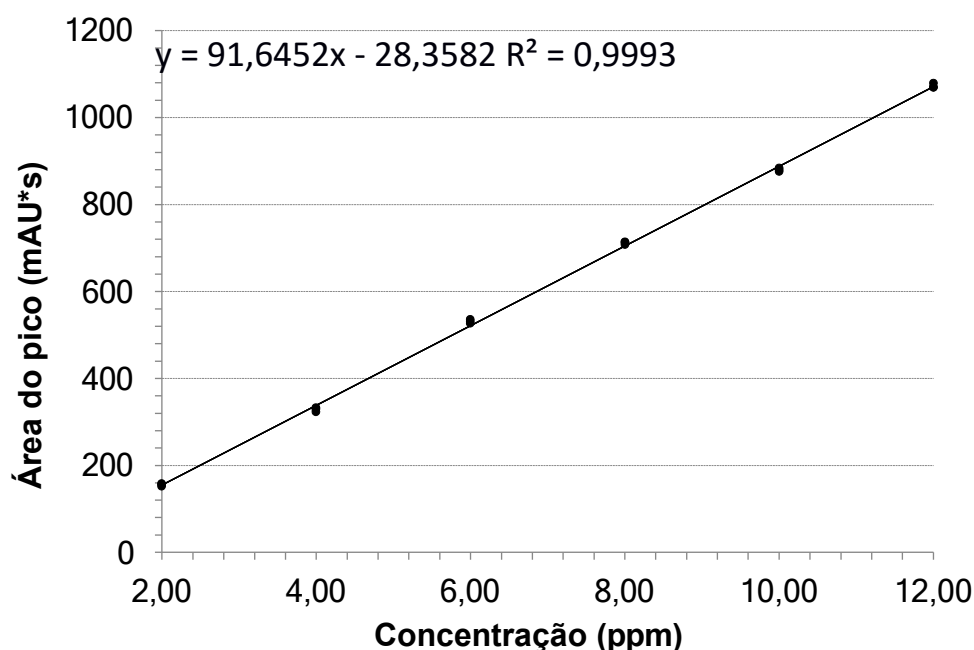


Nota-se que a adequação do modelo fica evidente no gráfico de resíduos, que flutuam aleatoriamente em torno do valor zero, apresentando um aspecto

homoscedástico para a distribuição. A inexistência de uma curvatura ou de formação de cones corrobora com a adequação, visto que o aparecimento desses fatores indicaria uma tendência na dispersão dos dados (TAVERNIERS, DE LOOSE & VAN BOCKSTAELE, 2004).

A homoscedasticidade foi comprovada por meio dos testes de Levene pois o t_L (0,5030) < $t_{\text{crítico}}$ (2,1199) (LEVENE, 1960; BROWN & FORSYTHE, 1974), como apresentado no Apêndice B. Portanto aceita-se a hipótese nula (H_0) que afirma que não há diferença estatística significativa entre as variâncias, garantido, dessa forma, a adequação do método dos mínimos quadrados ordinários para a realização da regressão linear.

Figura 25 - Gráfico área *versus* concentração do analito.



Ao analisar a curva de concentração, pode-se perceber que os pontos dispostos têm relação linear aparente. A partir da análise de regressão linear obteve-se a equação da reta apresentada a acima, cujos dados são apresentados no Apêndice C.

O coeficiente de correlação de Pearson (R) está acima de 0,990, indicando que há um alto grau de relação entre as variáveis quantitativas e atendendo ao critério estabelecido no § 3º do Art. 27 da RDC nº 166/2017. O coeficiente de determinação (R^2) assinala quanto a linha de regressão se ajustou aos dados, medindo o quanto a variação da resposta foi explicada pela variável

da concentração. O R^2 obtido foi 0,9993, o que assegura que conhecendo x é possível prever 99,93% da variação de y , portanto, o modelo proposto é significativo. A variação explicada (R^2) (99,93%) foi bem próxima a % máxima de variação explicável (99,99%)

O teste de Análise de Variância (ANOVA), disponibilizado no Apêndice D, foi utilizado para avaliação dos coeficientes linear e angular. O teste F , também conhecido como *F-Snedecor*, (SNEDECOR, 1956) foi realizado para comprovação da significância de regressão. É possível confirmar a obtenção de um modelo adequado, ou seja, a regressão é estatisticamente significativa visto que $F_{cal} (24475,52) > F_{tab} (4,49)$, rejeita-se a hipótese nula ($H_0: b=0$) e assume-se que y efetivamente varia em função de x e que o método pode ser considerado linear. Evidentemente o valor de F_{cal} é bem maior que o valor do F_{tab} , mais de 10 vezes, sendo consideravelmente acima do valor indicado para considerar a regressão útil para previsão (BOX, 1987; DE SOUZA, 2005).

A falta de ajuste, que indica que o modelo não descreve bem os dados, e o erro puro, que aponta que existe uma variação aleatória em torno da reta, também foram analisados via ANOVA. Ao analisar o teste F da falta de ajuste do apêndice D percebe-se que o $F_{cal} (12,84) > F_{tab} (3,26)$ o que indicaria que o modelo linear não é correto considerando um nível de significância de 5% (cinco por cento). Porém esse dado é refutado e explicado pela soma quadrática do erro puro ao calcular o F_{cal} , uma vez que os erros experimentais foram pequenos (OTTO, 2023). Além disso, ao analisar o gráfico da Figura 25, percebe-se os pontos estão bem ajustados à reta e por esse motivo considerou-se que os dados são satisfatórios.

5.2.3 Exatidão e precisão

Leituras em triplicatas foram feitas para soluções de PSMA-1007 sem radiomarcagem de concentração 2, 7 e 12ppm, preparadas de maneira independente, para rastreamento da área.

Tabela 3 - Resultados obtidos com as injeções de padrões de concentração 2ppm, 7ppm e 12ppm de PSMA-1007 para avaliação da exatidão e precisão.

Concentração teórica (ppm)		Área (mAU*s)	Concentração medida (ppm)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DP	DPR (%)
2	A	163,9358	2,01	100,35	107,42	0,12	5,78
	B	180,8687	2,20	109,94			
	C	184,4549	2,24	111,98			
7	A	619,8508	7,17	102,46	101,29	0,12	1,70
	B	617,6927	7,15	102,11			
	C	600,4644	6,95	99,32			
12	A	1079,036	12,37	103,12	103,34	0,11	0,90
	B	1072,985	12,31	102,54			
	C	1092,276	12,52	104,37			

A matriz da amostra não foi adicionada, visto que já foi ratificado que não há efeito matriz e o método é seletivo. A tabela 3 acima apresenta os dados obtidos com seus respectivos DP, DPR (%), recuperação (%) e recuperação média (%).

Ao analisar os dados obtidos, observa-se uma recuperação média nos 3 níveis acima de 100%. A tabela 4 abaixo apresenta critérios de aceitação para recuperação e para repetitividade sugeridos pela AOAC.

Tabela 4 - Critério de aceitação para recuperação e repetibilidade.

Analito (%)	Fração mássica	Unidade	Recuperação média (%)	DPR (%)
100	10	100%	98 — 102	1,3
10	10-1	10%	98 — 102	1,9
1	10-2	1%	97 — 103	2,7
0,1	10-3	0,1%	95 — 105	3,7
0,01	10-4	100ppm	90 — 107	5,3
0,001	10-5	10ppm	80 — 110	7,3
0,0001	10-6	1ppm	80 — 110	11
0,00001	10-7	10ppb	80 — 110	15
0,000001	10-8	10ppb	60 — 115	21
0,0000001	10-9	1ppb	40 — 120	30

Fonte: AOAC, 2016.

Com isso conclui-se que nas três concentrações avaliadas os valores de recuperação média, que variam de 101% — 107%, estão dentro da faixa sugerida entre 80% — 110%. Portanto o método analítico apresentou uma exatidão satisfatória. Ao avaliar a precisão do método, observa-se que a maior DPR (%) 5,78 na concentração de 2ppm não ultrapassa 11%, ou seja, está dentro do limite especificado na Tabela 4 da AOAC.

Para a avaliação intermediária, foram feitas análises das mesmas amostras utilizadas no teste de exatidão e precisão, no mesmo laboratório, com mais de dois dias de diferença e realizada por operadores distintos. Os dados gerados foram os da tabela 5 a seguir.

Tabela 5 - Resultados obtidos com as injeções de padrões de concentração 2ppm, 7ppm e 12ppm de PSMA-1007 para avaliação da precisão intermediária.

Concentração teórica (ppm)		Área (mAU*s)	Concentração medida (ppm)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DP	DPR (%)
2	A	154,8282	1,90	95,19	93,01	0,12	6,69
	B	159,5037	1,96	97,84			
	C	138,5708	1,72	85,98			
7	A	656,0495	7,58	108,31	108,37	0,03	0,34
	B	654,3172	7,56	108,03			
	C	658,7871	7,61	108,76			
12	A	1087,800	12,47	103,94	106,90	0,47	3,65
	B	1103,674	12,65	105,44			
	C	1166,027	13,36	111,33			

Ao avaliar a precisão intermediária método, observa-se que a maior DPR (%) 6,69 na concentração de 2ppm não ultrapassa 11%, ou seja, está dentro do limite especificado na Tabela 8 da AOAC e por isso o método é considerado preciso.

5.2.4 Limites de detecção e quantificação

A partir dos dados encontrados nos testes de linearidade, encontrados no Apêndice C, calculou-se o valor do DP do intercepto (S_b) e posteriormente os valores dos respectivos LD e LQ conforme pode ser visto na Tabela 6 abaixo:

Tabela 6 - Resultados obtidos com dados dos testes de linearidade para avaliação do LQ e LD.

Coeficiente angular (a)	Desvio do intercepto (S_b)	F	Limites (ppm)
91,6452	4,5627	3,3	LD = 0,1643
		10	LQ = 0,4979

Dentre as várias metodologias para se calcular o LD e o LQ optou-se por aquela que determina que o LD e o LQ sejam $3,3 \times S_b$ e $10 \times S_b$, respectivamente (ANVISA, 2017). A fim de verificação do valor de LD calculado, 6 injeções de uma solução de PSMA-1007 de 0,15ppm foram feitas e houve a identificação do pico característico do padrão. Com isso, estabeleceu-se o LD em 0,15ppm.

Para confirmar o valor obtido na LQ primeiramente foram injetadas 6 vezes uma solução de PSMA-1007 a 0,5ppm. O resultado não se deu por satisfatório uma vez que a recuperação se deu em torno de 45%. Com isso decidiu-se preparar e injetar uma solução de 1ppm e os dados obtidos estão na Tabela 7 a seguir.

Tabela 7 - Resultados obtidos com o teste de LQ a 1ppm.

Concentração teórica (ppm)	Área (mAU*s)	Concentração medida (ppm)	Recuperação (%)	DP	DPR (%)
1	A 85,48727	1,05	105,41	0,12	5,78
	B 89,77927	1,11	110,94		
	C 86,59882	1,07	106,84		
	D 88,06177	1,09	108,73		
	E 87,82949	1,08	108,43		
	F 81,68469	1,01	100,52		

Avaliando a exatidão e a precisão na concentração do limite de quantificação, os valores obtidos mostraram-se satisfatórios, uma vez que sua recuperação e seu desvio padrão relativo se encontra dentro da faixa estabelecida na Tabela 7. O LQ foi definido em 1ppm atende as condições de trabalho, pois a concentração está 10 vezes abaixo da utilizada na rotina (10ppm).

6 CONCLUSÕES

O método analítico desenvolvido para HPLC, utilizada para a determinação da pureza e identificação radioquímica do PSMA-1007 (^{18}F), possibilitou a identificação das impurezas C e D bem como do fármaco PSMA-1007 propriamente dito com uma resolução satisfatória. Foi utilizado o triângulo de seletividade de solventes para HPLC de modo reverso, proposto por Snyder e Kirkland (1979), para experimentos com MeOH, THF e ACN para que o objetivo de substituição do solvente orgânico fosse alcançado possibilitando a troca da ACN pelo MeOH.

O presente método apresenta vantagens em relação ao da Farmacopeia Europeia e a método atualmente empregado no CDTN, como por exemplo a substituição do solvente orgânico ACN pelo MeOH, um solvente orgânico mais barato, de mais fácil obtenção e de menor toxicidade. Outro benefício que se obteve foi a substituição do Tampão Fosfato pela adição do TFA na fase aquosa, um solvente aquoso que não causa entupimento de coluna, e a diminuição do tempo de eluição de 21 ou de 12 minutos para 10 minutos, quando comparados com os da Farmacopeia e do utilizado atualmente, respectivamente. Com isso há um menor consumo de solventes e, conseqüentemente, uma redução no resíduo químico, riscos para a saúde humana, custo do experimento, tornando-se um processo muito mais sustentável.

Obteve-se êxito durante o processo de validação analítica do método, visto que os resultados obtidos atenderam a todos os critérios preconizados pela RDC nº166/2017 da ANVISA. No ensaio de seletividade do método foi possível concluir que não houve efeito matriz e há paralelismo das retas, pois $F_{\text{cal}} (20,0937) > F_{\text{tab}} (2,2719)$ e $t_{\text{cal}} (0,0826) < t_{\text{tab}} (1,9666)$. No teste de linearidade $F_{\text{cal}} (24475,52) > F_{\text{tab}} (4,49)$, logo confirmou-se que a regressão é estatisticamente significativa. O método foi considerado preciso e exato, visto que os valores de recuperação e DPR (%) se encontraram dentro da faixa preconizada pela AOAC. Os limites de detecção (0,15ppm) e de quantificação (1ppm) foram determinados mediante dados da curva desenvolvida no teste de linearidade, como coeficiente angular e desvio de intercepto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, Antônia Fádias Valentim de. **Métodos Cromatográficos**. 2019. Disponível em: <http://educapes.capes.gov.br/handle/capes/559763>. Acesso em: 04 nov. 2023.

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, 2011.

ANDRADE, J. M.; ESTÉVEZ-PÉREZ, M. G. Statistical comparison of the slopes of two regression lines: A tutorial. **Analytica chimica acta**, v. 838, p. 1-12, 2014. Elsevier BV.

ANVISA. 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, 2017.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução – RDC nº 658 de 30 de março de 2022**. Dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos, 2022a.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Radiofármacos: perguntas e respostas**. Perguntas e Respostas. 2022b. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/medicamentos/radiofarmacos/documentos-orientativos-e-guias/pr_rf_rdc_451_v27-10-22_revvgbio-1.pdf. Acesso em: 02 nov. 2023.

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

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.

AOAC International, Official methods of analysis of AOAC International, in **Guidelines for Standard Method Performance Requirements** (Appendix F). Gaithersburg: AOAC International, 2016

BARBOSA, Felipe de Galiza et al. Clinical perspectives of PSMA PET/MRI for prostate cancer. **Clinics**, v. 73, 2018.

BELSLEY, David A.; KUH, Edwin; WELSCH, Roy E. **Regression diagnostics: Identifying influential data and sources of collinearity**. John Wiley & Sons, 2005.

BOX, George EP; DRAPER, Norman R. **Empirical model-building and response surfaces**. John Wiley & Sons, 1987.

BRASIL. Biblioteca Virtual em Saúde. Ministério da Saúde. **INCA lança a Estimativa 2023 – Incidência de Câncer no Brasil**. 2023. Disponível em:

<https://bvsms.saude.gov.br/inca-lanca-a-estimativa-2023-incidencia-de-cancer-no-brasil/>. Acesso em: 19 set. 2023.

BRASIL. Anderson Vezali Montai. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Radiofármacos**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/medicamentos/radiofarmacos>. Acesso em: 25 mai. 2023.

BRASIL. Domingos Zapparoli. Fiocruz. **Radiofármacos sob ameaça**. 2021. Disponível em: <https://cee.fiocruz.br/radiofarmacos-sob-ameaca>. Acesso em: 30 mai. 2023.

BRASIL. **Lei nº 14.758**, de 19 de dezembro de 2023. 241. ed. Brasília, 20 dez. 2023. Seção 1.

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.

BROWN, Morton B.; FORSYTHE, Alan B. Robust tests for the equality of variances. **Journal of the American statistical association**, v. 69, n. 346, p. 364-367, 1974.

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**, v. 10, n. 4, p. 77, 2017.

CARDINALE, Jens et al. Development of PSMA-1007-related series of 18F-labeled glu-ureido-type PSMA inhibitors. **Journal of medicinal chemistry**, v. 63, n. 19, p. 10897-10907, 2020.

CAZZATO, Roberto Luigi et al. PET/CT-guided interventions: Indications, advantages, disadvantages and the state of the art. **Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies**, v. 27, n. 1, p. 27-32, 2018.

CECI, Francesco et al. Molecular imaging and precision medicine in prostate cancer. **PET clinics**, v. 12, n. 1, p. 83-92, 2017.

CNEN: RMB e a Produção de Radiofármacos. **RMB e a Produção de Radiofármacos**. 2015. Disponível em: <http://antigo.cnem.gov.br/radiofarmacos>. Acesso em: 25 mai. 2023.

COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto L.; BONATO, Pierina S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, SP: Editora Unicamp. Cap. 1, p. 17-22, Cap. 2, p. 52-57, Cap. 3, p. 67-68 e p. 80-85, 2006.

CUNHA, Gerald R. et al. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 92, n. 4, p. 221-236, 2004.

DE SOUZA, Scheilla VC; JUNQUEIRA, Roberto G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1-2, p. 25-35, 2005.

DCTECH. **O guia definitivo de solução de problemas em HPLC**. 2017. Disponível em: https://www.dctech.com.br/wp-content/uploads/2017/07/DCTECH-GUIA_SOLUCOES_PROBLEMAS_HPLC.pdf. Acesso em: 02 out. 2023.

EIBER, Matthias et al. Prostate-specific membrane antigen ligands for imaging and therapy. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 58, n. Supplement 2, p. 67S-76S, 2017.

ELGAZZAR, Abdelhamid H. (Ed.). **The pathophysiologic basis of nuclear medicine**. Springer Science & Business Media, 2006.

EUROPEAN PHARMAPOEIA. **PSMA-1007 (18F) INJECTION**. 10 ed. Council of Europe, 2021. p. 5725 - 5727.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5.ed. **Brasília**: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

FERLAY, Jacques et al. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. **Annals of oncology**, v. 18, n. 3, p. 581-592, 2007.

GHOSH, Arundhati; HESTON, Warren DW. Tumor target prostate specific membrane antigen (PSMA) and its regulation in prostate cancer. **Journal of cellular biochemistry**, v. 91, n. 3, p. 528-539, 2004.

GIESEL, Frederik L. et al. Biochemical recurrence of prostate cancer: initial results with [18F] PSMA-1007 PET/CT. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 59, n. 4, p. 632-635, 2018.

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**, v. 60, n. 3, p. 362-368, 2019.

GUIDELINE, ICH Harmonised Tripartite et al. Validation of analytical procedures: text and methodology. **Q2 (R1)**, v. 1, n. 20, p. 05, 2005.

GUTFILEN, Bianca et al. Radiopharmaceuticals in nuclear medicine: recent developments for SPECT and PET studies. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

HAEDICKE, Katja et al. Molecular Imaging and Molecular Imaging Technologies. **Imaging and Metabolism**, p. 3-27, 2018.

HOFMAN, Michael S. et al. Prostate-specific membrane antigen PET-CT in patients with high-risk prostate cancer before curative-intent surgery or radiotherapy (proPSMA): a prospective, randomised, multicentre study. **The Lancet**, v. 395, n. 10231, p. 1208-1216, 2020.

HONG, Jun-Jie et al. The value of 18F-PSMA-1007 PET/CT in identifying nonmetastatic high-risk prostate cancer. **Ejnmri Research**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2020.

INMETRO, Orientação Sobre Validação de Métodos. **Analíticos-DOQ-CGCRE-008**. Revisão 09-JUN, 2020.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Câncer de Próstata**. 2022. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-prostata>> Acesso em: 16 jun. 2023.

INCA. **Estimativa 2023 da incidência do Câncer no Brasil**. 2023. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf>. Acesso em: 28 jun. 2023.

Internacional Agency For Research on Cancer (org.). **Global cancer burden growing, amidst mounting need for services**. 2024.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 5725-2:1994(1998)** Accuracy (trueness and precision) of Measurement Methods and Results - Part 2: Basic method for the Determination of Repeatability and Reproducibility of a Standard Measurement Method. ISO. International Organization for Standardization.

ISO 5725-3:1994(2001) Accuracy (trueness and precision) of Measurement Methods and Results - Part 3: Intermediate Measures of Precision of a Standard Measurement Method.

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.

KATZSCHMANN, Ines et al. Development and validation of a GMP-compliant high-pressure liquid chromatography method for the determination of the chemical and radiochemical purity of [18F] PSMA-1007, a PET tracer for the imaging of prostate cancer. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 3, p. 188, 2021.

KELLY, James et al. Synthesis and pre-clinical evaluation of a new class of high-affinity 18 F-labeled PSMA ligands for detection of prostate cancer by PET imaging. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 44, p. 647-661, 2017.

KESCH, Claudia et al. 68Ga or 18F for prostate cancer imaging?. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 58, n. 5, p. 687-688, 2017a.

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**, v. 58, n. 11, p. 1805-1810, 2017b.

KHALIL, Magdy (Ed.). **Basic sciences of nuclear medicine**. Springer Science & Business Media, 2010.

KUTEN, Jonathan et al. Head-to-head comparison of 68Ga-PSMA-11 with 18F-PSMA-1007 PET/CT in staging prostate cancer using histopathology and immunohistochemical analysis as a reference standard. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 61, n. 4, p. 527-532, 2020.

LANÇAS, Fernando M. Como economizar (ou eliminar o uso de) acetonitrila em tempos de “crise”. **Scientia chromatographica**, v. 1, n. 1, p. 51-60, 2009.

LAPIDUS, Rena G. et al. Prostate-specific membrane antigen (PSMA) enzyme activity is elevated in prostate cancer cells. **The Prostate**, v. 45, n. 4, p. 350-354, 2000.

LEVENE, Howard et al. Contributions to probability and statistics. **Essays in honor of Harold Hotelling**, v. 278, p. 292, 1960.

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

LOVELAND, Walter D.; MORRISSEY, David J.; SEABORG, Glenn T. **Modern nuclear chemistry**. John Wiley & Sons, 2017.

MAISTO, Costantina et al. On site production of [18 F] PSMA-1007 using different [18 F] fluoride activities: Practical, technical and economical impact. **EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry**, v. 6, p. 1-10, 2021.

MESHCHERIAKOVA, N. A. et al. 18F-PSMA-1007 and 18F-fluorocholine PET/CT in prostate cancer progression diagnostics. First comparative experience. **Cancer Urology**, v. 15, n. 3, p. 70-76, 2019.

MILLER, James; MILLER, Jane C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. Pearson education, 2018.

MILLER, Philip W. et al. Synthesis of 11C, 18F, 15O, and 13N radiolabels for positron emission tomography. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, n. 47, p. 8998-9033, 2008.

MODUM TECH. **Problemas na fase móvel: vilão nas análises de HPLC/UHPLC**. 2022. Disponível em: <https://modumtech.com.br/problemas-fase-movel-analises-hplc-uhplc/>. Acesso em: 02 out. 2023.

National Center for Biotechnology Information. **PubChem Compound Summary for CID 6342**, Acetonitrile. 2023.

OH, So Won; CHEON, Gi Jeong. Prostate-specific membrane antigen PET imaging in prostate cancer: opportunities and challenges. **Korean journal of radiology**, v. 19, n. 5, p. 819-831, 2018.

OKARVI, S. M. Recent developments of prostate-specific membrane antigen (PSMA)-specific radiopharmaceuticals for precise imaging and therapy of prostate cancer: an overview. **Clinical and Translational Imaging**, v. 7, n. 3, p. 189-208, 2019.

OLIVEIRA, Amanda de Paula. **Síntese, desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para o controle de qualidade do radiofármaco 18F PSMA – 1007**. 2022. 118 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2022.

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

OTTO, Matthias. **Chemometrics: statistics and computer application in analytical chemistry**. John Wiley & Sons, 2023.

PATCHING, Simon G. Roles of facilitative glucose transporter GLUT1 in [18F] FDG positron emission tomography (PET) imaging of human diseases. **J Diagn Imaging Ther**, v. 2, n. 1, p. 30-102, 2015.

POPE, Carey N.; LIU, Jing (Ed.). **An Introduction to Interdisciplinary Toxicology: From Molecules to Man**. Academic Press, 2020.

RADIOFARMÁCIA: Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo. São Paulo: **Departamento de Apoio Técnico e Educação Permanente Comissão Assessora de Radiofarmácia**. 48 p, 2019.

RAHBAR, Kambiz et al. Diagnostic performance of 18 F-PSMA-1007 PET/CT in patients with biochemical recurrent prostate cancer. **European journal of nuclear medicine and molecular imaging**, v. 45, p. 2055-2061, 2018.

RAUSCHER, Isabel et al. Matched-pair comparison of 68Ga-PSMA-11 PET/CT and 18F-PSMA-1007 PET/CT: frequency of pitfalls and detection efficacy in biochemical recurrence after radical prostatectomy. **Journal of nuclear medicine**, v. 61, n. 1, p. 51-57, 2020.

ROBILOTTA, Cecil Chow. A tomografia por emissão de pósitrons: uma nova modalidade na medicina nuclear brasileira. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 20, p. 134-142, 2006.

ROWE, S. P. et al. PET imaging of prostate-specific membrane antigen in prostate cancer: current state of the art and future challenges. **Prostate cancer and prostatic diseases**, v. 19, n. 3, p. 223-230, 2016.

SACHPEKIDIS, Christos et al. 18 F-PSMA-1007 multiparametric, dynamic PET/CT in biochemical relapse and progression of prostate cancer. **European journal of nuclear medicine and molecular imaging**, v. 47, p. 592-602, 2020.

SAHA, Gopal B.; SAHA, Gopal B. **Fundamentals of nuclear pharmacy**. New York: Springer, 2010.

SAHA, Ratul et al. Microbial siderophores: a mini review. **Journal of basic microbiology**, v. 53, n. 4, p. 303-317, 2013.

SANTOS, Carolina Silva Ferreira dos. **Estudos de adequação da radiomarcagem do PSMA-1007 com flúor-18 - validação da metodologia analítica e avaliação pré-clínica no diagnóstico de câncer de próstata**. 2022.

189 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia Nuclear, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

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

SBOC - SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA CLÍNICA. Próstata: Doença Avançada. In: **Diretrizes de tratamentos oncológicos recomendados pela Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica**, 2021a.

SBOC - SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA CLÍNICA. Próstata: Doença Localizada. In: **Diretrizes de tratamentos oncológicos recomendados pela Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica**, 2021b.

SIGMA-ALDRICH. **FICHA DE INFORMAÇÃO DE SEGURANÇA DE PRODUTO QUÍMICO ACETONITRILA GRAU HPLC**. Brasil, 2020. 16 p.

SNEDECOR, George W. **Statistical methods: applied to experiments in agriculture and biology**. The Iowa state college press, 1956.

SNYDER, Lloyd R.; KIRKLAND, Joseph J. **Introduction to modern liquid chromatography**. John Wiley & Sons, 1979.

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**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

TAUHATA, Luiz et al. **Radioproteção e dosimetria: fundamentos**. CBPF, 2003.

TONON, Thiarles Cristian Aparecido; SCHOFFEN, João Paulo Ferreira. Câncer de próstata: uma revisão da literatura. **Saúde e Pesquisa**, v. 2, n. 3, 2009.

VALDERRAMA, Patrícia; BRAGA, Jez WB; POPPI, Ronei J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, v. 32, p. 1278-1287, 2009.

VITAL, K. D. et al. Radiofármacos e suas aplicações. **Brazilian Journal of Health and Pharmacy**, v. 1, n. 2, p. 69-79, 2019.

VIDEIRA, Heber Simões et al. O cenário mundial de radiofármacos emissores de pósitrons para diagnóstico e estadiamento de câncer de próstata em medicina nuclear. **Brazilian Journal of Radiation Sciences**, v. 8, n. 1, 2020.

VITHA, Mark F. **Chromatography: principles and instrumentation**. John Wiley & Sons, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer Control: Knowledge Into Action: WHO Guide for Effective Programmes. Policy and Advocacy. Module 6**. World Health Organization, 2008.

WITKOWSKA-PATENA, Ewa et al. Diagnostic performance of 18F-PSMA-1007 PET/CT in biochemically relapsed patients with prostate cancer with PSA levels $\leq$ 2.0 ng/ml. **Prostate cancer and prostatic diseases**, v. 23, n. 2, p. 343-348, 2020.

ZHOU, Xing et al. Intra-individual comparison of 18F-PSMA-1007 and 18F-FDG PET/CT in the evaluation of patients with prostate cancer. **Frontiers in oncology**, v. 10, p. 585213, 2021.

ZIESSMAN, Harvey A.; O'MALLEY, Janis P.; THRALL, James H. **Medicina nuclear**. Elsevier Brasil, 2014.

APÊNDICES

Apêndice A — Resultado do teste do resíduo padronizado Jackknife para a curva que não incluiu a matriz de amostra.

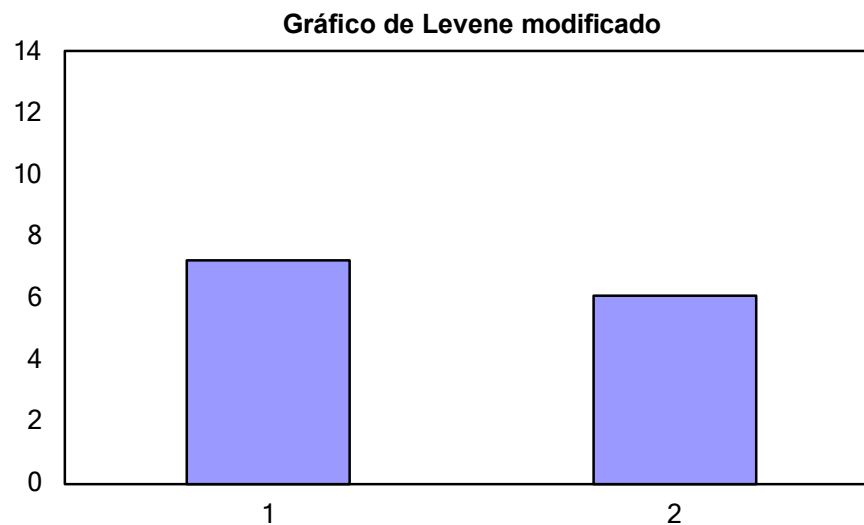
Níveis	x	y	e_i	h_i	r_i	J_{ei}
1	2,0000	156,1143	1,1820	0,1746	0,1533	0,1485
	2,0000	158,7224	3,7901	0,1746	0,4914	0,4795
	2,0000	152,5964	-2,3359	0,1746	-0,3029	0,2941
2	4,0000	332,7011	-5,5217	0,0984	-0,6850	0,6732
	4,0000	329,6103	-8,6125	0,0984	-1,0685	1,0736
	4,0000	323,3340	-14,8888	0,0984	-1,8471	2,0164
3	6,0000	535,9639	14,4507	0,0603	1,7561	1,8924
	6,0000	531,5234	10,0102	0,0603	1,2165	1,2364
	6,0000	527,0445	5,5313	0,0603	0,6722	0,6602
4	8,0000	712,7108	7,9071	0,0603	0,9609	0,9584
	8,0000	713,4557	8,6520	0,0603	1,0514	1,0551
	8,0000	707,6552	2,8515	0,0603	0,3465	0,3368
5	10,0000	879,2896	-8,8045	0,0984	-1,0923	1,0994
	10,0000	875,3037	-12,7904	0,0984	-1,5868	1,6738
	10,0000	883,8019	-4,2922	0,0984	-0,5325	0,5202
6	12,0000	1069,5250	-1,8596	0,1746	-0,2411	0,2339
	12,0000	1078,5520	7,1674	0,1746	0,9293	0,9251
	12,0000	1068,9480	-2,4366	0,1746	-0,3159	0,3069

Se $J_{ei} > J_{\text{crítico}}$ a replicata é considerada um valor aberrante (outlier)

$J_{\text{crítico}} = 2,13$

Apêndice B — Teste Levene modificado para a curva que não incluiu a matriz de amostra.

e_{1j}	d_1	e_{2j}	d_2	Estatística	Grupo k=1	Grupo k=2
1,18	0,00	7,91	9,77	n_k	9	9
3,79	2,61	8,65	10,51	e_k (mediana)	1,18	-1,86
-2,34	3,52	2,85	4,71	d_k (média)	7,2	6,1
-5,52	6,70	-8,80	6,94	SQD_k	219,7	148,6
-8,61	9,79	-12,79	10,93	s^2_p	23,0	
-14,89	16,07	-4,29	2,43	t_L	0,5030	
14,45	13,27	-1,86	0,00	$t_{crítico}$	2,1199	
10,01	8,83	7,17	9,03	p	0,6218	
5,53	4,35	-2,44	0,58	Conclusão :	Há homocedasticidade	



Apêndice C — Dados brutos para ajuste do modelo linear - curva não inclui a matriz de amostra.

Níveis	x	y	$(\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$(\hat{y}_i - \bar{y}_i)^4$	$(y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	$(y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$(x_i - \bar{x})^2$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})$
1	2,000	156,1143	209971,2	0,8	1,4	0,1	25,0	208889,4	2285,2
	2,000	158,7224	209971,2	0,8	14,4	8,5	25,0	206512,1	2272,2
	2,000	152,5964	209971,2	0,8	5,5	10,3	25,0	212117,4	2302,8
2	4,000	332,7011	75589,6	93,6	30,5	17,2	9,0	78656,3	841,4
	4,000	329,6103	75589,6	93,6	74,2	1,1	9,0	80399,6	850,6
	4,000	323,3340	75589,6	93,6	221,7	27,2	9,0	83998,2	869,5
3	6,000	535,964	8398,8	99,9	208,8	19,8	1,0	5959,0	77,2
	6,000	531,523	8398,8	99,9	100,2	0,0	1,0	6664,3	81,6
	6,000	527,045	8398,8	99,9	30,6	19,9	1,0	7415,6	86,1
4	8,000	712,711	8398,8	41,9	62,5	2,1	1,0	9910,7	99,6
	8,000	713,456	8398,8	41,9	74,9	4,8	1,0	10059,5	100,3
	8,000	707,655	8398,8	41,9	8,1	13,1	1,0	8929,6	94,5
5	10,000	879,290	75589,6	74,5	77,5	0,0	9,0	70825,8	798,4
	10,000	875,304	75589,6	74,5	163,6	17,3	9,0	68720,1	786,4
	10,000	883,802	75589,6	74,5	18,4	18,8	9,0	73247,9	811,9
6	12,000	1069,525	209971,2	0,9	3,5	7,9	25,0	208270,4	2281,8
	12,000	1078,552	209971,2	0,9	51,4	38,6	25,0	216591,2	2327,0
	12,000	1068,9480	209971,2	0,9	5,9	11,5	25,0	207744,1	2278,9
Soma	126	11036,8522	1763758,20	934,66	1152,99	218,34	210,00	1764911,19	19245,50
Simbolo	$\sum x$	$\sum y$	SQ_R	SQ_{faj}	SQ_r	SQ_{ep}	S_{xx}	S_{yy}	S_{xy}

p	Quantidade de parâmetros ajustados	2
n	Quantidade total de replicatas	18
m	Quantidade de níveis da curva	6

LD = 0,1643ppm

LQ = 0,4979ppm

$$y = ax + b \text{ (MMQO)}$$

$x_{\text{médio}} = 7,0000$

$y_{\text{médio}} = 613,1584528$

$a = 91,6452$

$s_a = 0,5858$

$b = -28,3582$

$s_b = 4,5627$

$R = 0,9997$

$S = 8,4889$

Apêndice D — Análise de variância (ANOVA) para a curva que não incluiu a matriz de amostra.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	F _{cal}	F _{tabl}	p
Regressão	1	1763758,20	1763758,20	24475,52	4,49	0,0000
Residual	16	1152,99	72,06			
Falta de ajuste	4	934,66	233,66	12,84	3,26	0,0003
Erro puro	12	218,34	18,19			
Total	17	1764911,19				
% de variação explicada (R ²):			99,93			
% máxima de variação explicável:			99,99			

Conclusão: A regressão é significativa

Apêndice E — Resultado do teste do resíduo padronizado Jackknife para a curva que incluiu a matriz de amostra.

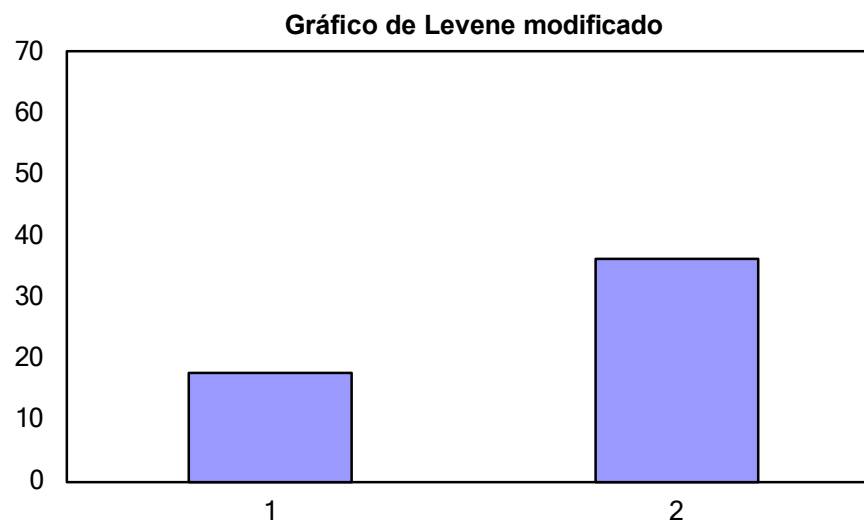
Níveis	x	y	e_i	h_i	r_i	J_{ei}
1	2,0000	371,4215	-27,0180	0,1746	-0,7815	0,7716
	2,0000	419,4634	21,0239	0,1746	0,6081	0,5958
	2,0000	398,4860	0,0465	0,1746	0,0013	0,0013
2	4,0000	580,9026	-2,3460	0,0984	-0,0649	0,0629
	4,0000	590,0786	6,8300	0,0984	0,1890	0,1832
	4,0000	555,1924	-28,0562	0,0984	-0,7765	0,7664
3	6,0000	809,8821	41,8244	0,0603	1,1339	1,1448
	6,0000	738,2553	-29,8024	0,0603	-0,8080	0,7988
	6,0000	763,2352	-4,8225	0,0603	-0,1307	0,1267
4	8,0000	952,4823	-0,3844	0,0603	-0,0104	0,0101
	8,0000	914,8841	-37,9826	0,0603	-1,0297	1,0318
	8,0000	1030,6550	77,7883	0,0603	2,1089	2,4030
5	10,0000	1106,7410	-30,9348	0,0984	-0,8562	0,8487
	10,0000	1206,7830	69,1072	0,0984	1,9127	2,1087
	10,0000	1123,0890	-14,5868	0,0984	-0,4037	0,3929
6	12,0000	1335,3190	12,8341	0,1746	0,3712	0,3610
	12,0000	1254,1410	-68,3439	0,1746	-1,9770	2,2019
	12,0000	1337,3080	14,8231	0,1746	0,4288	0,4176

Se $J_{ei} > J_{crítico}$ a replicata é considerada um valor aberrante (outlier)

$J_{crítico} = 2,13$

Apêndice F — Teste Levene modificado para a curva que incluiu a matriz de amostra.

e_{1j}	d_1	e_{2j}	d_2	Estatística	Grupo k=1	Grupo k=2
-27,02	24,67	-0,38	0,00	n_k	9	9
21,02	23,37	-37,98	37,60	e_k (mediana)	-2,35	-0,38
0,05	2,39	77,79	78,17	d_k (média)	17,7	36,3
-2,35	0,00	-30,93	30,55	SQD_k	1792,8	6675,7
6,83	9,18	69,11	69,49	s_p^2	529,3	
-28,06	25,71	-14,59	14,20	t_L	1,7107	
41,82	44,17	12,83	13,22	$t_{crítico}$	2,1199	
-29,80	27,46	-68,34	67,96	p	0,1064	
-4,82	2,48	14,82	15,21	Conclusão :	Há homocedasticidade	



Apêndice G — Dados brutos para ajuste do modelo linear - curva inclui a matriz de amostra.

Níveis	x	y	$(\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$(\bar{y}_i - \bar{y})^2$	$((x_i - \bar{x})^2$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x})^2$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x}).(y_i - \bar{y})$
1	2,000	371,4215	213465,0	3,9	730,0	626,8	25,0	239160,8	2445,2
	2,000	419,4634	213465,0	3,9	442,0	529,3	25,0	194479,9	2205,0
	2,000	398,4860	213465,0	3,9	0,0	4,1	25,0	213422,0	2309,9
2	4,000	580,9026	76847,4	61,7	5,5	30,4	9,0	78153,6	838,7
	4,000	590,0786	76847,4	61,7	46,6	215,7	9,0	73107,3	811,2
	4,000	555,1924	76847,4	61,7	787,1	408,0	9,0	93189,6	915,8
3	6,000	809,8821	8538,6	5,8	1749,3	1554,3	1,0	2558,3	50,6
	6,000	738,2553	8538,6	5,8	888,2	1037,0	1,0	14934,5	122,2
	6,000	763,2352	8538,6	5,8	23,3	52,2	1,0	9453,1	97,2
4	8,000	952,4823	8538,6	172,7	0,1	182,9	1,0	8467,7	92,0
	8,000	914,8841	8538,6	172,7	1442,7	2613,6	1,0	2961,7	54,4
	8,000	1030,6550	8538,6	172,7	6051,0	4179,3	1,0	28965,6	170,2
5	10,000	1106,7410	76847,4	61,8	957,0	1505,2	9,0	60653,3	738,8
	10,000	1206,7830	76847,4	61,8	4775,8	3751,0	9,0	119938,1	1039,0
	10,000	1123,0890	76847,4	61,8	212,8	503,9	9,0	68972,8	787,9
6	12,000	1335,3190	213465,0	183,9	164,7	696,8	25,0	225489,0	2374,3
	12,000	1254,1410	213465,0	183,9	4670,9	3001,0	25,0	154983,0	1968,4
	12,000	1337,3080	213465,0	183,9	219,7	805,7	25,0	227381,9	2384,2
Soma	126,00	15488,32	1793105,63	1469,52	23166,71	21697,19	210,00	1816272,34	19404,95
Simbolo	$\sum x$	$\sum y$	SQ_R	SQ_{faj}	SQ_r	SQ_{ep}	S_{xx}	S_{yy}	S_{xy}

p	Quantidade de parâmetros ajustados	2
n	Quantidade total de replicatas	18
m	Quantidade de níveis da curva	6

Concentração do analito na amostra utilizada

4,6238 % m/v

$$y = ax + b \text{ (MMQO)}$$

$$x_{\text{médio}} = 7,0000$$

$$y_{\text{médio}} = 860,4621944$$

$$a = 92,4045$$

$$s_a = 2,6258$$

$$b = 213,6304$$

$$s_b = 20,4521$$

$$R = 0,9936$$

$$S = 38,0515$$

Apêndice H — Análise de variância (ANOVA) para a curva que incluiu a matriz de amostra.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	F _{cal}	F _{tabl}	p
Regressão	1	1793105,63	1793105,63	1238,40	4,49	0,0000
Residual	16	23166,71	1447,92			
Falta de ajuste	4	1469,52	367,38	0,20	3,26	0,9318
Erro puro	12	21697,19	1808,10			
Total	17	1816272,34				
% de variação explicada (R ²):			98,72			
% máxima de variação explicável:			98,81			

Conclusão: A regressão é significativa
O modelo linear simples é correto

Apêndice I — Resultado do teste F (Fischer-Snedecor) e test t de Student para avaliação da seletividade.

Curva analítica	Inclinação (a)	Desvio-padrão (S)	F _{cal}	F _{tab}	t _{cal}	t _{tab}	Conclusão
Sem matriz	91,6452	8,4889	20,0927	2,2719	0,0826	1,9666	Não há efeito de matriz
Com matriz	92,4045	38,0515					