

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

FREDERICO GUEVARA WERLANG

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA O  
CONTROLE DE QUALIDADE DO RADIOFÁRMACO PSMA - 1007 (18F) PARA UTILIZAÇÃO  
EM PET/CT**

Porto Alegre

2020

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul

FREDERICO GUEVARA WERLANG

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA  
O CONTROLE DE QUALIDADE DO RADIOFÁRMACO PSMA - 1007 (18F) PARA  
UTILIZAÇÃO EM PET/CT**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Farmacêutica da Escola de Ciências da Saúde e da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina M. Moriguchi Jeckel

**Porto Alegre  
2020**

## Ficha Catalográfica

W489d Werlang, Frederico Guevara

Desenvolvimento e Validação de Metodologias Analíticas para o Controle de Qualidade do Radiofármaco Psma-1007 (18F) para utilização em Pet/Ct / Frederico Guevara Werlang . – 2020.

72 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Farmacêutica, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina M Moriguchi Jeckel.

1. PSMA-1007 (18F). 2. Radiofármacos. 3. Controle de Qualidade. 4. Validação. 5. Câncer de próstata. I. Jeckel, Cristina M Moriguchi. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051

A minha mãe Blanca e a todos os meus familiares.  
A minha esposa Aline e as minhas filhas Helena e Luíza.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Farmacêutica por todos os ensinamentos.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina M. Moriguchi Jeckel pelo incentivo, paciência e por todo o conhecimento transmitido ao longo desses anos.

À toda equipe do Inscer, em especial, aos colegas do Centro de Produção de Radiofármacos.

Ao Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul pelo incentivo e pela possibilidade de realização de todo o trabalho.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo”.

*(José de Alencar)*

## RESUMO

Os radiofármacos são indispensáveis para auxiliar o diagnóstico e o manejo terapêutico dos pacientes acometidos por câncer de próstata. A medicina nuclear (MN) utiliza esses medicamentos em exames de imagem como a tomografia por emissão de pósitrons (PET/CT) e a tomografia por emissão de fóton único (SPECT) para a visualização de imagens morfofuncionais capazes de avaliar e quantificar processos patológicos de maneira não invasiva. Um radiofármaco de grande importância nesse manejo terapêutico é o *Prostate Specific Membrane Antigen – 1007* (18F) (PSMA-1007 (18F)) que é capaz de identificar lesões muito pequenas e tumores metastáticos. O radioisótopo – flúor-18 (18F) - foi produzido por ciclotron e a síntese do referido radiofármaco foi através de uma substituição nucleofílica. Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e validação de metodologias analíticas do radiofármaco PSMA-1007 (18F), específico para uso em PET/CT. A validação de metodologias analíticas é a garantia necessária para o controle de qualidade assegurar que todas as análises são adequadamente realizadas. A pureza radioquímica foi desenvolvida e validada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com coluna C18 de 150 x 4,6 mm e 3,0 µm. Os solventes residuais monitorados são o etanol e o dimetilsulfóxido (DMSO) em corrida cromatográfica de aproximadamente 22 minutos. Todas as metodologias para o controle microbiológico estão aptas para a realização das análises, sendo o controle do processo de esterilização da produção realizado pela determinação do ponto de bolha. Um teste de estabilidade foi realizado para garantir a estabilidade do produto e a definição do seu prazo de validade de dez horas, além de garantir a ausência de radiólise no processo de envase. As análises de tempo de meia-vida e de pureza radionuclídica garantem que o radioisótopo (18F) foi adequadamente produzido.

Palavras-chave: PSMA-1007 (18F), radiofármacos, controle de qualidade, validação, câncer de próstata, diagnóstico por imagem, PET/CT

## ABSTRACT

Radiopharmaceuticals are indispensable to assist in the diagnosis and therapeutic management of patients affected by prostate cancer. Nuclear medicine (NM) uses these drugs in imaging tests such as positron emission tomography (PET/CT) and single photon emission computed tomography (SPECT) for responses to morphofunctional images that are possible to evaluate and quantify pathological processes in a non-invasive manner. A radiopharmaceutical of great importance in this treatment is prostatic specific membrane antigen (PSMA-1007 (18F)), which can identify tiny lesions and metastatic tumours. The radioisotope - 18F - was produced by a cyclotron and a sample of the referred radiopharmaceutical was through nucleophilic substitution. Thus, this work aimed at the validation of analytical methodologies for the radiopharmaceutical PSMA-1007 (18F), specific for use in PET / CT. The validation of analytical methodologies is a guarantee for quality control that all the analyzes are well performed. Radiochemical purity was developed and validated by high performance liquid chromatography (HPLC) with a C18 column of 150 x 4.6 mm and 3.0  $\mu\text{m}$ . The residual solvents monitored are ethanol and dimethyl sulfoxide (DMSO) in a chromatographic run of approximately 22 minutes. All methodologies for microbiological control are available to perform the analyzes, with the control of the production sterilization process carried out by determining the bubble point. Stability test guarantees the stability of the product and the definition of its shelf life of ten hours, in addition to ensuring the absence of radiolysis in the filling process. The half-life and radionuclide purity assay show that the radioisotope Fluor 18 (18F) was adequately used in the production.

Key-words: PSMA-1007 (18F), Radiopharmaceuticals, Quality Control, Validation, Prostate Cancer, Imaging Diagnosis, PET / CT



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Comparação entre os alvos colina, PSMA e FACBC .....	23
Figura 2: estrutura do precursor de PSMA (esquerda) e do produto PSMA-1007 (18F) .....	26
Figura 3: Ilustração do cassete utilizado para produção .....	26
Figura 4: apresentação de diagrama descritivo com o passo a passo da síntese ...	27
Figura 5: sistema gradiente .....	33
Figura 6: rampa de temperatura da análise de solventes residuais .....	34
Figura 7: esquema do cartucho da análise de endotoxinas .....	36
Figura 8: injeção de padrão de PSMA, coluna Kinetex C18 x 100 x 2,1 mm e 2,6 $\mu$ m .....	39
Figura 9: injeção de amostra de PSMA-1007 (18F) na coluna C18 Pursuit 300 x 3,9 mm e 10 $\mu$ m .....	39
Figura 10: injeção de amostra de PSMA-1007 (18F) em método fechado .....	40
Figura 11: injeção de amostra de PSMA-1007 (18F) sem diluição .....	40
Figura 12: amostra de PSMA-1007 (18F) sem a saturação do detector .....	41
Figura 13: injeções de seletividade da pureza radioquímica .....	42
Figura 14: cromatograma com tempos de retenção dos picos de interesse .....	42
Figura 15: amostra radioativa do PSMA-1007(F18) .....	43
Figura 16: Cálculos do Limite de Quantificação do Precursor de PSMA .....	43

Figura 17: Cálculos do Limite de Quantificação do PSMA frio .....	44
Figura 18: Cálculos do fator de resposta relativo .....	45
Figura 19: Resultados Linearidade do Precursor do PSMA .....	46
Figura 20: Resultados Linearidade do PSMA frio .....	47
Figura 21: avaliação de resíduos de precursor de PSMA .....	48
Figura 22: avaliação de resíduos PSMAfrio .....	48
Figura 23: Repetibilidade x Precisão Intermediária precursor .....	49
Figura 24: Repetibilidade x Precisão Intermediária PSMA frio .....	49
Figura 25: Resultados exatidão precursor PSMA .....	50
Figura 26: Resultados exatidão PSMA frio .....	50
Figura 27: Resultados da solução de adequabilidade, solução com precursor e PSMA frio .....	51
Figura 28: Variações da robustez frente à condição controle .....	52
Figura 29: Rampa de temperatura da coluna .....	53
Figura 30: Cromatograma da solução adequabilidade, etanol à esquerda e DMSO à direita .....	53
Figura 31: Cromatograma do método fechado .....	54
Figura 32: Seletividade de solventes residuais .....	55
Figura 33: solução adequabilidade .....	55
Figura 34: amostra de PSMA-1007 (18F) .....	56
Figura 35: Limite de quantificação para o etanol .....	56
Figura 36: Limite de quantificação para o DMSO .....	57

Figura 37: Resultados linearidade do etanol .....	58
Figura 38: Resultados linearidade do DMSO .....	59
Figura 39: Resultados resíduos etanol .....	59
Figura 40: Resultados resíduos DMSO .....	60
Figura 41: Repetibilidade x precisão intermediária do etanol .....	60
Figura 42: Repetibilidade x precisão intermediária DMSO .....	61
Figura 43: Resultados exatidão do etanol .....	61
Figura 44: Resultados exatidão DMSO .....	62
Figura 45: Resultados da robustez .....	62
Figura 46: Resultado da análise de especificidade .....	63
Figura 47: limite de detecção de 100 µg/mL .....	64
Figura 48: Espectroscopia gamma da amostra de PSMA-1007 (18F) .....	65
Figura 49: Resultados do teste de estabilidade .....	66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação de marcações com gálio-68 e flúor-18.....	24
Tabela 2: Parâmetros de Validação .....	29
Tabela 3: Variações percentuais da precisão e da exatidão .....	31

## LISTA DE SIGLAS

18F	Flúor-18
C18	Coluna de CLAE com fase estacionaria de octadecilsilano
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CT	Computed Tomography (Tomografia Computadorizada)
DAD	Detector de Fotodiodos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPR	Desvio Padrão Relativo
MN	Medicina Nuclear
PET	Positron Emission Tomography (Tomografia por Emissão de Póstron)
pH	Potencial Hidrogeniônico
PSA	Prostate Specific Antigen (Antígeno Prostático Específico)
PSMA	Prostate Specific Membrane Antigen (Antígeno de Membrana Específico para Próstata)
PTS	Portable Test System
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography (Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único)
TBA	Tetrabutylamônio
TFA	Trifluoroacetic acid (Ácido Trifluoroacético)
UE	Unidades Endotoxinas
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography
USP	United States Pharmacopea

## LISTA DE SÍMBOLOS

μ	Micrômetro
μL	Microlitro
mm	Milímetros
°C	Graus Celsius
pH	Potencial Hidrogeniônico
psi	Libra força por polegada quadrada

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
2.1. Objetivos Específicos .....	19
2.1.1. Da avaliação do processo produtivo.....	19
2.1.2. Dos métodos analíticos.....	19
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>20</b>
3.1. Câncer de Próstata.....	20
3.2. Medicina Nuclear (MN).....	21
3.3. PET (Tomografia por Emissão de Póstron) .....	22
3.4. PSMA – 1007 (18F) e a marcação no PET/CT.....	22
3.5. Produção do PSMA-1007 (18F) .....	25
3.6. Controle de Qualidade de Radiofármacos .....	28
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
4.1. Controle de Qualidade do PSMA-1007 (18F).....	32
4.1.1. <i>Bioburden</i> (Biocarga) .....	32
4.1.2. Identidade e Pureza Radionuclídica .....	32
4.1.3. Pureza Radioquímica.....	33
4.1.4. Pureza Química .....	34
4.1.5. Solventes Residuais .....	34
4.1.6. pH .....	35
4.1.7. Esterilidade.....	35
4.1.8. Integridade de Membrana Filtrante.....	35
4.1.9. Teor de Endotoxinas.....	36
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>38</b>
5.1. <i>Bioburden</i> .....	38
5.2. Pureza Radioquímica e Química por HPLC.....	38
5.2.1. Desenvolvimento da Metodologia .....	38
5.2.2. Validação .....	41
5.2.2.1. Seletividade .....	41
5.2.2.2. Limite de Quantificação.....	43
5.2.2.3. Linearidade.....	45
5.2.2.4. Precisão .....	48

	16
5.2.2.5. Exatidão .....	49
5.2.2.6. Robustez .....	50
<b>5.3. Solventes Residuais (Etanol e DMSO).....</b>	<b>52</b>
5.3.1. Desenvolvimento da Metodologia .....	52
5.3.2. Validação .....	54
5.3.2.1. Seletividade .....	54
5.3.2.2. Limite de Quantificação.....	56
5.3.2.3. Linearidade.....	57
5.3.2.4. Precisão .....	60
5.3.2.5. Exatidão .....	61
5.3.2.6. Robustez.....	62
<b>5.4. Pureza Química por “Spot Test”.....</b>	<b>62</b>
5.4.1. Desenvolvimento da Metodologia .....	62
5.4.2. Validação .....	63
5.4.2.1. Seletividade .....	63
5.4.2.2. Limite de Detecção .....	63
5.4.2.3. Robustez.....	64
<b>5.5. Análise de Identidade Radionuclídica .....</b>	<b>64</b>
<b>5.6. Análise de Endotoxinas e de Esterilidade.....</b>	<b>65</b>
<b>5.7. Teste de Estudo de Estabilidade .....</b>	<b>65</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>67</b>
<b>7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>68</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>69</b>



## 1. INTRODUÇÃO

O câncer caracteriza-se por um crescimento desordenado de células, as quais podem invadir órgãos ou tecidos. Quando esses crescimentos estão presentes em tecidos epiteliais são chamados de carcinomas; quando o crescimento acomete tecidos conjuntivos são chamados sarcomas (INCA, 2002).

O câncer de próstata ocorre quando há crescimento desordenado de células na sua glândula. O câncer de próstata é considerado uma doença de terceira idade, uma vez que acomete, principalmente, homens após os 65 anos de idade. Dessa forma, é mais presente em países com maior expectativa de vida (INCA, 2020).

Como o câncer de próstata é considerado um problema de saúde pública é necessário um correto diagnóstico e acompanhamento da doença para que a mesma seja tratada de maneira adequada. Dessa forma, os radiofármacos (que são substâncias químicas ligadas a um elemento radioativo o qual é reconhecido pelo organismo como similar a uma substância que será metabolizada) são fundamentais e são utilizados para a realização de exames de imagem de tomografia por emissão de pósitrons (PET/CT). Existem ainda, os radiofármacos para terapia, utilizados também no tratamento do câncer.

O exame de PET/CT (através da marcação com radiofármacos) pode identificar processos *in vivo*, bioquímicos e metabólicos que caracterizam doenças, podendo avaliar o grau de funcionalidade de órgãos e tecidos ou o tratamento de doenças sem o emprego de métodos cirúrgicos ou invasivos.

A produção de radiofármacos envolve diversos aspectos complexos, como a produção do radioisótopo por ciclotron, por reatores nucleares ou por geradores. Além disso, são necessários ambientes com classificação de salas em áreas limpas (salas com baixas concentrações de partículas viáveis e não viáveis), pessoal qualificado e análises de controle de qualidade que garantam a segurança necessária para a administração desses fármacos.

Devido à complexidade que envolve a produção de radiofármacos, existem diversas normas brasileiras e mundiais que regulam essa atividade. No Brasil, o principal órgão é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e a mesma exige que todos os métodos de análises sejam desenvolvidos e validados através de rigorosas resoluções. A validação garante que um método de análise é capaz de

cumprir o seu propósito, de forma robusta e consistente, e isso é atestado através de documentos que comprovam a sua eficiência.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar as metodologias analíticas do radiofármaco PSMA – 1007 (18F), destinado à marcação do câncer de próstata através do exame de PET/CT dentro dos padrões de qualidade exigidos pela Anvisa.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho consistiu no desenvolvimento e validação de metodologias de controle de qualidade para o radiofármaco *Prostate Specific Membrane Antigen -1007 (18F)* (PSMA – 1007 (18F)).

### 2.1. Objetivos Específicos

#### 2.1.1. Da avaliação do processo produtivo

- Determinar a carga microbiana pré-filtração.

#### 2.1.2. Dos métodos analíticos

Definir os métodos de controle de qualidade (CQ) do produto acabado que possam garantir que o radiofármaco PSMA – 1007 (18F) atenda aos critérios de qualidade.

Métodos físico-químicos:

- identidade radionuclídica;
- pureza radionuclídica;
- pureza radioquímica;
- pureza química;
- solventes residuais;
- potencial de hidrogênio (pH).

Métodos que garantem qualidade microbiológica:

- esterilidade;
- integridade da membrana filtrante;
- teor de endotoxinas bacterianas.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1. Câncer de Próstata

A próstata é uma glândula localizada na parte baixa do abdome e é responsável por produzir parte do sêmen, ou seja, ela faz parte do sistema reprodutor masculino. A próstata envolve a porção inicial da uretra e pesa, aproximadamente, 20 gramas em homens saudáveis (JÚNIOR et al.,2015).

O câncer de próstata é o segundo mais prevalente entre os homens brasileiros, apenas é superado pelo câncer de pele não melanoma. Acomete, principalmente, homens idosos, uma vez que em 75% dos casos no mundo os homens possuem 65 anos ou mais. Existem casos de progressão acelerada da doença, no entanto, de modo geral, o tumor demora cerca de 15 anos para atingir 1 cm<sup>3</sup> (INCA, 2020). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer estima que, em 2020, mais de 65 mil homens serão acometidos pela doença, sendo que, em 2017, mais de 15 mil pacientes faleceram (INCA, 2020). Em 2020 nos Estados Unidos, de acordo com a Sociedade Americana de Câncer, mais de 191 mil novos casos de câncer de próstata e aproximadamente 33 mil óbitos ocorrerão (American Cancer Society, 2020).

A doença pode se limitar apenas à próstata caso a mesma seja tratada de maneira precoce. O padrão evolutivo, no entanto, sem um tratamento nos estágios iniciais pode atingir órgãos próximos à próstata como as vesículas seminais, uretra, bexiga e até mesmo órgãos distantes como ossos, fígado e pulmões. Quando o câncer atinge esses órgãos distantes, existe um câncer metastático de próstata e não, por exemplo, um câncer ósseo (TONON et al., 2009).

Existem diversos exames que contribuem para o diagnóstico do câncer de próstata. O principal deles, ou seja, o padrão ouro é a ultrassonografia transretal com biópsia (DESCOTES, J. C., 2019). O exame de toque retal é utilizado para a identificação de possíveis lesões e para a identificação do aumento de tamanho da próstata. Este procedimento é altamente utilizado na clínica médica, no entanto, por motivos culturais, muitos pacientes não se submetem a realização desse exame (JÚNIOR et al.,2015). O antígeno prostático específico (PSA) é uma proteína produzida pela próstata e presente em concentrações baixas em homens saudáveis. É utilizada como um marcador importante, pois sinaliza uma possível lesão resultante

de câncer de próstata. Apesar de sua alta sensibilidade não é um marcador exato, uma vez que patologias como prostatite, hiperplasia benigna, trauma prostático também aumentam os seus níveis, o que dificulta o diagnóstico (JÚNIOR et al.,2015).

A ressonância magnética nuclear (RMN) é amplamente utilizada para a localização das lesões na próstata. Os guias do Comitê de Cancerologia da Associação Francesa de Urologia, por exemplo, apontam que os primeiros indícios clínicos para a realização de ressonância são níveis elevados de PSA com biópsia negativa (DESCOTES, J. C., 2019). A principal indicação do exame de PET/CT para o câncer de próstata é a sua recidiva. Isso ocorre porque mesmo após a retirada cirúrgica da próstata, os níveis de PSA podem aumentar, o que indica lesão, mas dificulta a localização da mesma (ROWE, et al., 2016). Dessa forma, o antígeno específico da membrana da próstata (PSMA), que é uma glicoproteína super expressa nesse câncer, é um alvo promissor para ser detectado pelo exame de PET/CT, quando marcado por um radioisótopo emissor de pósitrons adequado para essa finalidade.

### **3.2. Medicina Nuclear (MN)**

A MN é uma especialidade médica que utiliza elementos radioativos com a finalidade diagnóstica e terapêutica, através de métodos seguros. Esses elementos radioativos, os radiofármacos, apresentam caminhos funcionais ou metabólitos específicos dentro dos organismos, o que auxilia no diagnóstico precoce de diversos cânceres, uma vez que a funcionalidade dos órgãos é verificada (ROBILOTTA,C.C.,2006).

Dois técnicas da MN utilizam imagens funcionais, a Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único (SPECT) e a Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET). Os radiofármacos são utilizados nas duas técnicas, no entanto a principal diferença é o tipo de radioisótopo utilizado. No SPECT, utiliza-se radiação eletromagnética de espectro amplo, em geral, aquela de maior intensidade de emissão pelo radionuclídeo utilizado. No PET, utilizam-se radioisótopos emissores de pósitrons, onde o pósitron se aniquila com um elétron próximo da sua região de emissão, produzindo dois fótons de aniquilação que são emitidos simultaneamente, em direções opostas e com mesma energia. (KHALIL, et al., 2011).

### 3.3. PET (Tomografia por Emissão de Pósitron)

Os radiofármacos emissores de pósitron (ou emissores  $\beta^+$ ) são aqueles marcados com um radioisótopo de decaimento  $\beta^+$ , o qual emite de seu núcleo a partícula  $\beta^+$  e um neutrino ( $\nu$ ). A emissão  $\beta^+$  por se tratar de uma partícula de carga positiva e massa significativa, ao ser emitida perde sua energia cinética até interagir com um elétron. Este processo é chamado de aniquilação e ao ocorrer, dois fótons gama de 511 keV são emitidos em sentidos opostos na mesma direção e são detectados por dois detectores atuando em conjunto na captação coincidentes dos raios (KHALIL, 2011; MILLER et al., 2008).

O equipamento PET consiste em uma série de detectores de cintilação dispostos em forma de anel, que circundam o paciente, em repouso na maca, após a administração do radiofármaco.

O PET/CT une recursos diagnósticos da medicina nuclear (PET) com recursos da radiologia (CT), ou seja, utiliza informações metabólicas de determinada lesão e de imagens anatômicas. Essa combinação de imagens diagnósticas permite uma avaliação mais apurada de lesões que dificilmente seriam percebidas nas técnicas isoladas (HOGG, et al., 2010).

### 3.4. PSMA – 1007 (18F) e a marcação no PET/CT

O diagnóstico do câncer de próstata e o seu manejo no tratamento estão em constante evolução. A busca por marcadores que possam identificar e localizar uma lesão é fundamental para o prognóstico do tratamento dos pacientes. O PSMA (antígeno específico da membrana da próstata) é uma glicoproteína de membrana que funciona como uma glutamato carboxipeptidase/ folato hidrosale que está superexpressa no câncer de próstata. Essa proteína está relacionada ao escore de Gleason, a propensão de metástases e também a recidiva dos pacientes que foram submetidos à prostatectomia, uma vez que as metástases apresentam as mesmas células de PSMA provenientes do tumor primário de próstata (ROWE, et al., 2016).

A localização do sítio catalítico no domínio extracelular do PSMA permite o desenvolvimento de moléculas que inibem a proteína e são internalizadas para as células. Essas moléculas inibitórias podem ser radiofármacos, os quais são captados

no exame de PET/CT, localizando lesões e acompanhando o desempenho dos órgãos afetados (CECI, et al., 2017). Dentre os radiofármacos que utilizam o PSMA como alvo estão o PSMA (68Ga)/PSMA (18F), além disso existem outros radiofármacos utilizados para detecção de câncer de próstata como Colina (11C)/ Colina (18F) e Fluciclone (18F).

A importância do PSMA como alvo nos exames de imagem pode ser destacada na publicação de EVANS, et al., 2018 que compararam os radiofármacos colina, psma e fluciclovine (análogo de leucina), como pode ser visualizado na figura 1.

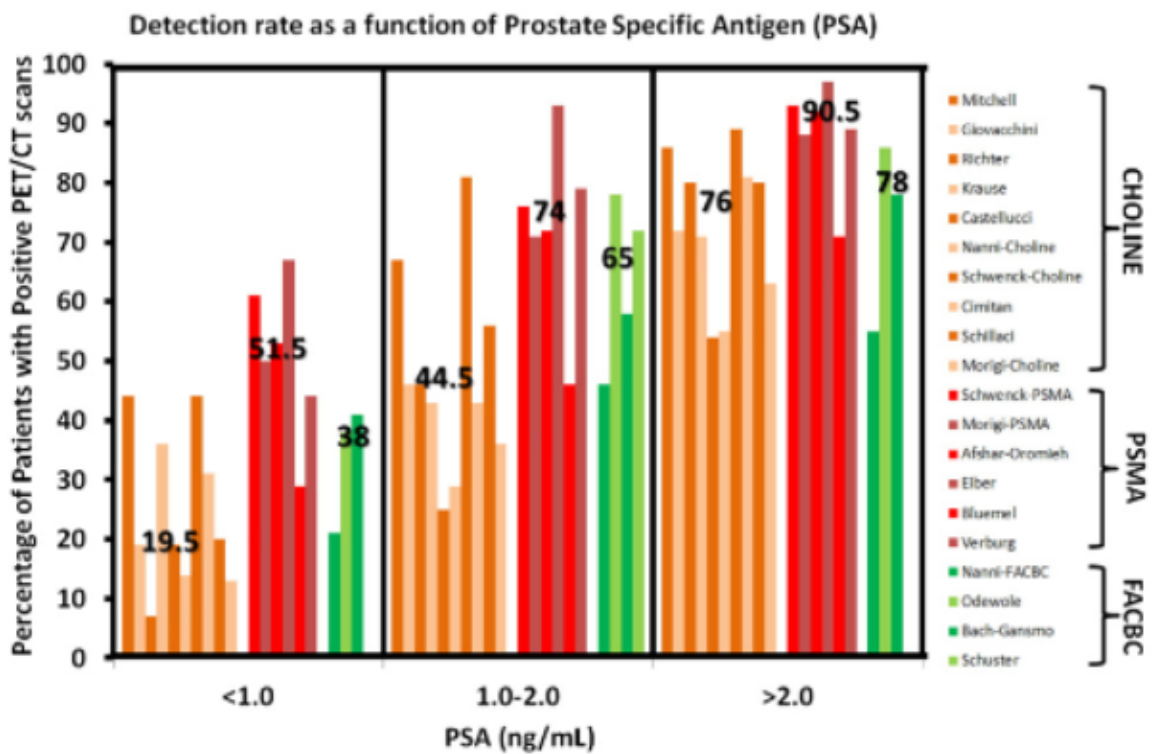


Figura 1: Comparação entre os alvos colina, PSMA e FACBC (Fonte: Evans et al., 2018)

Os dados da figura 1 indicam que para níveis de PSA < 2,0 ng/mL os radiofármacos que apresentaram resultados superiores são os que utilizam o PSMA como alvo, esses resultados ficam mais claros para níveis de PSA < 1,0 ng/mL.

Dentre os radiofármacos que utilizam o PSMA como alvo destacam-se os que utilizam marcação com gálio (provenientes de geradores de germânio) e aqueles marcados com flúor, radioisótopo que é produzido por ciclotron. Existem vantagens e desvantagens na produção dos radioisótopos produzidos por geradores e por ciclotrons. Os geradores de germânio que decaem em gálio apresentam como principal vantagem um custo reduzido em comparação com a tecnologia empregado

pelo ciclotron, ou seja, para centros com uma procura média de pacientes o gerador é uma ótima alternativa, já que é capaz de atender de 2 a 4 doses por eluição. A desvantagem do gerador está relacionada ao tempo de meia-vida de seu radioisótopo, gálio-68, que é de aproximadamente 68 minutos, o que dificulta uma produção centralizada para o atendimento de diversas clínicas médicas e, também, não atenderia um aumento de demanda de pacientes, a menos que novos geradores sejam adquiridos. Além disso, após determinadas eluições o gerador vai perdendo a sua eficiência, sendo necessária a sua reposição (KESCH, et al., 2017).

A marcação de PSMA que utiliza o radioisótopo flúor-18 apresenta como principal vantagem o tempo de meia-vida de aproximadamente 110 minutos, ou seja, é possível realizar uma produção centralizada e atender outras clínicas médicas, além de uma produção com maior concentração radioativa ser possível. Dessa forma, diversos pacientes podem ser atendidos com apenas uma produção (mais de dez pacientes podem ser atendidos por síntese). A tabela 1 apresenta as principais diferenças entre as marcações com gálio-68 e com flúor-18. Além dos aspectos citados acima, as imagens provenientes das marcações com flúor apresentam uma resolução superior e o envase é realizado em capelas blindadas com um controle de partículas (KESCH, et al., 2017).

Tabela 1: Comparação de marcações com gálio-68 e flúor-18

Parameter	<sup>68</sup> Ga	<sup>18</sup> F
Half-life	68 min (less radiation burden to relatives [complete decay within a few hours after examination]; shippable only to close satellite centers)	110 min (satellite shipping possible; delayed imaging after longer incubation time possible)
Positron energy	1.90 MeV (penetration depth of positron theoretically higher [most pronounced in lungs] but widely negligible in solid tissues using standard reconstruction algorithms and adjusted filtering)	0.65 MeV (lower radiation burden despite longer half-life; theoretically higher resolution)
Labeling	Chelator molecules (dedicated environment required, but kit formulation [one vial, room temperature] also possible)	Prosthetic group molecules (dedicated environment required [hot cells, remotely controlled radiosynthesizers])
Theranostic approach	One-molecule approach (radiolabeling with diagnostic [e.g., <sup>68</sup> Ga] and therapeutic [e.g., <sup>177</sup> Lu, <sup>225</sup> Ac, <sup>213</sup> Bi] radionuclides possible [PSMA-11 can be radiolabeled only with diagnostic radionuclide])	Tandem approach (different chemical structure of diagnostic and structurally related therapeutic tracer [e.g., PSMA-1007/PSMA-617, DCFPyI/MIP-1095])
Upfront investment and running costs	Generators (~50,000 USD/EUR, ~2 generators per year); radiosynthesizer or kit production	Cyclotron (~1,000,000–3,000,000 USD/EUR); radiosynthesizers connected to cyclotron; <sup>18</sup> O-water as target material per production run
Scalability	Defined generator capacity	Production demand well scalable to adapt requested number of examinations

Fonte: Kesch, et al., 2017



O radiofármaco PSMA-1007 (18F) foi desenvolvido na Alemanha, na Universidade de Heidelberg, sendo a patente do fármaco pertencente ao Centro Alemão de Pesquisa em Câncer, vinculada à empresa ABX Biochemical Compounds.

Em um dos primeiros estudos retrospectivos que utilizaram o PSMA-1007 (18F) foi possível observar a sua acurácia na identificação de metástases. As mesmas foram corretamente detectadas em 18 dos 19 linfonodos presentes em 8 pacientes com câncer de próstata primário, confirmados através de biópsia (GIESEL, et al., 2017).

Além do PSMA-1007 (18F), existem outros radiofármacos marcados com flúor que estão em estudo para auxiliar no diagnóstico do câncer de próstata como o DCFPyl (18F). Ambos apresentam ótimos resultados na clínica com vantagens e desvantagens. A vantagem do PSMA-1007 seria a sua excreção urinária ser reduzida após as duas primeiras horas após a sua injeção, o que permite uma análise mais apurada de lesões próximas nessa área. A excreção hepato-biliar, no entanto, prejudica a análise dessa região, o que é melhor visualizado com o DCFPyl (18F) (GIESEL, et al., 2018).

### 3.5. Produção do PSMA-1007 (18F)

O primeiro passo da síntese é a produção do radioisótopo no acelerador de partículas. É utilizada água enriquecida com oxigênio-18 para a obtenção do flúor-18 (há a perda de um próton e o ganho de um nêutron). Após o término da irradiação, uma solução com flúor-18 é enviada para o laboratório de produção.

Para a síntese do PSMA-1007 (18F) é utilizada uma molécula muito semelhante com o produto final, chamada de precursor ( $C_{54}H_{64}F_3N_9O_{18}$ ). Há a perda de um grupo amino (além de  $CH_3CO_2$ ) por uma substituição nucleofílica direta e a ligação do 18F, formando produto PSMA-1007 (18F),  $C_{49}H_{55}^{18}FN_8O_{16}$ . A figura 2 apresenta as estruturas químicas e a figura 3 apresenta uma ilustração do cassete utilizado para a síntese.

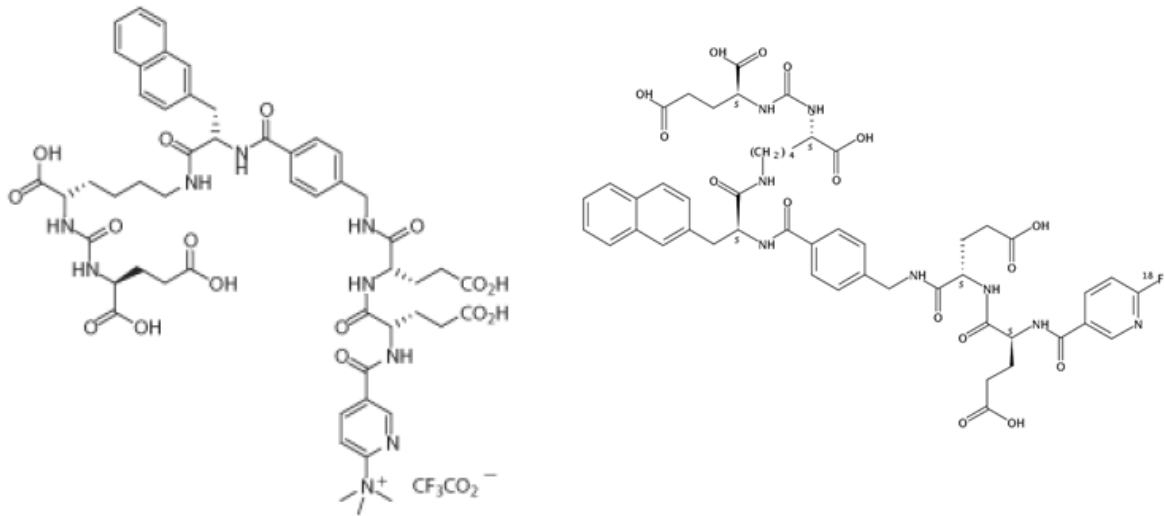


Figura 2: estrutura do precursor de PSMA (esquerda) e do produto PSMA-1007 ( $^{18}\text{F}$ ) (Fonte: Trasis, 2019)

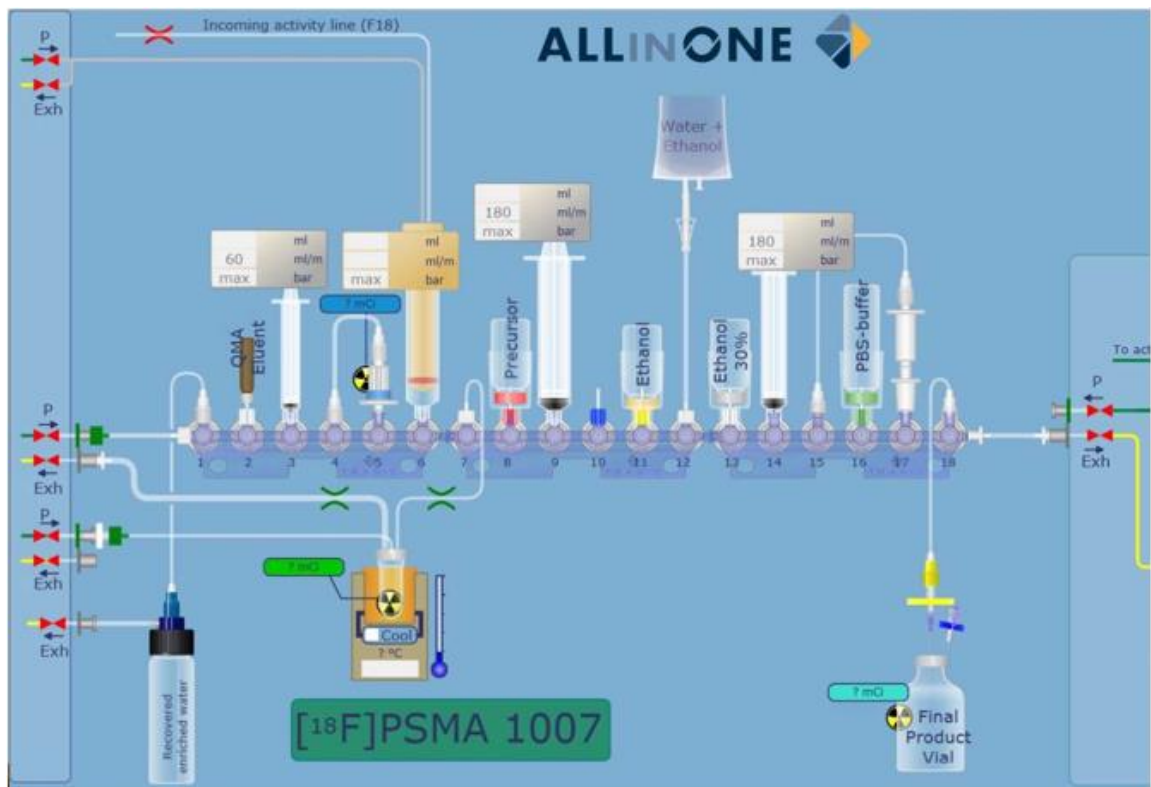


Figura 3: Ilustração do cassete utilizado para produção (Fonte: Trasis, 2019)

A figura 4 apresenta todos os passos necessários para a síntese do produto PSMA-1007 ( $^{18}\text{F}$ ).

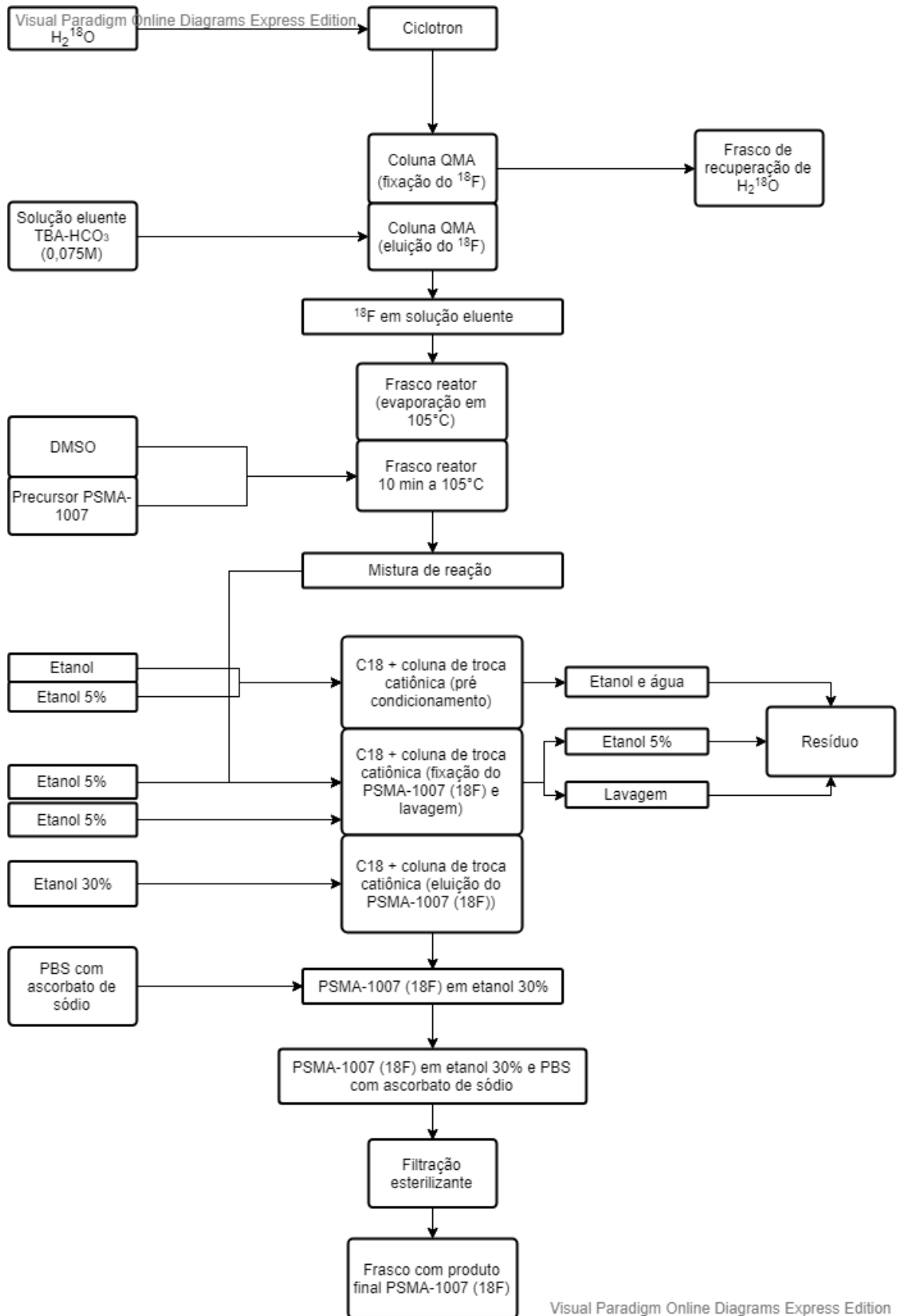


Figura 4: apresentação de diagrama descritivo com o passo a passo da síntese (Fonte: o autor, 2020)

### 3.6. Controle de Qualidade de Radiofármacos

O controle de qualidade é parte integrante das boas práticas de fabricação, sendo responsável por especificações de análises, realização das mesmas, amostragens de produtos e documentação de todas as análises. Para que os ensaios realizados atendam à qualidade requerida os métodos analíticos devem ser desenvolvidos e posteriormente validados.

Os radiofármacos, por definição, são medicamentos marcados com um traçador radioativo. Dessa forma, estes devem atender a todos os critérios estipulados para a indústria farmacêutica. Há diferentes agências que regulam a qualidade dos medicamentos produzidos, conforme o seu país de origem. No Brasil, a instituição que regula a qualidade dos medicamentos é a Anvisa através de documentos nomeados resoluções de diretoria colegiada (RDC), guias, instruções normativas e resoluções.

O que garante a qualidade de um produto em uma indústria é o seu sistema da qualidade, o qual deve contar com todos os envolvidos na cadeia produtiva. Esta é uma rede muito ampla composta por todos os setores da indústria que estão conectados, por exemplo, a produção apenas ocorre com o trabalho conjunto dos setores de controle de qualidade, garantia da qualidade e assuntos regulatórios. Segundo Gil, E. S. (2010), “o sistema de gestão da qualidade trata de três questões fundamentais: o planejamento da qualidade, a manutenção da qualidade e a melhoria contínua da qualidade”.

Para que uma indústria farmacêutica opere de maneira íntegra, a mesma deve atender as boas práticas de fabricação (BPF), as quais estão contidas dentro do sistema da qualidade. A RDC 301 de 2019 da ANVISA define as BPF como “todas as etapas do ciclo de vida do produto, desde a fabricação de medicamentos experimentais, transferência de tecnologia, fabricação comercial até a descontinuação do produto” (ANVISA, RDC 301, 2019).

Segundo a RDC 166 de 2017 da ANVISA “a validação analítica é a avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos”. Esses métodos antes de serem validados devem apresentar um período de desenvolvimento, para que as melhores condições sejam testadas e alcançadas, e esse desenvolvimento deve permitir que o método seja validado (ANVISA, RDC 166, 2017).

A tabela 2 indica quais são os parâmetros de validação a serem avaliados de acordo com a análise pretendida.

Tabela 2: Parâmetros de Validação

Parâmetro Avaliado	Identificação	Teste de Impurezas		Doseamento -dissolução (quantificação) -uniformidade de conteúdo -potência
		Quantitativo	Ensaio Limite	
Exatidão	não	sim	não	Sim
Precisão Repetibilidade	não	sim	não	Sim
Precisão Intermediária	não	sim <sup>(1)</sup>	não	sim <sup>(1)</sup>
Seletividade <sup>(2)</sup>	sim	sim	sim	sim
Limite de Detecção	não	não <sup>(3)</sup>	sim	não
Limite de quantificação	não	sim	não	não <sup>(3)</sup>
Linearidade	não	sim	não	sim
Intervalo	não	sim	não	sim

Fonte: RDC 166 de 2017.

Conforme a tabela 2 os parâmetros da validação analítica para as impurezas orgânicas e solventes residuais do PSMA-1007 (18F) serão: exatidão, precisão repetibilidade, precisão intermediária, seletividade, limite de quantificação, linearidade e intervalo. Para a radioatividade serão avaliados a seletividade e a resposta do detector radioativo (para que não haja a saturação do mesmo).

Os limites das impurezas orgânicas são definidos conforme dossiê de produto da *ABX Biochemical Compounds e Guide for the Elaboration of Monographs on Radiopharmaceutical Preparations* da Farmacopeia Europeia. Os limites de especificação de solventes também seguem o dossiê da ABX e estão de acordo com a Farmacopeia Europeia. É importante ressaltar que, apesar do limite de etanol nos produtos farmacêuticos ser de 0,5%, para os radiofármacos é permitida a utilização de 10% como o limite de etanol (Council of Europe, 2018).

Os limites de quantificação dos métodos foram calculados através de curvas com a fórmula abaixo:

$$LQ = (DP \times 10) \div IC$$

Onde IC é a inclinação das curvas e DP é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y das curvas de calibração.

O Fator de Resposta Relativo (FRR) é utilizado em metodologias de determinação de impurezas para corrigir a diferença na resposta do detector entre os picos de impureza e do insumo farmacêutico ativo, determinando a real concentração de impureza no produto. O FRR foi calculado para o precursor de PSMA, dessa forma não haverá a necessidade de adquirir o padrão do precursor de PSMA para a realização das análises de rotina e sim utilizar o seu fator para os cálculos de fechamento. O FRR pode ser determinado através da construção de uma curva linear de diferentes concentrações das impurezas e do insumo farmacêutico ativo, conforme fórmula abaixo:

$$FR = \text{Área} \div \text{Concentração}$$

$$FRR = FR_{\text{impureza}} \div FR_{\text{ativo}}$$

A linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra. Para avaliar a homocedasticidade dos dados para a correta avaliação do modelo linear, coeficiente de correlação superior a 0,99, coeficiente angular diferente de zero, deve-se utilizar nível de significância de 5%. A faixa de trabalho deve ser do limite de quantificação até 120% no limite de especificação de cada impureza individual.

A precisão deve ser expressa por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade. A precisão deve ser demonstrada pela dispersão dos resultados, calculando-se o desvio padrão relativo através da seguinte fórmula:

$$DPR = (DP \div CMD) \times 100$$

Onde o DPR é o desvio padrão relativo, DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada.

A exatidão deve ser expressa pela relação percentual de recuperação do analito de concentração conhecida adicionado à matriz. Deve ser calculado o desvio padrão relativo de cada triplicata e a sua variação percentual deve ser a mesma estabelecida no teste de precisão.

A robustez indica capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas variações nas condições analíticas, como pH, fase móvel, temperatura de forno,

preparo de amostra. A variação percentual aceita é a mesma determinada na precisão e na exatidão.

Os critérios de aceitação para os parâmetros nas validações atendem ao preconizado na RDC 166 de 2017. Os desvios padrões relativos para o parâmetro de precisão para a validação de solventes residuais poderiam ser de até 20%, conforme o capítulo geral da Farmacopeia Americana intitulado 1467 Solventes residuais – Verificação de Procedimentos Compendiais e Validação de Procedimentos Alternativos. No entanto, nessa validação foi aceito o desvio de 10% para que o método fosse bastante preciso. A exatidão aceitou a variação na recuperação de  $100 \pm 10\%$ . Na validação de pureza radioquímica, realizada por cromatografia líquida, os limites de desvio padrão relativo atendem ao preconizado pela AOAC (AOAC INTERNATIONAL, 2016) conforme a tabela 3.

Tabela 3: Variações percentuais da precisão e da exatidão

<b>Concentração do analito</b>	<b>DPR (%)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
1 g/mL (1.000.000 µg/mL)	1,3	98-102
100 mg/mL (100.000 µg/mL)	1,9	98-102
10 mg/mL (10.000 µg/mL)	2,7	97-103
1 mg/mL (1.000 µg/mL)	3,7	95-105
100 µg/mL	5,3	90-107
10 µg/mL	7,3	80-110
1 µg/mL	11	80-110
100 ppb (0,1 µg/mL)	15	80-110
10 ppb (0,01 µg/mL)	21	60-115
1 ppb (0,001 µg/mL)	30	40-120

Fonte: AOAC, 2016.

Após todas as validações necessárias para um produto, tanto de métodos de análises como de processos fundamentais para a produção, é fundamental avaliar a estabilidade do produto, de acordo com a RDC 318 de 2019 da ANVISA. O estudo de estabilidade é realizado para garantir que dentro do prazo de validade do medicamento todas as suas especificações físico-químicas e microbiológicas são atendidas.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Controle de Qualidade do PSMA-1007 (18F)

Uma vez que não existe monografia para o radiofármaco PSMA-1007 (18F) em literaturas oficiais, nacionais ou estrangeiras, foram realizados os desenvolvimentos e validações das metodologias necessárias, ou seja, validações totais. As validações atendem a RDC 166 de 25 de julho de 2017, quanto aos métodos gerais como identidade radionuclídica, pureza radionuclídica potencial hidrogeniônico, teste de esterilidade, integridade de membrana filtrante os mesmos atendem a capítulos gerais de farmacopeias como a brasileira, americana e europeia.

#### 4.1.1. *Bioburden* (Biocarga)

A medida da biocarga das linhas produtivas foi realizada através da produção de um lote do produto sem que o mesmo fosse esterilizado por filtração. Esse lote, após o decaimento radioativo, foi filtrado em uma membrana estéril de 0,45 µm e a mesma foi incubada em placa de ágar caseína soja para que a carga microbiana presente nas linhas produtivas (caso presente) fosse quantificada.

#### 4.1.2. Identidade e Pureza Radionuclídica

Essas duas análises foram realizadas para garantir que o radioisótopo de interesse foi produzido, nesse caso o flúor-18, sem contaminantes (no máximo 0,5%). Para assegurar a identidade radionuclídica foi realizado o tempo de meia vida utilizando o equipamento curiômetro modelo CRC25 PET, fabricante Capintec. Foram realizadas três medidas dentro de um intervalo de 15 minutos e o cálculo do tempo de meia vida foi realizado conforme a fórmula abaixo. O critério de aceitação para essa análise foi de 105 a 115 minutos.

$$t(1/2) = ((\ln 2) \cdot t) / (\ln(A_0/A))$$



Onde  $t(1/2)$  é o tempo de meia-vida,  $\ln$  logaritmo natural,  $A_0$  tempo inicial e  $A$  tempo final.

A pureza radionuclídica foi realizada através do equipamento analisador multicanal MCA de espectroscopia Gama, fabricante Canberra, modelo 727 com detector de iodeto de sódio. Nos resultados foi observada a energia de emissão dos pósitrons de emissão em 511 keV e/ou 1022 keV.

#### 4.1.3. Pureza Radioquímica

A determinação da pureza radioquímica foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência. Foram utilizados dois detectores para essa análise, o detector DAD para monitoramento dos compostos químicos e o detector radioativo para o monitoramento do medicamento marcado (ambos estão acoplados em série). Quanto ao radiofármaco já marcado, a área percentual do resultado do detector radioativo deve ser superior a 91%. O tempo de retenção comparando o PSMA não marcado como o PSMA marcado deve variar no máximo 5%.

Foi utilizado o cromatógrafo líquido Shimadzu, modelo Prominence. O método final utilizou a coluna C 18 (2) 150 x 4,6 mm 3  $\mu\text{m}$  (Luna; Phenomenex), comprimento de onda de 225 nm, fluxo de 1,4 mL/min, sistema gradiente composto de ácido trifluoroacético 0,1% em água e acetonitrila. O sistema gradiente foi conforme a figura 5.

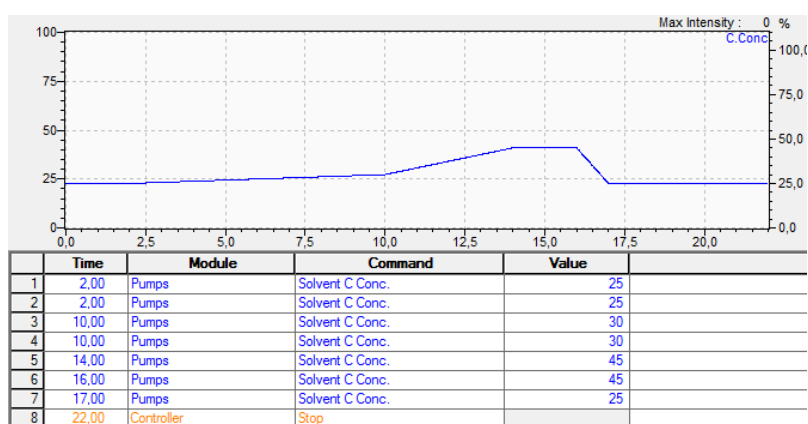


Figura 5: sistema gradiente (Fonte: o autor 2020).

Durante o desenvolvimento do método foram testadas as colunas C18 Kinetex 100 x 2,1 mm e 2,6  $\mu\text{m}$  e a coluna C18 Pursuit 300 x 3,9 mm e 10  $\mu\text{m}$ .

#### 4.1.4. Pureza Química

Para essa análise foram monitorados os compostos químicos não marcados na amostra como o precursor e impurezas desconhecidas. A cromatografia líquida foi utilizada conforme a análise de pureza radioquímica, e os critérios de aceitação foram de picos para o PSMA menores do que 10 µg/mL, impurezas individuais menores do que 10 µg/mL e impurezas totais menores do que 50 µg/mL (mesmo método analítico da pureza radioquímica).

Além da cromatografia líquida foi realizada a análise de TBA (tetrabutilamônio) com placas de sílica e a revelação com cristais de iodo. É um *spot test*, onde 3 µL de amostra são posicionadas em uma placa de sílica e o padrão e TBA é posicionado no seu limite 0,2 mg/mL. Uma comparação colorimétrica foi realizada para a liberação da análise (a mancha da amostra deve apresentar intensidade menor do que a mancha do padrão).

#### 4.1.5. Solventes Residuais

Os solventes residuais testados foram etanol e dimetilsulfóxido, utilizados na formulação do fármaco. A análise foi realizada em cromatógrafo Bruker, modelo 430-GC, equipado com detector FID, injeção direta e coluna BrukerFourFactorCapillary VF-200 ms, 30 m x 0,32 mm.

Como condição final para a análise de solventes residuais, testou-se o injetor a 250°C e detector a 300°C, volume de injeção de 1,0 µL. Os gases utilizados foram hidrogênio, hélio e ar sintético. A rampa de temperatura do forno de colunas foi configurada conforme a figura 6.

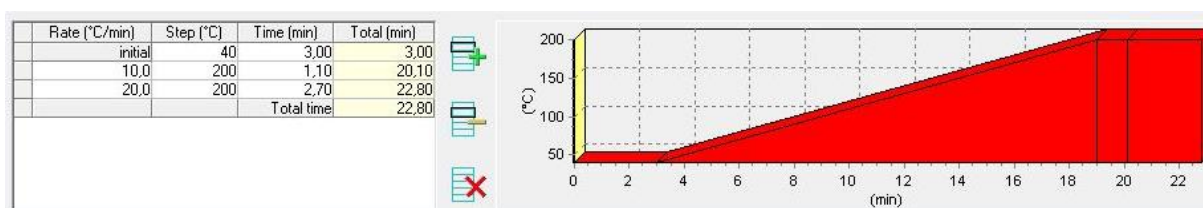


Figura 6: rampa de temperatura da análise de solventes residuais (Fonte: o autor 2020).

Diversas rampas de temperatura foram avaliadas no desenvolvimento do método em virtude da presença de diversos picos provenientes da amostra. Os limites para solventes residuais devem ser menores a 10% (v/v) para o etanol e menores a 0,5 % (m/v) para o DMSO.

#### **4.1.6. pH**

O pH foi medido através de fitas reagentes. Duas fitas foram utilizadas, uma na faixa de medição de pH 5-10 e outra na faixa de pH 4-7. Outra alternativa para a realização da análise seria a utilização de um pHmetro com microsonda, porém tal aparato não estava disponível durante a execução deste trabalho.

O valor de pH deve estar entre 4,5 e 8,5.

#### **4.1.7. Esterilidade**

A esterilidade do produto foi avaliada conforme método descrito no Capítulo Geral da Farmacopeia Brasileira 6 Edição (2019). O produto PSMA-1007 (18F) foi inoculado diretamente nos caldos Tioglicolato a 22,5°C ( $\pm 2,5^\circ\text{C}$ ) e caldo Caseína Soja com indicador resazurina a 32,5°C ( $\pm 2,5^\circ\text{C}$ ) por um período de 14 dias. Para que o produto seja considerado estéril o mesmo não pode apresentar turvação no período de 14 dias.

#### **4.1.8. Integridade de Membrana Filtrante**

A integridade da membrana filtrante, utilizada na esterilização final da PSMA-1007 (18F), foi verificada através do teste de ponto de bolha, constante no Capítulo Geral da USP (2015). O produto final é esterilizado fisicamente através de filtração em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ . A determinação do ponto de bolha é uma maneira de garantir que o filtro não apresenta defeitos, como um possível rompimento de sua membrana. Dessa forma, é possível inferir que o produto foi corretamente filtrado e estará estéril.

O teste consiste em aplicar uma pressão sobre a membrana ainda úmida até que seja possível deslocar o líquido dos poros da mesma. Como a membrana é instalada dentro de um suporte plástico e uma agulha é utilizada na extremidade de

saída do líquido, este deslocamento é verificado através da formação de bolhas na saída do aparato. A pressão que indica uma adequada filtração deve ser superior a 50 psi.

#### 4.1.9. Teor de Endotoxinas

O teor de endotoxinas foi verificado utilizando o método cromogênio cinético descrito na Farmacopeia Brasileira 6 Edição (2019). Para realização da análise utilizou-se o equipamento automatizado Endosafe PTS (Charles River). A figura 7 apresenta um esquema do cartucho de análise de endotoxinas.

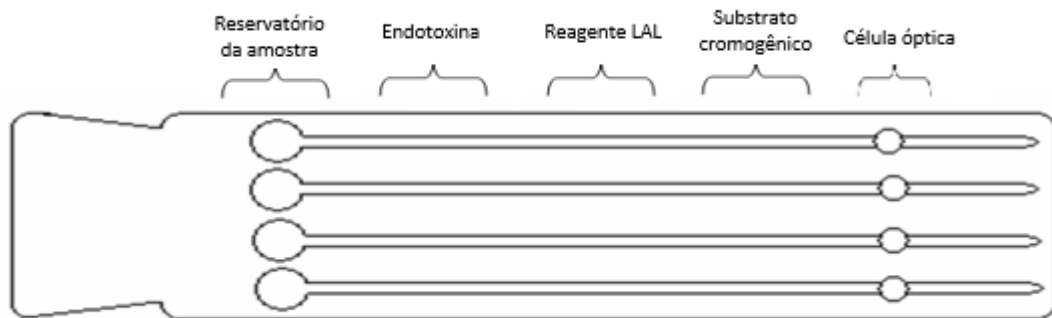


Figura 7: esquema do cartucho da análise de endotoxinas (Fonte: o autor 2020).

Foram retirados 10 µL da amostra de maneira asséptica e foi realizada uma diluição de 1 para 200 para a realização da análise. O limite total preconizado pela Farmacopeia Brasileira para o produto é de 175 unidades de endotoxinas e o volume total do lote é de 10 mL. Dessa forma, o limite de endotoxinas foi calculado pela fórmula abaixo:

$$\text{Limite End. por mL de produto} = \frac{\text{limite de end. total para o produto}}{\text{volume máximo de injeção}}$$

$$\text{Limite End. por mL de produto} = \frac{175}{10} = 17,5 \text{ EU/mL}$$

O teor de endotoxinas deve ser inferior a 17,5 EU/mL, a máxima diluição válida deve ser de no máximo 350 e a sensibilidade do cartucho de 0,05 EU/mL.

A máxima diluição válida foi calculada pela fórmula abaixo:

$$MDV = \frac{\textit{limite de endotoxinas para o produto}}{\textit{sensibilidade do cartucho}} = \frac{17,5}{0,05} = \mathbf{350 \textit{ vezes}}$$

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. *Bioburden*

Um lote do produto foi submetido a filtração em membrana estéril de 0,45 µm de maneira asséptica e a mesma foi incubada em meio de cultura ágar caseína soja. Não foram evidenciadas colônias nessa placa após o período de incubação, ou seja, as linhas produtivas apresentaram-se limpas o suficiente para que o produto possa ser esterilizado por filtração.

### 5.2. Pureza Radioquímica e Química por HPLC

#### 5.2.1. Desenvolvimento da Metodologia

O desenvolvimento do método iniciou com os testes na coluna C18 Kinetex 100 x 2,1 mm e 2,6 µm. O primeiro desafio encontrado foi o tamanho de partícula ser muito pequeno e, assim, a pressão da coluna ficava muito elevada, em torno de 4000 psi (essa coluna seria mais adequada para sistemas de alta pressão UHPLC). Dessa forma, mesmo utilizando a fase móvel com água TFA 0,1% e acetonitrila na proporção de 50:50, com o aumento da acetonitrila o pico deveria sair rapidamente, não foi possível visualizar o pico de interesse, apenas o pico de DMSO. Isso ocorreu devido ao fluxo baixo, uma vez que o sistema de CLAE não suportaria o aumento de fluxo nessa coluna (aumento de pressão acima de 5000 psi). Na figura 8 pode ser observada uma corrida de 45 minutos nessas condições e o não aparecimento do pico de interesse.

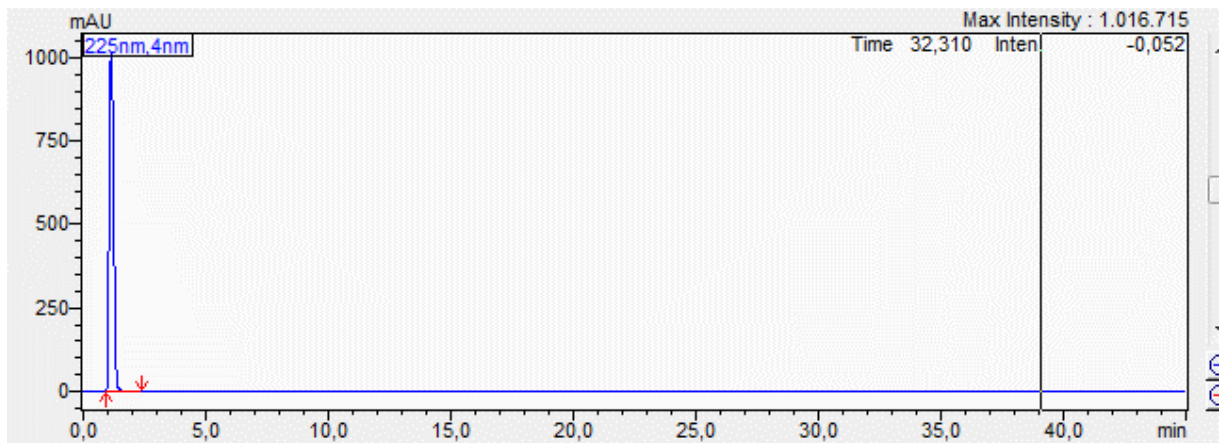


Figura 8: injeção de padrão de PSMA, coluna Kinetex C18 x 100 x 2,1 mm e 2,6  $\mu\text{m}$  (Fonte: o autor, 2020).

Os próximos testes foram realizados na coluna C18 Pursuit 300 x 3,9 mm e 10  $\mu\text{m}$  com o objetivo de visualização dos picos de interesse. Nessa coluna foi possível visualizar o pico de interesse, no entanto a altura do pico ficou muito baixa. Como os radiofármacos estão presentes em quantidades mínimas – traços - nas amostras, é necessária uma coluna que apresente um sinal satisfatório. A figura 9 apresenta a injeção de uma amostra nessa coluna (fase móvel de água TFA 0,1% e acetonitrila 75:25).

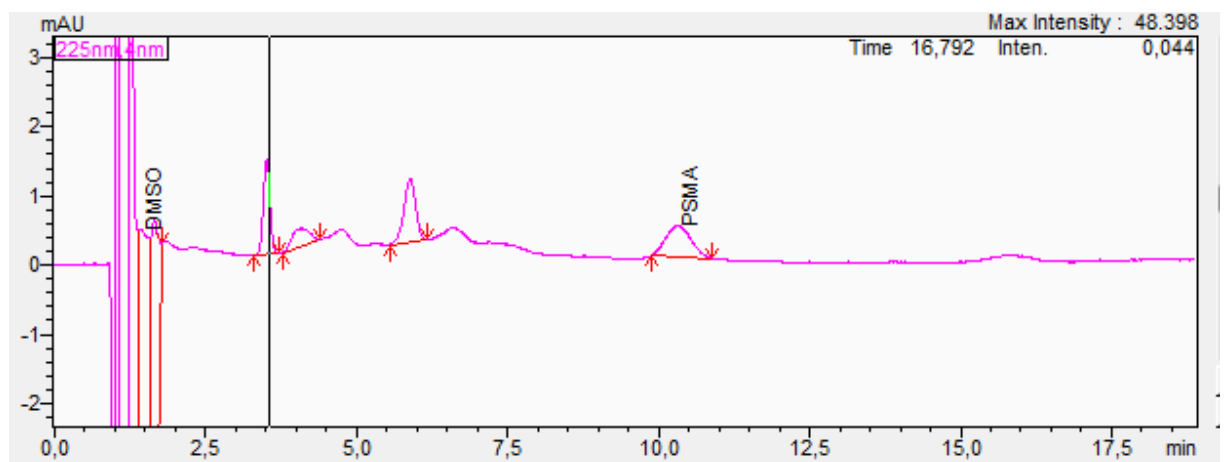


Figura 9: injeção de amostra de PSMA-1007 (18F) na coluna C18 Pursuit 300 x 3,9 mm e 10  $\mu\text{m}$  (Fonte: o autor, 2020).

O método ficou definido com o uso da coluna C18 (2) Luna, Phenomenex 150 x 4,6 mm 3  $\mu\text{m}$ , sistema gradiente, conforme figura 10 de uma amostra. Pico do PSMA em aproximadamente 11,6 minutos, demais picos são de impurezas.

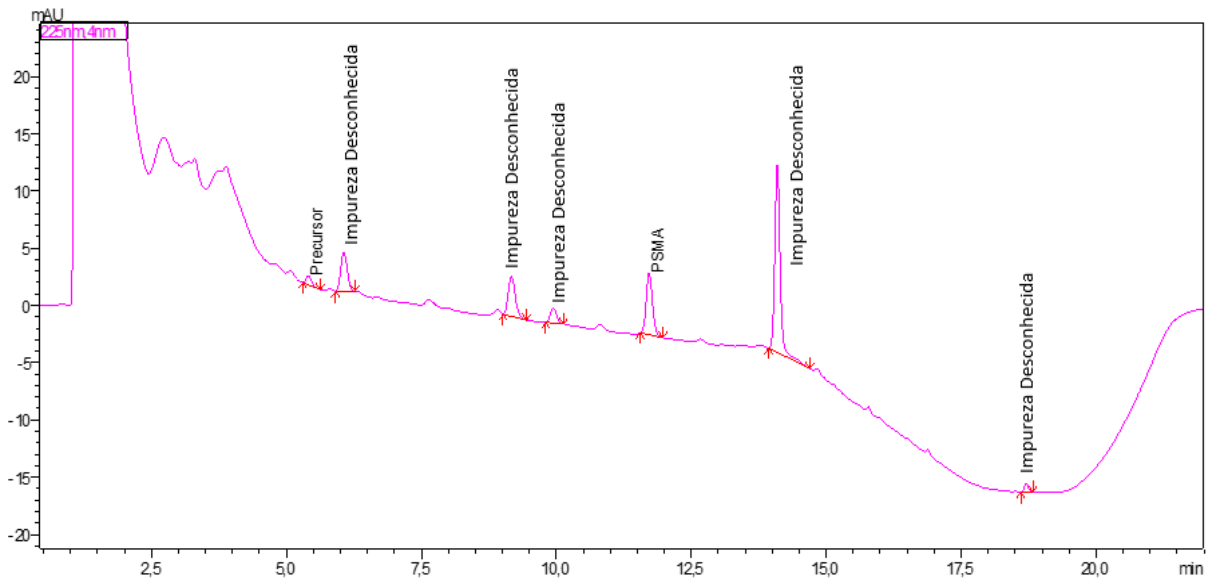


Figura 10: injeção de amostra de PSMA-1007 (18F) em método fechado (Fonte: o autor 2020).

Após a conclusão do método foi realizada a injeção da amostra no detector radioativo e foi observada a necessidade de diluição da amostra para que não haja a saturação da leitura. A figura 11 apresenta uma injeção sem diluição.

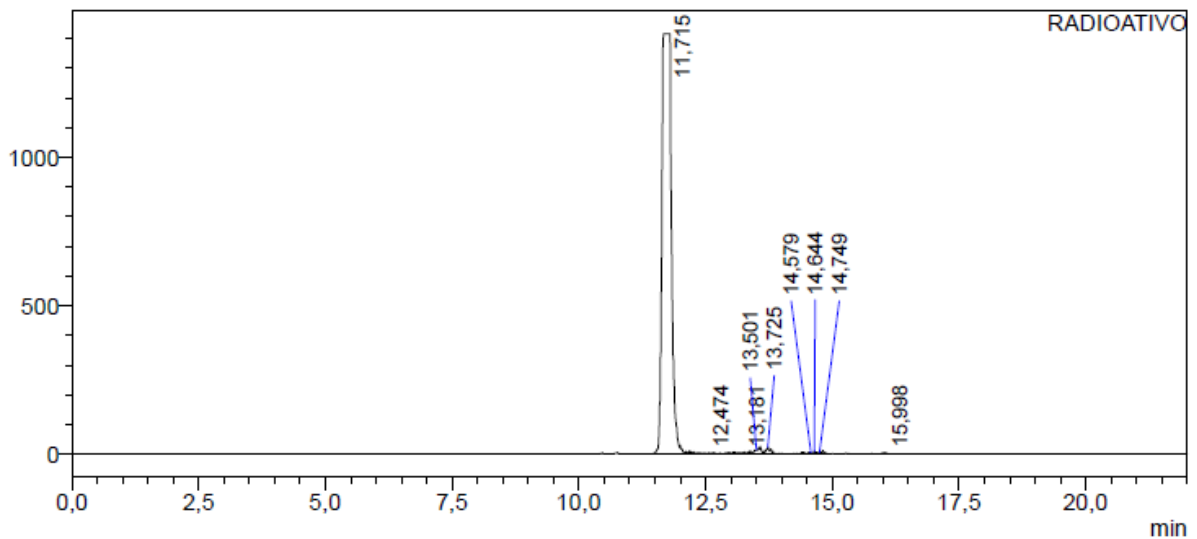


Figura 11: injeção de amostra de PSMA-1007 (18F) sem diluição (Fonte: o autor).

A figura 12 apresenta a mesma amostra com a diluição necessária, onde não há a saturação do detector.



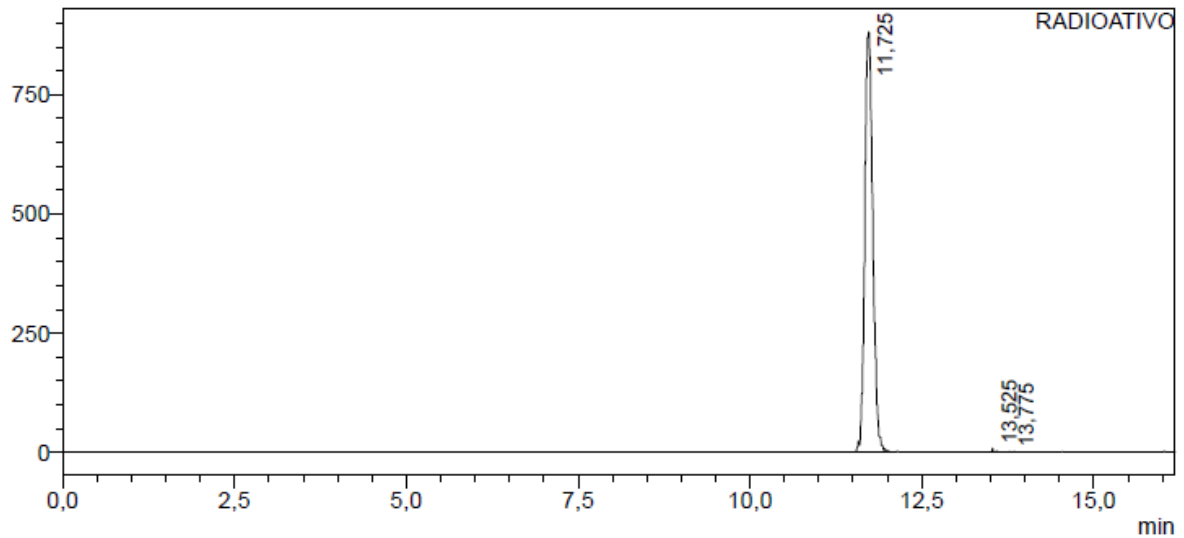


Figura 12: amostra de PSMA-1007 ( $^{18}\text{F}$ ) sem a saturação do detector (Fonte: o autor, 2020).

Com esses resultados, foi determinado que a amostra a ser injetada no CLAE deve apresentar uma concentração radioativa máxima de  $1000 \mu\text{Ci}/100 \mu\text{L}$ . Com a realização dessa diluição, duas injeções no cromatógrafo são necessárias, a primeira para avaliação das impurezas orgânicas e a segunda para avaliação da pureza radioquímica e para a comparação do tempo de retenção do pico radioativo com o tempo de retenção do padrão (frio). Após esse desenvolvimento foi iniciada a validação.

## 5.2.2. Validação

### 5.2.2.1. Seletividade

Foram avaliadas diferentes amostras com a finalidade de comprovar a capacidade do método de quantificar somente o analito de interesse. A figura 13 apresenta todas as 9 amostras sobrepostas, onde é possível observar que nos tempos de retenção do precursor e do ativo não há co-eluição da matriz e nem de solventes (foi injetado fase móvel, placebo, os ativos precursor de PSMA e PSMA isolados, dimetilsulfóxido e uma amostra).

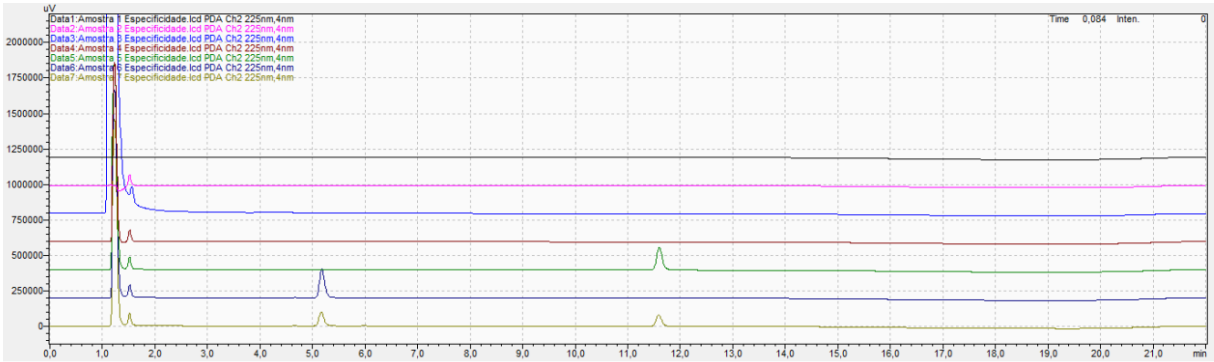


Figura 13: injeções de seletividade da pureza radioquímica (Fonte: o autor, 2020).

Na figura 14 é possível observar os picos de dimetilsulfóxido, precursor de PSMA e PSMA frio.

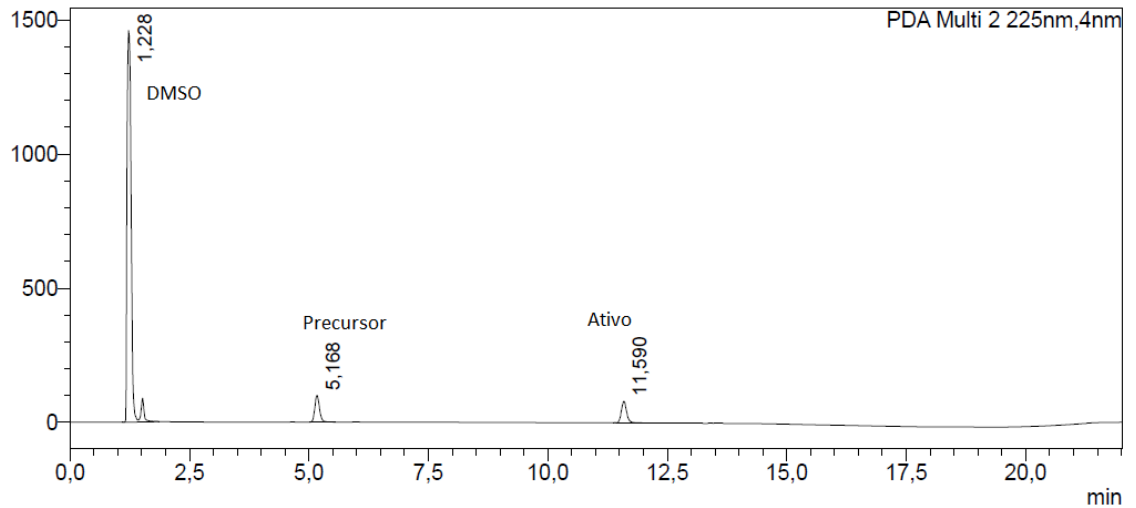


Figura 14: cromatograma com tempos de retenção dos picos de interesse (Fonte: o autor, 2020).

A figura 15 apresenta o resultado de uma amostra com o pico radioativo do PSMA-1007 (F18), sem a saturação do detector.

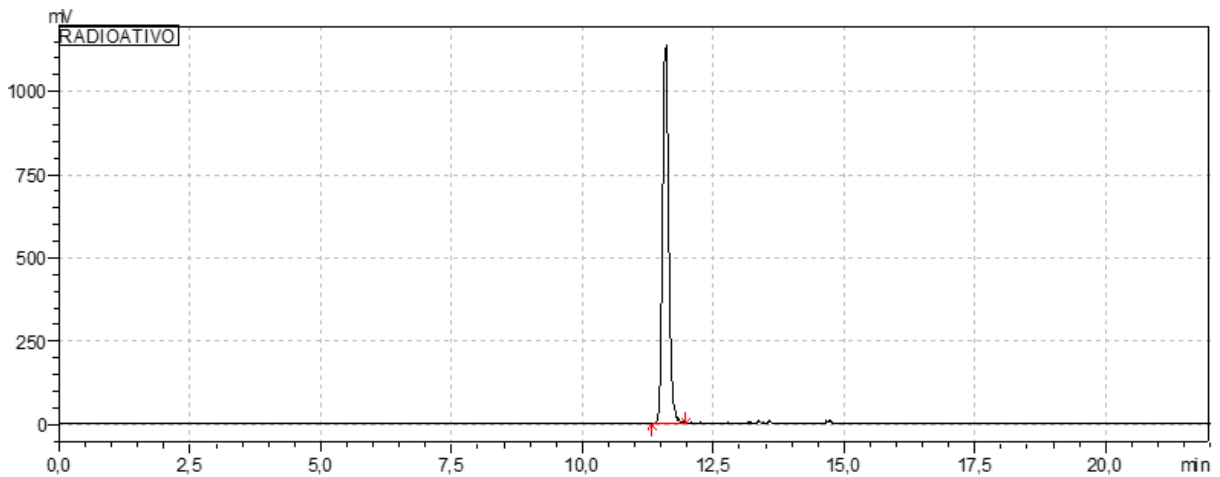


Figura 15: amostra radioativa do PSMA-1007(F18) (Fonte: o autor, 2020).

### 5.2.2.2. Limite de Quantificação

Nas figuras 16 e 17 é possível observar os limites de quantificação do precursor de PSMA e do PSMA frio, com as respectivas concentrações utilizadas para a plotagem da curva. Como pode ser observado nas figuras os limites de quantificação foram de 0,7981  $\mu\text{g/mL}$  para o precursor e de 0,7364  $\mu\text{g/mL}$  para o PSMA frio.

Curva	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área	Intersecção	Inclinação
Curva 1	0,49	40757	5807,15	73400,69
	2,46	185280		
	4,92	367427		
	7,37	555053		
	9,83	716916		
	11,80	875143		
Curva 2	0,49	36464	-351,83	72900,29
	2,46	182305		
	4,92	351745		
	7,37	540142		
	9,83	708843		
	11,80	865677		
Curva 3	0,49	35104	-5897,56	73779,08
	2,46	176425		
	4,92	350819		
	7,37	535187		
	9,83	714394		
	11,80	872367		
<b>Média inclinação</b>				<b>73360,02</b>
<b>DP Intersecção com o eixo Y</b>				<b>5855,03</b>
<b>LD (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>				<b>0,2394</b>
<b>LQ (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>				<b>0,7981</b>

Figura 16: Cálculos do Limite de Quantificação do Precursor de PSMA (Fonte: o autor, 2020).

Curva	Concentração (µg/mL)	Área	Intersecção	Inclinação
Curva 1	0,50	40897	5279,74	75737,68
	2,48	190547		
	4,96	382979		
	7,43	579058		
	9,91	745201		
	11,89	907598		
Curva 2	0,50	36209	-2097,79	75766,61
	2,48	188332		
	4,96	367958		
	7,43	565008		
	9,91	741297		
	11,89	904286		
Curva 3	0,50	34993	-5680,04	76150,43
	2,48	185314		
	4,96	366722		
	7,43	558122		
	9,91	743139		
	11,89	907570		
<b>Média inclinação</b>				<b>75884,91</b>
<b>DP Intersecção eixo Y</b>				<b>5588,34</b>
<b>LD (µg/mL)</b>				<b>0,2209</b>
<b>LQ (µg/mL)</b>				<b>0,7364</b>

Figura 17: Cálculos do Limite de Quantificação do PSMA frio (Fonte: o autor, 2020).

As mesmas injeções da curva do limite de quantificação foram utilizadas para a determinação do fator de resposta relativo para corrigir a diferença na resposta do detector entre os picos de impureza (precursor) e da substância ativa (PSMA frio). Os resultados podem ser observados na figura 18, sendo o fator de resposta relativo do precursor de PSMA de 0,9741.

Concentração de PSMA (µg/mL)	Concentração de precursor PSMA (µg/mL)	Área PSMA	Área Precursor PSMA	Fator Resposta PSMA	Fator Resposta Precursor PSMA	Fator de Resposta Relativo
0,4955	0,4915	40897	40757	82536,83	82923,70	1,0047
0,4955	0,4915	36209	36464	73075,68	74189,22	1,0152
0,4955	0,4990	34993	35104	70621,59	70348,70	0,9961
2,4775	2,4575	190547	185280	76911,00	75393,69	0,9803
2,4775	2,4575	188332	182305	76016,95	74183,11	0,9759
2,4775	2,4575	185314	176425	74798,79	71790,44	0,9598
4,9550	4,9150	382979	367427	77291,42	74756,26	0,9672
4,9550	4,9150	367958	351745	74259,94	71565,62	0,9637
4,9550	4,9150	366722	350819	74010,49	71377,21	0,9644
7,4325	7,3725	579058	555053	77908,91	75286,94	0,9663
7,4325	7,3725	565008	540142	76018,57	73264,43	0,9638
7,4325	7,3725	558122	535187	75092,10	72592,34	0,9667
9,9100	9,8300	745201	716916	75196,87	72931,43	0,9699
9,9100	9,8300	741297	708843	74802,93	72110,17	0,9640
9,9100	9,8300	743139	714394	74988,80	72674,87	0,9691
11,8920	11,7960	907598	875143	76320,05	74189,81	0,9721
11,8920	11,7960	904286	865677	76041,54	73387,33	0,9651
11,8920	11,7960	907570	872367	76317,69	73954,48	0,9690
<b>Média de Fator de Resposta Relativo</b>						0,9741

Figura 18: Cálculos do fator de resposta relativo (Fonte: o autor, 2020).

### 5.2.2.3. Linearidade

Nas figuras 19 e 20 é possível observar os resultados da linearidade do precursor de PSMA e do PSMA frio, com as respectivas concentrações utilizadas para a plotagem da curva. Como pode ser observado nos cálculos dos dois compostos há relação linear adequada dos dados, uma vez que o valor de “r” foi superior a 0,99.

<b>Massa pesada precursor PSMA (mg)</b>	<b>Concentração de Precursor (µg/mL)</b>	<b>Área (mAU)</b>
2,5	0,2458	17815
	0,2458	17864
	0,2458	18172
2,5	0,4915	33340
	0,4915	34438
	0,4915	34460
2,5	2,4575	173817
	2,4575	171396
	2,4575	168009
2,5	4,9150	344045
	4,9150	332061
	4,9150	333425
2,5	7,3725	521042
	7,3725	509383
	7,3725	507979
2,5	9,8300	676584
	9,8300	670358
	9,8300	671628
2,5	11,7960	819823
	11,7960	818747
	11,7960	825677
<b>Coefficiente de correlação (r)</b>		<b>0,9998</b>
<b>Intersecção com o eixo Y</b>		<b>-118,76</b>
<b>Coefficiente angular</b>		<b>69189,98</b>

Figura 19: Resultados Linearidade do Precursor do PSMA (Fonte: o autor, 2020).

<b>Massa pesada PSMA (mg)</b>	<b>Concentração de PSMA (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Área (mAU)</b>
2,5	0,2478	19286
	0,2478	19552
	0,2478	18293
2,5	0,4955	33840
	0,4955	34898
	0,4955	34955
2,5	2,4775	180199
	2,4775	178832
	2,4775	175889
2,5	4,9550	359458
	4,9550	347477
	4,9550	348966
2,5	7,4325	544536
	7,4325	533544
	7,4325	531711
2,5	9,9100	707609
	9,9100	701394
	9,9100	703003
2,5	11,8920	857333
	11,8920	856397
	11,8920	864588
<b>Coefficiente de correlação (r)</b>		<b>0,9998</b>
<b>Intersecção com o eixo Y</b>		<b>-608,48</b>
<b>Coefficiente angular</b>		<b>71856,76</b>

Figura 20: Resultados Linearidade do PSMA frio (Fonte: o autor, 2020).

Nas figuras 21 e 22 é possível observar a avaliação dos resíduos da linearidade, onde a mesma é realizada para estimar os valores de “y” encontrados com os valores estimados pela equação. Pode-se observar nas figuras a distribuição

homocedástica dos resíduos e a ausência de pontos fora da curva, uma vez que não foi encontrado nenhum resíduo com variação superior a 3 unidades.

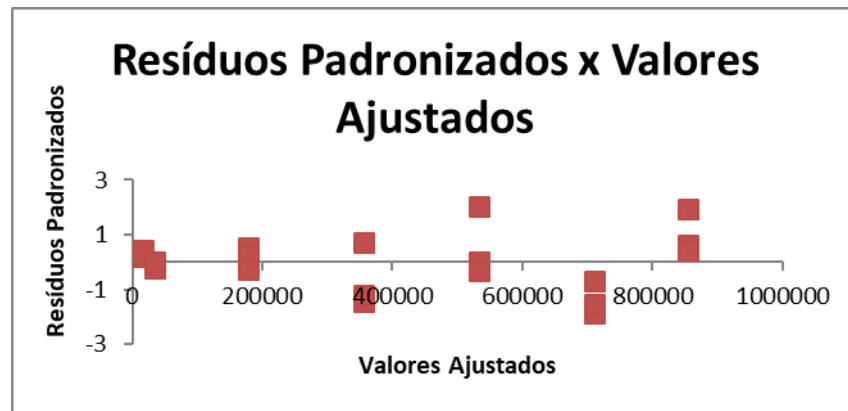


Figura 21: avaliação de resíduos de precursor de PSMA (Fonte: o autor, 2020).

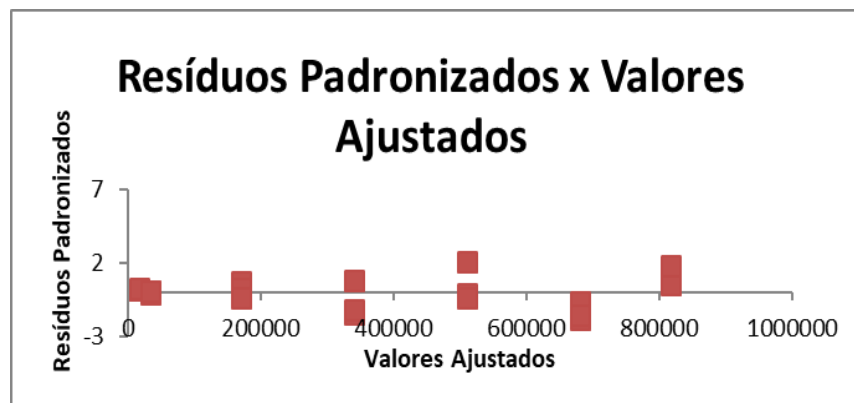


Figura 22: avaliação de resíduos PSMA frio (Fonte: o autor, 2020).

#### 5.2.2.4. Precisão

Nas figuras 23 e 24 é possível observar a comparação da repetibilidade com a precisão intermediária, onde foram utilizadas as mesmas condições cromatográficas, com analistas distintos em dias distintos. Foram utilizadas nove concentrações, três baixas (0,25 µg/mL), três médias (9,90 µg/mL) e três altas (12,00 µg/mL). Os critérios de aceitação estão de acordo com o preconizado, uma vez que o ponto baixo aceita uma variação máxima de 11,0% de desvio padrão relativo, o ponto médio de 7,0% e o alto de 5,3%.



<b>Repetibilidade x Precisão Intermediária Precursor</b>		
<b>Amostra</b>	<b>Analista 1</b>	<b>Analista 2</b>
1	100,79	102,63
2	99,68	95,10
3	100,64	99,05
4	96,92	95,46
5	96,03	94,97
6	96,21	105,00
7	97,87	95,01
8	97,74	95,62
9	98,57	95,06
	<b>Média (%)</b> $n = 18$	98,54
	<b>DP</b> $n = 18$	3,27
	<b>DPR</b> $n = 18$	3,32

Figura 23: Repetibilidade x Precisão Intermediária precursor (Fonte: o autor, 2020).

<b>Repetibilidade x Precisão Intermediária PSMA</b>		
<b>Amostras</b>	<b>Analista 1</b>	<b>Analista 2</b>
1	107,65	106,24
2	109,13	105,00
3	102,11	103,34
4	98,74	100,14
5	97,88	99,75
6	98,10	100,08
7	99,70	99,35
8	99,59	99,64
9	100,54	98,97
	<b>Média (%)</b> $n = 18$	101,44
	<b>DP</b> $n = 18$	3,40
	<b>DPR</b> $n = 18$	3,35

Figura 24: Repetibilidade x Precisão Intermediária PSMA frio (Fonte: o autor, 2020).

#### 5.2.2.5. Exatidão

Nas figuras 25 e 26 é possível observar os resultados da exatidão, sendo os critérios de aceitação para a recuperação de 80 a 110%. Foram analisadas nove concentrações, três baixas, três médias e três altas e todas atendem a esse critério, ou seja, o placebo não interfere na quantificação dos resultados.

Amostras Precursor						
Amostra	Conc. Teórica (µg/mL)	Área do Ativo (mAU)	Conc. Obtida (µg/mL)	Recuperação (%)	Recuperação Média (%)	DPR (%)
B1	0,2478	17590	0,2497	100,79	100,37	0,60
B2	0,2478	17395	0,2469	99,68		
B3	0,2478	17563	0,2493	100,64		
M1	9,9100	676584	9,6051	96,92	96,39	0,49
M2	9,9100	670358	9,5168	96,03		
M3	9,9100	671628	9,5348	96,21		
A1	11,8920	819823	11,6386	97,87	98,06	0,45
A2	11,8920	818747	11,6234	97,74		
A3	11,8920	825677	11,7217	98,57		

Figura 25: Resultados exatidão precursor PSMA (Fonte: o autor, 2020).

Amostras Psma						
Amostra	Conc. Teórica (µg/mL)	Área do Ativo (mAU)	Conc. Obtida (µg/mL)	Recuperação (%)	Recuperação Média (%)	DPR (%)
B1	0,2478	19286	0,2667	107,65	106,30	3,48
B2	0,2478	19552	0,2704	109,13		
B3	0,2478	18293	0,2530	102,11		
M1	9,9100	707609	9,7854	98,74	98,24	0,46
M2	9,9100	701394	9,6995	97,88		
M3	9,9100	703003	9,7217	98,10		
A1	11,8920	857333	11,8559	99,70	99,94	0,52
A2	11,8920	856397	11,8430	99,59		
A3	11,8920	864588	11,9562	100,54		

Figura 26: Resultados exatidão PSMA frio (Fonte: o autor, 2020).

#### 5.2.2.6. Robustez

Foram avaliadas as seguintes variações no método analítico: amostra sem filtrar, alteração na proporção de fase móvel, alteração na concentração de TFA, variação de fluxo e na temperatura da coluna. A figura 27 apresenta todas as variações da solução adequabilidade. Todas as condições apresentaram resultados satisfatórios para a solução de adequabilidade, a proporção de fase móvel de 73:27 apresentou um número de pratos teóricos bem superior uma vez que o tempo de retenção dessa injeção foi menor pelo aumento da fase orgânica.

Parâmetro	Resolução	Cauda PSMA	Pratos Teóricos PSMA	Pureza PSMA	Cauda Precursor	Pratos Teóricos Precursor	Pureza Precursor
Condição Controle	32,28	1,16	45418	1,00	1,20	10831	1,00
Fluxo de 1,35 mL/min	32,57	1,15	47364	1,00	1,20	11226	1,00
Fluxo de 1,45 mL/min	32,24	1,15	43720	1,00	1,20	10556	1,00
Temperatura forno de 37 °C	31,99	1,16	47595	1,00	1,18	10890	1,00
Temperatura forno de 43 °C	32,61	1,15	43105	1,00	1,19	10706	1,00
Proporção de fase móvel 77:23	28,14	1,16	21651	1,00	1,23	9881	1,00
Proporção de fase móvel 73:27	30,20	1,17	81393	1,00	1,15	21090	1,00
TFA 0,08%	33,74	1,19	45601	1,00	1,20	10632	1,00
TFA 0,12%	38,26	1,28	43869	1,00	1,25	9285	1,00
Sem filtrar	32,25	1,15	45026	1,00	1,20	10884	1,00

Figura 27: Resultados da solução de adequabilidade, solução com precursor e PSMA frio (Fonte: o autor, 2020).

A amostra utilizada foi do lote produzido - lote PMA13092019-A e foram quantificados o pico de PSMA, o pico do precursor e mais 4 impurezas desconhecidas. As tabelas abaixo apresentam o DPR que é a variação percentual da condição encontrada (variação) frente à condição controle. Não houve nenhuma alteração significativa nas variações, ou seja, o método mostrou-se robusto para todas as alterações. A maior variação encontrada foi na proporção de TFA de 0,08% na quantificação da impureza 3, onde houve uma variação de DPR de 10,68% frente a condição controle, conforme pode ser observado na figura 28. Nessa faixa de concentração de quantificação de 0,20 µg/mL como é o caso da impureza 3, o máximo DPR máximo aceito é de 11% conforme a tabela 3. Por fim, foi avaliada uma amostra sem filtrar frente a uma amostra filtrada a 0,22 µm. Não houve diferença significativa, ou seja, esse filtro não retém o ativo.

Resultados Amostra Controle		Fluxo de 1,35 mL/min		Fluxo de 1,45 mL/min	
Picos	Concentração (µg/mL)	Concentração (µg/mL)	DPR frente ao controle (%)	Concentração (µg/mL)	DPR frente ao controle (%)
PSMA	0,86	0,79	5,96	0,87	0,98
Precursor	0,09	0,09	3,44	0,10	2,87
Impureza 1	0,60	0,60	0,65	0,61	0,87
Impureza 2	0,62	0,62	0,09	0,62	0,35
Impureza 3	0,23	0,23	0,06	0,23	0,17
Impureza 4	2,18	2,38	6,30	2,16	0,51

Parâmetros Analíticos da Amostra Coluna 37 °C				Parâmetros Analíticos da Amostra coluna 43°C			
Picos	Área (mAU)	Quantificação (µg/mL)	DPR (%)	Picos	Área (mAU)	Quantificação (µg/mL)	DPR (%)
PSMA	53163	0,89	2,25	PSMA	44712	0,75	9,49
Precursor	5083	0,09	4,64	Precursor	5302	0,09	1,17
Impureza 1	37498	0,63	3,36	Impureza 1	36131	0,61	1,22
Impureza 2	38417	0,64	2,59	Impureza 2	37393	0,63	1,17
Impureza 3	13969	0,23	1,15	Impureza 3	13748	0,23	0,51

Parâmetros Analíticos da Amostra TFA 0,08%				Parâmetros Analíticos da Amostra TFA 0,12%			
Picos	Área (mAU)	Quantificação (µg/mL)	DPR (%)	Picos	Área (mAU)	Quantificação (µg/ml)	DPR (%)
PSMA	48066	0,81	4,15	PSMA	52025	0,86	0,53
Precursor	5166	0,09	2,77	Precursor	5360	0,09	2,13
Impureza 1	30848	0,52	9,70	Impureza 1	34619	0,57	3,54
Impureza 2	34908	0,59	3,45	Impureza 2	34897	0,57	5,45
Impureza 3	11694	0,20	10,68	Impureza 3	13313	0,22	3,50
Impureza 4	124000	2,10	2,77	Impureza 4	132239	2,17	0,20

Parâmetros Analíticos da Amostra FM 73:27				Parâmetros Analíticos da Amostra FM 77:23			
Picos	Área (mAU)	Quantificação (µg/mL)	DPR (%)	Picos	Área (mAU)	Quantificação (µg/ml)	DPR (%)
PSMA	48561	0,81	4,20	PSMA	50839	0,85	1,39
Precursor	5162	0,09	3,59	Precursor	5276	0,09	2,48
Impureza 1	37678	0,63	3,65	Impureza 1	38318	0,64	4,41
Impureza 2	37581	0,63	0,99	Impureza 2	37220	0,62	0,13
Impureza 3	13078	0,22	3,56	Impureza 3	14290	0,24	2,27
Impureza 4	128242	2,14	1,17	Impureza 4	129852	2,16	0,72

Robustez – Condição Original (filtro 0,22 µm cathivex gv)						
Parâmetros Analíticos Padrão PSMA			Parâmetros Analíticos Padrão precursor PSMA			
Área Padrão (mAU)			604993		Área Padrão (mAU)	
			661081			
Parâmetros Adequabilidade sem filtrar						
Amostras	Área PSMA	Área Precursor	Áreas Médias PSMA	Áreas Médias Precursor	DPR PSMA	DPR Precursor
Replicata 1	606747	656217	605487	655174	0,06	0,63
Replicata 2	604226	654131				

Figura 28: Variações da robustez frente à condição controle (Fonte: o autor, 2020).

### 5.3. Solventes Residuais (Etanol e DMSO)

#### 5.3.1. Desenvolvimento da Metodologia

O desenvolvimento do método iniciou com o desafio de conciliar em uma mesma corrida cromatográfica dois solventes tão distintos como o etanol e o DMSO (dimetilsulfóxido). A temperatura de ebulição aproximada do etanol é de 78 °C e do DMSO é de 189 °C. Dessa forma, a temperatura utilizada no injetor foi de 250 °C e do detector de 300 °C, uma vez que é utilizada a injeção líquida e essa amostra deve ingressar na coluna na sua forma gasosa.

Os primeiros testes utilizaram uma rampa de temperatura na coluna mais branda, com tempo de corrida de 10 minutos, conforme figura 29 do gradiente de temperatura e figura 30 com o respectivo cromatograma. Na figura 30 é possível observar que o pico do DMSO não está separado.

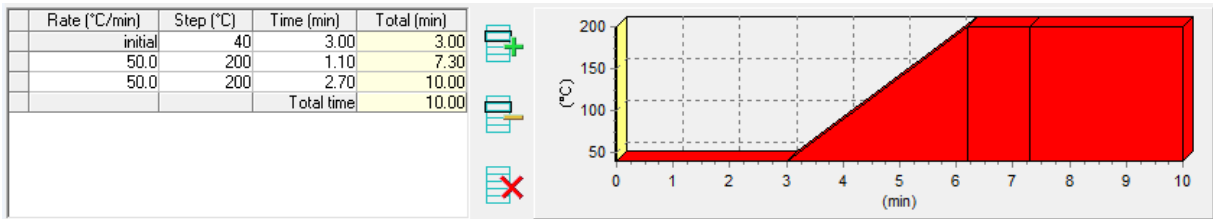


Figura 29: Rampa de temperatura da coluna (Fonte: o autor, 2020).

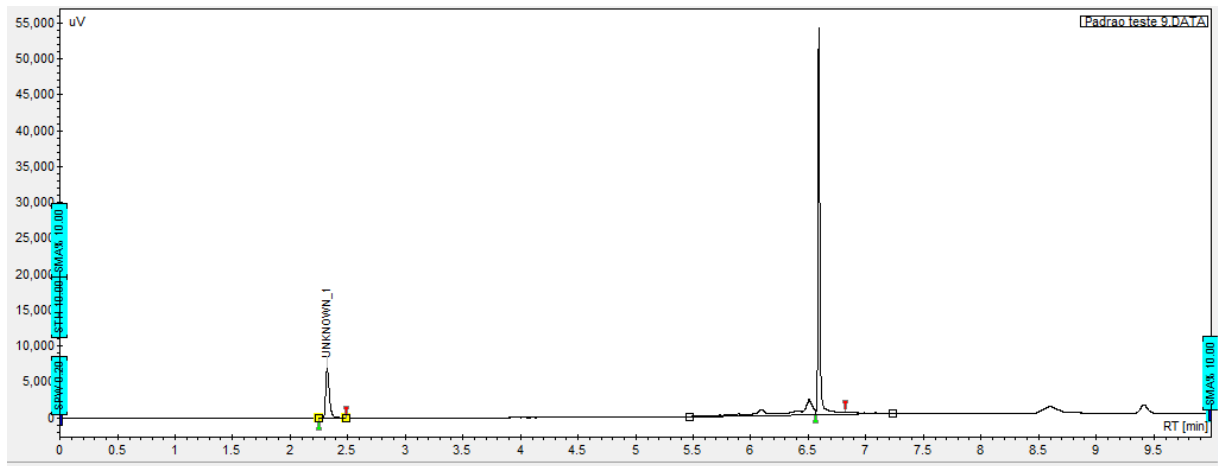


Figura 30: Cromatograma da solução adequabilidade, etanol à esquerda e DMSO à direita (Fonte: o autor, 2020).

Após diversas rampas com a finalidade de separar esses picos, foi necessário deixar a corrida mais longa para que um aquecimento de menor incremento separasse os picos. Dessa forma, o método foi finalizado com uma corrida de aproximadamente 23 minutos como pode ser visualizado na figura 31.

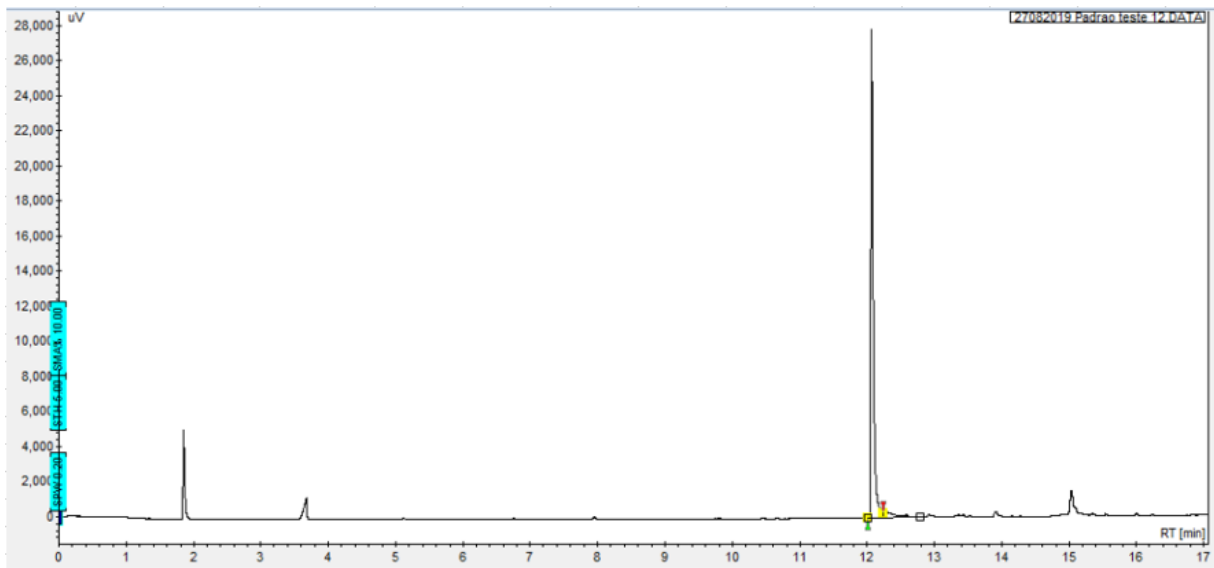


Figura 31: Cromatograma do método fechado (Fonte: o autor, 2020).

Após o desenvolvimento do método foi iniciada a validação.

### 5.3.2. Validação

#### 5.3.2.1. Seletividade

Foram avaliadas diferentes amostras com a finalidade de comprovar a capacidade do método de quantificar somente o analito de interesse. A figura 32 apresenta todas as amostras sobrepostas, onde é possível observar que nos tempos de retenção do etanol e do dimetilsulfóxido não há co-eluição da matriz e nem de solventes (foi injetado fase móvel, placebo, os ativos etanol e DMSO isolados, na mesma solução e uma amostra).

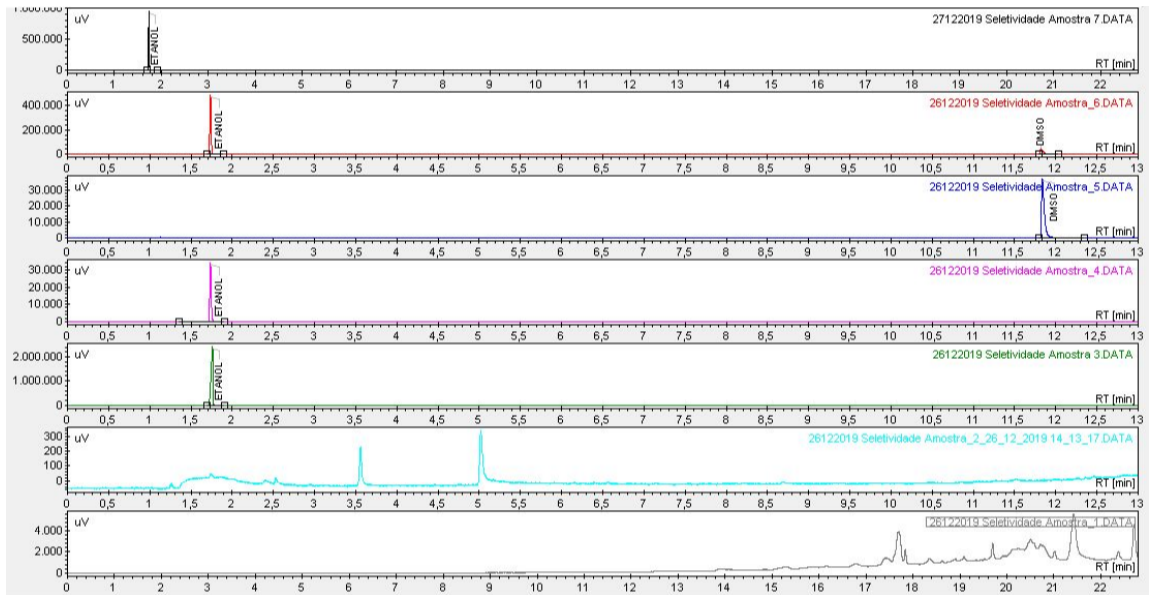


Figura 32: Seletividade de solventes residuais (Fonte: o autor, 2020).

A figura 33 apresenta o cromatograma de uma solução de calibração (etanol e DMSO).

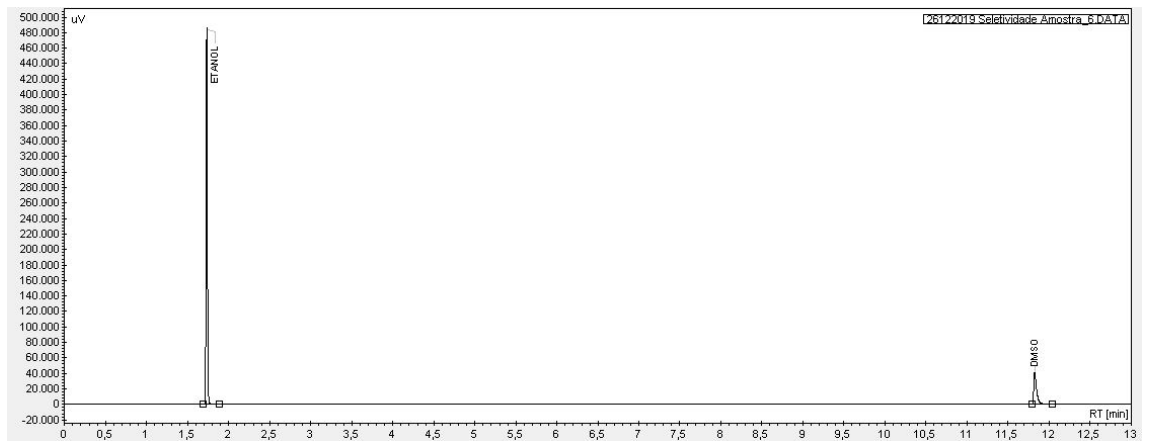


Figura 33: solução adequabilidade (Fonte: o autor, 2020).

Na figura 34 pode-se visualizar a injeção de uma amostra de PSMA-1007 (18F) e observa-se que não há a co-eluição de picos no tempo de retenção do etanol e nem do dimetilsulfóxido, ou seja, é possível avaliar os picos sem a presença de interferentes.

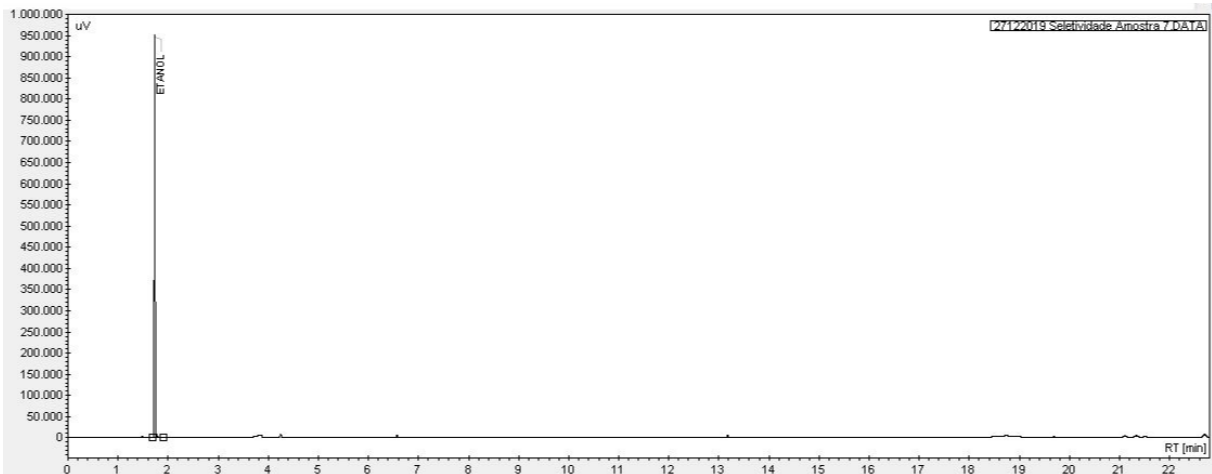


Figura 34: amostra de PSMA-1007 (18F) (Fonte: o autor, 2020)

### 5.3.2.2. Limite de Quantificação

Nas figuras 35 e 36 é possível observar os limites de quantificação do precursor de etanol e do DMSO, com as respectivas concentrações utilizadas para a plotagem da curva. Como pode ser observado nas figuras, os limites de quantificação foram de 0,0495 % para o etanol e de 0,1159 % para o DMSO.

Curva	Concentração (% v/v)	Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Intersecção	Inclinação
Curva 1	0,10	48718	1213,10	491807,00
	0,20	97690		
	0,30	148606		
	0,40	210591		
	0,50	238171		
Curva 2	0,10	51998	5518,60	450698,00
	0,20	96345		
	0,30	139900		
	0,40	179755		
	0,50	235642		
Curva 3	0,10	48659	4907,30	470483,00
	0,20	102433		
	0,30	148230		
	0,40	191644		
	0,50	239295		
<b>Média inclinação</b>				<b>470996,00</b>
<b>DP Intersecção com o eixo Y</b>				<b>2329,45</b>
<b>LD (%)</b>				<b>0,0148</b>
<b>LQ (%)</b>				<b>0,0495</b>

Figura 35: Limite de quantificação para o etanol (Fonte: o autor, 2020).



Curva	Concentração (% mg/mL)	Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Intersecção	Inclinação
Curva 1	0,10	81918	-10355,10	936633,00
	0,20	182052		
	0,30	269897		
	0,40	356093		
	0,50	463214		
Curva 2	0,10	84393	2311,90	860317,00
	0,20	173623		
	0,30	268017		
	0,40	349278		
	0,50	426724		
Curva 3	0,10	97575	10101,30	876059,00
	0,20	172525		
	0,30	288000		
	0,40	369256		
	0,50	437239		
<b>Média inclinação</b>			<b>891003,00</b>	
<b>DP Intersecção com o eixo Y</b>			<b>10324,66</b>	
<b>LD (%)</b>			<b>0,0348</b>	
<b>LQ (%)</b>			<b>0,1159</b>	

Figura 36: Limite de quantificação para o DMSO (Fonte: o autor, 2020).

### 5.3.2.3. Linearidade

Nas figuras 37 e 38 é possível observar os resultados da linearidade do etanol e do DMSO, com as respectivas concentrações utilizadas para a plotagem da curva. Como pode ser observado nos cálculos dos dois compostos há relação linear adequada dos dados, uma vez que o valor de “r” foi superior a 0,99.

<b>Volume pipetado (µL)</b>	<b>Concentração de etanol (%)</b>	<b>Área (µV.s)</b>
5	0,05	20741
	0,05	21524
	0,05	23605
200	2,00	872943
	2,00	850655
	2,00	871789
400	4,00	1388483
	4,00	1446366
	4,00	1500613
600,0	6,00	1967422
	6,00	2113055
	6,00	1958388
800	8,00	2648196
	8,00	2661220
	8,00	2611661
1000	10,00	3276245
	10,00	3505683
	10,00	3054524
1200	12,00	4253939
	12,00	4208357
	12,00	4301644
<b>Coefficiente de correlação (r)</b>		<b>0,9950</b>
<b>Intersecção com o eixo Y</b>		<b>60729,22</b>
<b>Coefficiente angular</b>		<b>335170,33</b>

Figura 37: Resultados linearidade do etanol (Fonte: o autor, 2020).

Volume pipetado (µL)	Concentração de Dimetilsulfóxido (%)	Área (µV.s)
10	0,00110	97539
	0,00110	91551
	0,00110	97033
13,7	0,00151	138335
	0,00151	139329
	0,00151	137746
182	0,02002	1789853
	0,02002	1741011
	0,02002	1792434
273,0	0,03003	2644644
	0,03003	2669450
	0,03003	2619725
364	0,04004	3394531
	0,04004	3484658
	0,04004	3505144
455	0,05005	4099165
	0,05005	4111590
	0,05005	4336556
546	0,06006	4974576
	0,06006	4968713
	0,06006	5231582
<b>Coeficiente de correlação (r)</b>		<b>0,9989</b>
<b>Intersecção com o eixo Y</b>		<b>46270,04</b>
<b>Coeficiente angular</b>		<b>83977200,39</b>

Figura 38: Resultados linearidade do DMSO (Fonte: o autor, 2020).

Nas figuras 39 e 40 é possível observar a avaliação dos resíduos da linearidade, onde a mesma é realizada para estimar os valores de “y” encontrados com os valores estimados pela equação. Pode-se observar nas figuras a distribuição homocedástica dos resíduos e a ausência de pontos fora da curva, uma vez que não foi encontrado nenhum resíduo com variação superior a 3 unidades.



Figura 39: Resultados resíduos etanol (Fonte: o autor, 2020).

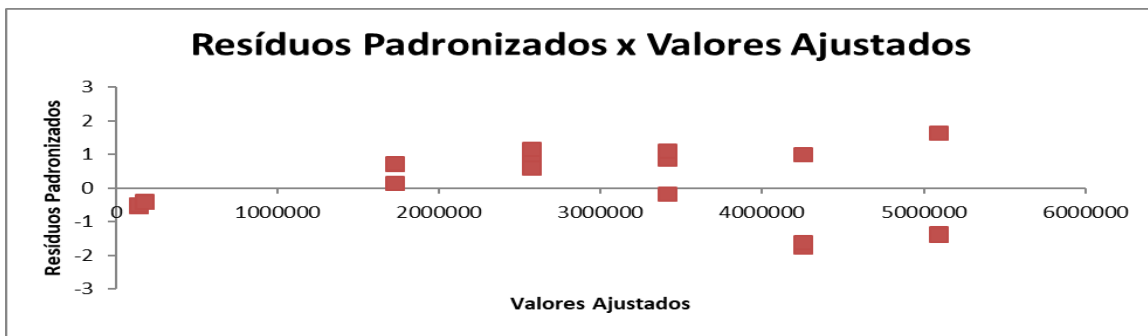


Figura 40: Resultados resíduos DMSO (Fonte: o autor, 2020).

#### 5.3.2.4. Precisão

Nas figuras 41 e 42 é possível observar a comparação da repetibilidade com a precisão intermediária, onde foram utilizadas as mesmas condições cromatográficas, com analistas distintos em dias distintos. Foram utilizadas nove concentrações para o etanol, três baixas (0,05%), três médias (10,0 %) e três altas (12,0% µg/mL). Também foram utilizadas nove concentrações para o DMSO três baixas (0,11%), três médias (0,5%) e três altas (0,6%). Os critérios de aceitação são de 10% para o desvio padrão relativo das replicatas.

Consolidação dos resultados (repetibilidade x precisão intermediária) Etanol		
Amostra	Analista 1	Analista 2
1	91,73	107,97
2	106,36	100,48
3	101,86	99,08
4	96,92	97,19
5	97,66	95,18
6	95,73	92,86
7	93,10	95,46
8	95,12	95,67
9	97,25	94,01
<b>Média (%)</b> $n = 18$		97,42
<b>DP</b> $n = 18$		4,39
<b>DPR</b> $n = 18$		4,50

Figura 41: Repetibilidade x precisão intermediária do etanol (Fonte: o autor, 2020).

Consolidação dos resultados (repetibilidade x precisão intermediária) DMSO		
Amostra	Analista 1	Analista 2
1	98,85	101,48
2	99,22	103,31
3	93,58	102,05
4	101,21	100,29
5	95,24	92,44
6	104,62	102,23
7	91,91	104,21
8	99,74	104,58
9	92,68	103,57
<b>Média (%)</b> $n = 18$		99,51
<b>DP</b> $n = 18$		4,44
<b>DPR</b> $n = 18$		4,46

Figura 42: Repetibilidade x precisão intermediária DMSO (Fonte: o autor, 2020).

### 5.3.2.5. Exatidão

Nas figuras 43 e 44 é possível observar os resultados da exatidão, sendo os critérios de aceitação para a recuperação  $100 \pm 10\%$ . Foram analisadas nove concentrações, três baixas, três médias e três altas e todas atendem a esse critério, ou seja, o placebo não interfere na quantificação dos resultados.

Concentração (%)	Volume ( $\mu\text{L}$ )	Concentração Teórica Etanol (%)	Área ( $\mu\text{V.s}$ )	Concentração Etanol (%)	Recuperação (%)	Recuperação Média (%)	DPR (%)
LQ	5	0,0500	34474	0,05	91,73	99,98	7,50
	5	0,0500	39974	0,05	106,36		
	5	0,0500	38282	0,05	101,86		
100	1000	10,0000	7285319	9,69	96,92	96,77	1,01
	1000	10,0000	7340414	9,77	97,66		
	1000	10,0000	7195489	9,57	95,73		
120	1200	12,0000	8397880	11,17	93,10	95,16	2,18
	1200	12,0000	8579759	11,41	95,12		
	1200	12,0000	8771924	11,67	97,25		
<b>Média (%)</b>					<b>97,30</b>		
<b>DP</b>					<b>4,46</b>		
<b>DPR</b>					<b>4,58</b>		

Figura 43: Resultados exatidão do etanol (Fonte: o autor, 2020).

Concentração (%)	Volume (µL)	Concentração Teórica DMSO (%)	Área (µV.s)	Concentração DMSO (%)	Recuperação (%)	Recuperação Média (%)	DPR (%)
LQ	10	0,1100	93798	0,11	98,85	97,22	3,25
	10	0,1100	94148	0,11	99,22		
	10	0,1100	88796	0,10	93,58		
100	455	5,0050	4369830	5,07	101,21	100,36	4,73
	455	5,0050	4112005	4,77	95,24		
	455	5,0050	4517007	5,24	104,62		
120	546	6,0060	4761970	5,52	91,91	94,78	4,55
	546	6,0060	5167395	5,99	99,74		
	546	6,0060	4801527	5,57	92,68		
<b>Média (%)</b>					<b>97,45</b>		
<b>DP</b>					<b>4,32</b>		
<b>DPR</b>					<b>4,43</b>		

Figura 44: Resultados exatidão DMSO (Fonte: o autor, 2020).

### 5.3.2.6. Robustez

Foram avaliadas as seguintes variações no método analítico: fluxo do gás de arraste, temperatura do forno e volume de injeção. A figura 45 apresenta todas as variações da solução adequabilidade. Os valores de cauda foram inferiores para as amostras de 0,8 µL e para a temperatura do forno de 35 °C em virtude de uma área mais baixa nessas injeções.

Parâmetro	Resolução	Cauda Etanol	Pratos Teóricos Etanol	Cauda DMSO	Pratos Teóricos DMSO
Condição Controle	182,77	2,21	17084	2,34	685242
Fluxo de 2,90 mL/min	204,98	2,10	24462	2,63	800592
Fluxo de 3,10 mL/min	201,84	2,24	22175	2,77	757310
Temperatura forno de 35 °C	205,46	1,37	25725	2,39	769338
Temperatura forno de 45 °C	218,45	2,14	34311	2,66	740645
Volume de injeção 0,8 µL	210,41	1,34	28414	2,50	753042
Volume de injeção 1,2 µL	199,52	1,66	22648	2,39	745957

Figura 45: Resultados da robustez (Fonte: o autor, 2020).

A amostra utilizada foi do lote PMA25102019-A. A única alteração significativa foi na injeção da coluna a 35°C e uma possibilidade seria a não ebulição total da amostra a essa temperatura na coluna. Nas demais condições, o método mostrou-se robusto.

## 5.4. Pureza Química por “Spot Test”

### 5.4.1. Desenvolvimento da Metodologia

Para esse ensaio, não houve um desenvolvimento específico para este radiofármaco. Realizou-se um método já conhecido para a quantificação de Tetrabutylamônio (TBA) de acordo com um ensaio limite. O *spot test* consiste em pipetar um padrão de TBA no limite de especificação de 0,2 mg/mL e da amostra. A mancha da amostra após a incubação em ambiente com cristais de iodo deve ser menos intensa do que a mancha da solução padrão. Para esse ensaio foram validados os parâmetros de seletividade, limite de detecção e de robustez.

## 5.4.2. Validação

### 5.4.2.1. Seletividade

Foram avaliadas diferentes amostras com a finalidade de comprovar a capacidade do método de diferenciar as amostras no limite de especificação. A figura 46 apresenta a mancha do padrão do lado esquerdo e a mancha da amostra do lado direito. A figura demonstra como a mancha do padrão é mais intensa do que a mancha da amostra.



Figura 46: Resultado da análise de especificidade. Lado esquerdo: padrão no limite de especificação. Lado direito: amostra (Fonte: o autor, 2020).

### 5.4.2.2. Limite de Detecção

Foram avaliados padrões com as concentrações de 25 a 200  $\mu\text{g/mL}$ , a partir da concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ . As manchas observadas foram bem nítidas, conforme apresentada na figura 47.



Figura 47: limite de detecção de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Fonte: o autor, 2020).

#### 5.4.2.3. Robustez

As variações foram de lote da placa de sílica, o volume de aplicação de  $3,0 \pm 0,2 \mu\text{L}$  e a micropipeta utilizada. Além disso, duas soluções de padrões (recentemente preparado com uma no final de seu prazo de validade). Todos os resultados garantiram a robustez do método.

#### 5.5. Análise de Identidade Radionuclídica

A identidade radionuclídica permitiu identificar o radioisótopo flúor-18 com tempo de meia-vida médio de 110 min (após três medidas dentro do intervalo de 15 minutos). Quanto à análise de pureza radionuclídica obteve-se pureza superior a 99,5%. Na figura 48 é apresentado o cromatograma de análise da pureza radionuclídica do lote PMA12032020-A. As contagens no canal de interesse comprovam as emissões em 511 keV.



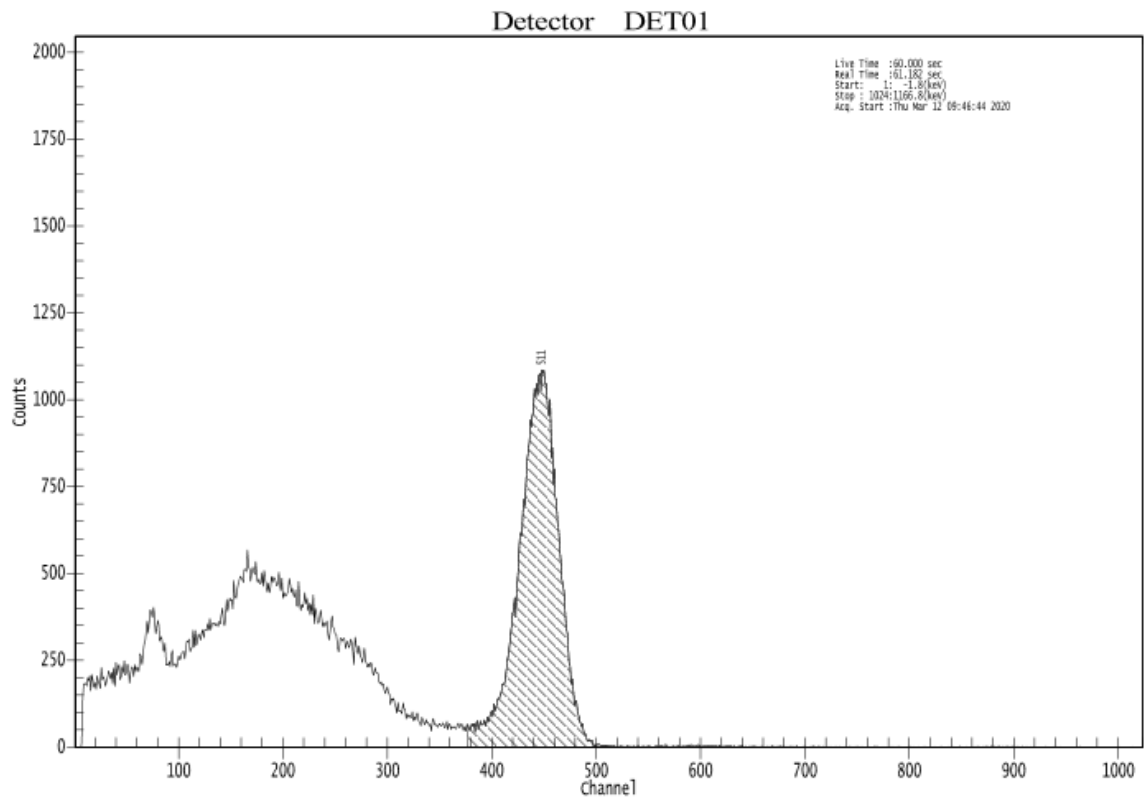


Figura 48: Espectroscopia gamma da amostra de PSMA-1007 (18F) (Fonte: o autor, 2020).

## 5.6. Análise de Endotoxinas e de Esterilidade

Os ensaios de esterilidade e endotoxinas bacterianas apresentaram resultados dentro das faixas especificadas na Farmacopeia Brasileira 6ª Edição - estéril e <17,5 EU/mL - respectivamente. O volume de 0,2 mL do produto PSMA-1007 (18F) inoculado diretamente nos dois tubos contendo os meios de cultura não apresentou crescimento de bactérias e fungos após 14 dias de incubação. A concentração de endotoxinas bacterianas encontrada foi <10 EU/mL para todas as amostras avaliadas.

## 5.7. Teste de Estudo de Estabilidade

Foi realizado um estudo de estabilidade por um período de 10 horas para avaliar se o radiofármaco PSMA-1007 (18F) seria estável nesse período. Foram avaliados dois frascos com distintas atividades, o primeiro continha 5115 MBq do produto e o segundo 27324 MBq. Foram envasados dois frascos com distintas atividades para avaliar se existia alguma diferença no processo de estabilidade, a

intenção era avaliar se uma amostra mais concentrada estava exposta a radiólise (a dissociação do composto marcado).

Foram realizadas retiradas de alíquotas nos tempos 0, 2, 4, 6, 8 e 10 horas e foram realizadas as análises de pureza radioquímica e de quantificação das impurezas orgânicas. Além disso, foi realizado teste de esterilidade da amostra do tempo zero e da amostra do tempo 10 horas para uma avaliação de uma possível contaminação microbiológica com a retirada de doses.

Os resultados encontram-se na figura 49 e todos os resultados estão semelhantes, ou seja, as duas concentrações de envase não sofrem radiólise e o medicamento apresentou estabilidade no período de 10 horas.

<b>Pureza Radioquímica 5115 MBq</b>						
<b>Tempos</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>10</b>
<b>%</b>	96,5	97,06	96,76	97,76	99,6	99,94

<b>Pureza Radioquímica 27324 MBq</b>						
<b>Tempos</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>10</b>
<b>%</b>	96,43	97,36	97,45	98,27	99,81	100

<b>Impurezas Orgânicas 5115 MBq</b>						
<b>Tempos</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>10</b>
<b>Imp Totais (%)</b>	3,19	3,21	3,15	3,15	3,19	3,2

<b>Impurezas Orgânicas 27324 MBq</b>						
<b>Tempos</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>10</b>
<b>Imp Totais (%)</b>	3,19	3,18	3,14	3,16	3,16	3,16

Figura 49: Resultados do teste de estabilidade (Fonte: o autor, 2020).

## 6. CONCLUSÕES

Os métodos de controle de qualidade propostos foram desenvolvidos e validados de acordo com a RDC 166 de 2017 da Anvisa e atendem aos seus critérios. Todas as análises estão implementadas e fazem parte da rotina do Centro de Produção de Radiofármacos do Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul.

É importante ressaltar que todos os equipamentos utilizados estão qualificados, possuem um sistema computadorizado também validado. As planilhas utilizadas para a quantificação de lotes e de produtos em estabilidade também estão validadas.

Todos os métodos desenvolvidos e validados estão aptos para a realização das análises, ou seja, a premissa de que a validação é realizada para assegurar a correta quantificação das amostras de interesse foi realizada.

No método de solventes residuais, a única condição que não demonstrou robustez foi para a temperatura inicial da coluna de 35°C, em virtude disso essa variação não pode ser implementada. A temperatura inicial deve ser de 40 °C ou de 45 °C.

O teste de estabilidade no período de 10 horas demonstrou que o medicamento se manteve estável tanto para o envase de 5115 MBq como no envase de 27324 MBq. Assim, não houve a presença de radiólise.

## 7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

O próximo trabalho que deverá ser realizado no Centro de Produção de Radiofármacos é o desenvolvimento e a validação de metodologias para o radiofármaco Florbetaben ( $^{18}\text{F}$ ) indicado para auxiliar no diagnóstico da doença de Alzheimer.

Para os trabalhos futuros poderia ser utilizado o injetor automático para a metodologia de solventes residuais, o que poderia garantir resultados ainda mais precisos, uma vez que os desvios padrões relativos da metodologia passariam de 10% para 5% de variação máxima aceita.

A utilização de pHmetro com micro eletrodo deve ser implementada para que haja a substituição da análise manual que é realizada com as fitas de pH.

## 8. REFERÊNCIAS

JÚNIOR, A.J. et al. Câncer de Próstata: Métodos de Diagnóstico, Prevenção e Tratamento. Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research. 2015 Mar; 10 (3): 40-46.

Instituto Nacional do Câncer. Próstata. 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-prostata>. Acesso em janeiro de 2020.

Instituto Nacional do Câncer. Programa Nacional de Controle do Câncer de Próstata. Ministério da Saúde. (2002): 1-32.

American Cancer Society. Key Statistics for Prostate Cancer. 2020. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/about/key-statistics.html>. Acesso em janeiro de 2020.

TONON, T.C, et al. Câncer de Próstata: Uma Revisão de Literatura. Revista Saúde e Pesquisa. 2009 Set; 2 (3): 403-410.

DESCOTES, J.C. Diagnostico of prostate cancer. Asian Journal of Urology. 2019 Apr; 6 (2): 129-136.

ROBILOTTA, C.C. A Tomografia por Emissão de Pósitrons: Uma Nova Modalidade na Medicina Nuclear Brasileira. Revista Pan Americana de Salud Publica. 2006; 20 (2/3): 134-142.

KHALIL, MAGDY. M. Basic Sciences of Nuclear Medicine. Berlim: Springer, 2011. 423 p.

MILLER P. W., *et al.* "Synthesis of  $^{11}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{15}\text{O}$ , and  $^{13}\text{N}$  radiolabels for positron emission tomography." *AngewChemInt Ed Engl* (2008) 47(47): 8998-9033.

HOGG, *et al.*, EUROPEAN ASSOCIATION OF NUCLEAR MEDICINE. *Principal and Practices of PET/CT*. (2010): 1-101.

ROWE, S.P. PET imaging of prostate-specific membrane antigen in prostate cancer: current state of the art and future challenges. *Prostate cancer and prostatic diseases*. 2016 Sep; 19(3): 223-230.

CECI, F., *et al.* *Molecular Imaging and Precision Medicine in Prostate Cancer*. *PET Clinics*. 2017 Jan; 12 (1): 83-92.

EVANS, J.D., *et al.* Prostate cancer-specific PET radiotracers: A review on the clinical utility in recurrent disease. *Practical Radiation Oncology*. 2018 Jan; 8 (1): 28-39.

KESCH, C., *et al.*  $^{68}\text{Ga}$  or  $^{18}\text{F}$  for Prostate Cancer Imaging? *Journal of Nuclear Medicine*. 2017 May; 58 (5): 687-688.

TRASIS, *Manual AllinOne  $^{18}\text{F}$ -PSMA1007 Specific Application Manual*. (2019): 1-37.

GIESEL, *et al.*, F-18 Labelled PSMA-1007: biodistribution, radiation dosimetry and histopathological validation of tumor lesions in prostate cancer patients. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2017 Apr ;44 (4): 678-688.

GIESEL, *et al.*, Intraindividual comparison of  $^{18}\text{F}$ -PSMA-1007 and  $^{18}\text{F}$ -Dcfpyl in the prospective evaluation of patients with newly diagnosed prostate carcinoma: a pilot study. *Journal of Nuclear Medicine*. 2018 Jul; 59(7): 1076-1080.

GIL, E. S. Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos. 3ª Edição. 2010. 29-36.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. Volume 1. 6ª Edição. 2019

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA: USP 38. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2015.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 1467 *Residual Solvents – Verification of Compendial Procedures and Validation of Alternative Procedures*: USP 38. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2015.

AOAC INTERNATIONAL, Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements, 2016.

ANVISA, RDC 166 de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências.

ANVISA, RDC 318 de 6 de novembro de 2019. Estabelece os critérios para a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos medicamentos, exceto biológicos, e dá outras providências.

RDC 301 de 21 de agosto de 2019. Dispõe sobre as diretrizes gerais de boas práticas de fabricação de medicamentos.

COUNCIL OF EUROPE, EDQM, edition 2018. Guide for the elaboration of monographs on radiopharmaceuticals preparations.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Pró-Reitoria de Graduação  
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar  
Porto Alegre - RS - Brasil  
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564  
E-mail: [prograd@pucrs.br](mailto:prograd@pucrs.br)  
Site: [www.pucrs.br](http://www.pucrs.br)