



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**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**

CAROLINA SILVA FERREIRA DOS SANTOS

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

**Orientadora:
Profa. Dra. Elaine Bortoleti de Araújo**

**São Paulo
2022**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**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**

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

CAROLINA SILVA FERREIRA DOS SANTOS

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

**Orientadora:
Profa. Dra. Elaine Bortoleti de Araújo**

**São Paulo
2022**

Fonte de Financiamento: FAPESP nº 2019/10110-4

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Como citar:

SILVA FERREIRA DOS SANTOS, C. **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. 188 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo. Disponível em: <<http://repositorio.ipen.br/>> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Silva Ferreira dos Santos, Carolina
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 / Carolina Silva Ferreira dos Santos; orientadora Elaine Bortoleti de Araújo. -- São Paulo, 2022.
188 f.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2022.

1. PSMA-1007. 2. câncer de próstata. 3. flúor-18. 4. validação do CCD-SG para pureza radioquímica. 5. PET/CT. I. Bortoleti de Araújo, Elaine, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Carolina Silva Ferreira dos Santos

**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**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data da defesa: 27/01/2022

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Elaine Bortoleti de Araújo
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – CECRF
(Presidente) Julgamento: Aprovado

Prof^a Dra. Simone Odília Antunes Fernandes
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Fábio Luiz Navarro Marques
Hospital das Clínicas – HCFMUSP Julgamento: Aprovado

Dedicatória

Ao meus pais José e Ana Maria,
minha irmã Gabriela,
meu marido Renan,
meus tios Darcy e Cristina
“in memoriam” minha avó Maria Maggy

Agradecimentos

Agradeço primeiramente meus pais, por me darem suporte de todas as maneiras possíveis para que este trabalho seja realizado, sem vocês eu não teria chegado tão longe.

Ao meu noivo Renan, que sempre me deu forças para continuar lutando e nunca desistiu de mim.

À minha irmã Gabriela, por sempre me fazer rir e me apoiar nos momentos difíceis.

Aos meus tios Darcy e Cristina, pelo carinho e apoio.

“In Memoriam” da minha querida avó Maria Maggy, que sempre foi e sempre será minha guia.

Eu amo vocês. Vocês são a razão deste trabalho.

Em especial a minha orientadora, Dra. Elaine, que sempre estava disposta a me ouvir e me ajudar. Obrigada por esses anos de aprendizado, pela paciência e por confiar em mim. Foi uma honra.

Ao Dr. Luis Alberto, que me abriu as portas do Centro de Radiofarmácia e sempre estava disposto a ajudar.

Ao Dr. Efrain, que tenho extrema admiração, me ajudando direta e indiretamente para que meu trabalho pudesse ser realizado.

À Dra. Margareth, por todo o tempo e ensinamentos prestados.

Ao Dr. Henrique, que foi mais do que um professor, e sim um amigo que admiro e respeito.

À Dra Maria Helena e seu aluno Felipe, pelo suporte com os ensaios pré-clínicos e orientações.

Ao Dr. Jonnatan, que foi meu primeiro coorientador e um grande amigo no IPEN, seus conselhos foram de extrema importância para mim.

À equipe do Biotério, em especial a Ismária, que me ajudaram no preparo e no cuidado com os animais.

Aos funcionários do Centro de Radiofarmácia e Aceleradores de Cíclotron:

À equipe do controle de qualidade: José Luiz, Vivian, Lígia, Ideli, Cabral, Jurandir, Laércio, Patrícia, Raquel e tantos outros que me ajudaram e tiveram papel essencial neste trabalho.

À equipe da produção e radioproteção: Carneiro, Cléo, Jamil, Edivaldo, Rosana, Valdemar, Wellington, Eliseu, Paulo, Reginaldo, Olavo, Teresa, Robson, Wagner, Adilson, Mauro e demais colegas que sempre estavam dispostos a ajudar e a conversar.

À equipe da AMAZUL: Tabata, Diogo, Joel, Ricardo, Fernando, Carlos, Romulo, e em especial Eduardo, que me auxiliou no processo de compra dos kits de marcação do começo ao fim.

À todo o grupo de alunos de pós-graduação: Renata, Bianca, Sofia, Maria Ângela, Dino, Arian, Martha, Yasniel, Jonhnatan e a tantos outros colegas que compartilharam comigo esta jornada.

Em especial ao Cristian, Angélica e a Luíza, quem me ensinaram e me ajudaram dentro e fora do trabalho, se tornando grandes amigos.

Aos membros da Banca Examinadora, por aceitarem o convite.

Ao IPEN, disponibilizando local, estrutura e recursos para o andamento e finalização do trabalho.

À FAPESP, pela bolsa concedida (projeto N° 2019/10110-4)

E por último À Deus, que por mais falha seja minha fé, sempre esteve comigo diariamente.

“Porque – disse ela – quando você tem medo e faz mesmo assim, isso é coragem.”

Coraline - Neil Gaiman

RESUMO

SILVA FERREIRA DOS SANTOS, C. Estudos de Adequação da Radiomarcção do PSMA-1007 com flúor-18 – Validação da Metodologia Analítica e Avaliação pré-clínica no Diagnóstico de Câncer de Próstata. 2022. 188 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN – CNEN/SP. São Paulo

O PSMA-1007-¹⁸F é um radiotraçador desenvolvido para procedimento diagnóstico de câncer de próstata por tomografia de emissão de pósitrons. Por ser marcado com o radionuclídeo flúor-18, que possui energia de pósitrons baixa, oferece melhor qualidade de imagem, e a meia-vida física de 110 minutos permite o transporte para centros de medicina nuclear mais distantes, sendo estas algumas vantagens em relação ao radiofármaco PSMA-11 marcado com gálio-68. Além disso, o PSMA-1007-¹⁸F é eliminado principalmente pela via hepatobiliar, apresentando quase nenhuma atividade pela via urinária, proporcionando condições ideais para a detecção de lesões focais da próstata. A produção do PSMA-1007-¹⁸F em módulo de síntese automatizado obteve rendimento de marcação médio de 47,4% ± 21,5% e os resultados analíticos apresentaram resultados satisfatórios, com exceção do teor de etanol em alguns lotes. A porcentagem média de pureza radioquímica do PSMA-1007-¹⁸F foi de 95,89% ± 1,32%, utilizando fitas de sílica gel com base de alumínio para a determinação do flúor-18 livre em cromatografia de camada delgada. A validação dessa metodologia analítica para determinação do flúor-18 foi realizada com o produto radiomarcado. A robustez do método cromatográfico usado para a detecção do tetrabutylamônio foi demonstrada. Os ensaios pré-clínicos contaram com duas linhagens de animais (BALB/c e SCID) e com a linhagem tumoral LNCaP, células que apresentam receptores de PSMA. Nos estudos de competição foi possível atestar a especificidade do radiofármaco com alta captação no tumor, com bloqueio efetivo do material radioativo em 31,88%. Os ensaios de biodistribuição e de farmacocinética corroboraram resultados da literatura referentes à ligação específica do radiofármaco pelo PSMA, demonstrando captação elevada em órgãos que

expressam essa glicoproteína. As imagens de tomografia por emissão de pósitrons do PSMA-1007-¹⁸F em animais com tumor com e sem a presença do agente competidor PSMA I&T corroboraram a especificidade. Os resultados apresentados neste trabalho serão importantes para implantação da produção do PSMA-1007-¹⁸F, complementando os estudos no país sobre este radiotraçador, viabilizando sua comercialização mediante notificação ou registro junto à ANVISA.

Palavras-chave: PSMA-1007; câncer de próstata; flúor-18; validação do CCD-SG para pureza radioquímica; PET/CT.

SUMMARY

SILVA FERREIRA DOS SANTOS, C. Studies on the Adequacy of Radiolabeling of PSMA-1007 with fluorine-18 - Validation of Analytical Methodology and Preclinical Evaluation in the Diagnosis of Prostate Cancer. 2022. 188 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN – CNEN/SP. São Paulo

The PSMA-1007-¹⁸F is a radiotracer developed for the diagnostic procedures of prostate cancer by positron emission tomography. Because it is labeled with the fluor-18 radionuclide, which has low positron energy, it offers better image quality, and the physical half-life of 110 minutes allows transport to more distant nuclear medicine centers, these being some advantages in relation to the radiopharmaceutical PSMA-11 labeled with gallium-68. In addition, PSMA-1007-¹⁸F is mainly eliminated via the hepatobiliary route, with almost no urinary activity, providing ideal conditions for detecting focal prostate lesions. The production of PSMA-1007-¹⁸F in an automated synthesis module obtained an average labeling yield of 47.4% ± 21.5% and the analytical results showed satisfactory results, with the exception of the ethanol content in some batches. The average percentage of radiochemical purity of PSMA-1007-¹⁸F was 95.89% ± 1.32%, using aluminum-based silica gel strips for the determination of free fluorine-18 in thin layer chromatography. The validation of this analytical methodology for the determination of fluorine-18 was carried out with the radiolabeled product. The robustness of the chromatographic method used for the detection of tetrabutylammonium was demonstrated. The preclinical trials were carried out with two animal lines (BALB/c and SCID) and tumor line LNCaP cells that present PSMA receptors. In competition studies it was possible to attest the specificity of the radiopharmaceutical with high uptake in the tumor, with effective blockade of the radioactive material in 31.88%. The biodistribution and pharmacokinetics assays corroborated literature results regarding the specific binding of the radiopharmaceutical by PSMA, showing high uptake in organs that express this glycoprotein. Positron emission tomography imaging of ¹⁸F-PSMA-1007 in tumor animals with and without the

presence of the competing agent PSMA I&T supports this fact. The results presented in this work will be important for the implementation of ^{18}F -PSMA-1007 production, complementing the studies in the country on this radiotracer, making its possible commercialization upon notification or registration with ANVISA.

Keywords: PSMA-1007; prostate cancer; ^{18}F -fluoride; TLC-SG validation for radiochemical purity; PET/CT.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre Ga-68 e o F-18	51
Tabela 2 - Itens que compõem o kit de marcação para a síntese do PSMA-1007- ¹⁸ F e suas respectivas funções	68
Tabela 3 - Fator de retenção das espécies radioquímicas do produto PSMA-1007- ¹⁸ F	100
Tabela 4 - Descrição do preparo das soluções testes para o ensaio de seletividade	101
Tabela 5 - Critério de aceitação para o ensaio de seletividade	102
Tabela 6 - Preparo das diluições das amostras para o ensaio de linearidade	103
Tabela 7 - Fatores escolhidos para o estudo de robustez, especificando os valores de alto e baixo nível.....	106
Tabela 8 - Esquema adotado nos experimentos de robustez considerando os fatores de alto e baixo nível.....	106
Tabela 9 - Rendimento de marcação do PSMA-1007- ¹⁸ F	110
Tabela 10 - Dados obtidos através da análise estatística da atividade encontrada nas amostras de PSMA-1007- ¹⁸ F na sua identificação radionuclídica	113
Tabela 11 - Impurezas radionuclídicas que podem ser encontradas na produção de radiofármacos marcados com flúor-18	115
Tabela 12 - Energias encontradas nas leituras das amostras de PSMA-1007- ¹⁸ F para a análise de pureza radionuclídica (n=5).....	115
Tabela 13 - Porcentagem de pureza radionuclídica de diferentes produções de PSMA-1007- ¹⁸ F	116
Tabela 14 - Porcentagem da pureza radioquímica das produções de PSMA-1007- ¹⁸ F (n=7).....	128
Tabela 15 - Concentrações de etanol e DMSO encontradas nas produções de PSMA-1007- ¹⁸ F e seus respectivos limites de aceitação	130
Tabela 16 - Concentrações de etanol nos lotes de PSMA-1007- ¹⁸ F e Volume máximo a ser administrado por dose (V) que não ultrapassa o limite de 2,5 g/dose	132

Tabela 17 - Estabilidade do produto PSMA-1007- ¹⁸ F avaliada por CCD-SG e CLAE (%PR) durante o período de 6 horas após a síntese em temperatura ambiente.....	141
Tabela 18 - Comparação entre os parâmetros farmacocinéticos de radiofármacos baseados em inibidores de PSMA em camundongos BALB/c machos sadios	148
Tabela 19 - Biodistribuição do PSMA-1007- ¹⁸ F (5,55 MBq; administração intravenosa) em camundongos BALB/c machos sadios, expressa em %AI/g ou mL (n=4).....	149
Tabela 20 - Biodistribuição do PSMA-1007- ¹⁸ F (5,55 MBq; administração intravenosa) em camundongos BALB/c machos sadios, expressa em %AI/órgão (n=4)	151
Tabela 21 - Biodistribuição do PSMA-1007- ¹⁸ F (5,55 MBq; administração intravenosa) em camundongos SCID machos com tumor de próstata de células LNCaP expresso em %AI/g ou mL (n=5)	154
Tabela 22 - Biodistribuição do PSMA-1007- ¹⁸ F (5,55 MBq; administração intravenosa) em camundongos SCID machos com tumor de próstata de células LNCaP expresso em %AI/órgão (n=5).....	156
Tabela 23 - Razão entre a captação tumor/músculo e tumor/sangue no tempos estudados na biodistribuição de PSMA-1007- ¹⁸ F em camundongos SCID com modelo tumoral LNCaP. Valores calculados a partir da média dos %AI/g ou mL de cada material biológico e seu desvio padrão (n=5).....	158
Tabela 24 - Média da %AI/g ou mL dos grupos de animais com modelo tumoral LNCaP de 1 hora pós-injeção do PSMA-1007- ¹⁸ F com e sem o agente bloqueador PSMA I&T (n=5)	160
Tabela 25 - Razão entre a captação tumor/músculo e tumor/sangue no tempos de 1 hora pós-injeção na biodistribuição de PSMA-1007- ¹⁸ F com modelo tumoral LNCaP com e sem a presença do agente bloqueador PSMA I&T. Valores calculados a partir da média dos %AI/g ou mL de cada material biológico (n=5).....	161
Tabela 26 - Valores de SUV do músculo e de órgãos que expressam os receptores de PSMA em camundongos SDIC com modelo tumoral LNCaP 1 hora, 2 horas e 1 hora com agente bloqueador PSMA I&T pós-injeção do PSMA-1007- ¹⁸ F, obtidos a partir da imagem PET/CT	162

Tabela 27 - Fator de retenção das soluções testes do ensaio de seletividade do PSMA-1007- ¹⁸ F e seu critério de aceitação	166
Tabela 28 - Resultados da adequação dos dados ao modelo estatístico escolhido no ensaio de linearidade do PSMA-1007- ¹⁸ F	168
Tabela 29 - Análise estatística dos resíduos resultantes da regressão linear do ensaio de linearidade do PSMA-1007- ¹⁸ F	168
Tabela 30 - Pureza radioquímica encontrada no ensaio de precisão do PSMA-1007- ¹⁸ F, seu desvio padrão e desvio padrão relativo.	170
Tabela 31 - Resultado da porcentagem de pureza radioquímica (%PR) para o ensaio de robustez do PSMA-1007- ¹⁸ F	171
Tabela 32 - Resultado da distribuição de T de Student para o ensaio de robustez do PSMA-1007- ¹⁸ F	172

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Inibidores de PSMA à base de ureia Bi-PSMA- ¹⁸ F e DCPyL- ¹⁸ F	31
Figura 2 - Ilustração da próstata e do câncer de próstata	35
Figura 3 - Princípio da formação da imagem PET (a) e SPECT (b).....	40
Figura 4 - Comparação entre as moléculas de glicose e FDG- ¹⁸ F	42
Figura 5 - Ilustração da clivagem hidrolítica do substrato NAAG pelo PSMA (GCP II) em NAA e glutamato	43
Figura 6 - Representação do PSMA e seus domínios de interesse	44
Figura 7 - Estrutura molecular do farmacóforo à base de ureia, Lys-ureia-Glu, destacados da esquerda para a direita, respectivamente	46
Figura 8 - Exemplos de agentes quelantes usados para radiomarcção de metais.....	47
Figura 9- Estrutura molecular base dos radiofármacos PSMA-617, PSMA I&T e PSMA-11.....	48
Figura 10 - Esquema de composição do PSMA-1007- ¹⁸ F a partir do PSMA-617	54
Figura 11 - Esquema do delineamento experimental do presente trabalho	60
Figura 12 - Esquema dos estudos químicos e biológicos realizados no presente trabalho	60
Figura 13 - Esquema de montagem do kit de marcação do PSMA-1007- ¹⁸ F... ..	67
Figura 14 - Módulo de síntese TRACERLab MX com o cassete e o conjunto de reagentes do PSMA-1007- ¹⁸ F	69
Figura 15 - Reação de substituição S _N 2 do flúor-18, dando origem ao PSMA-1007- ¹⁸ F	70
Figura 16 - Fluxograma do processo de síntese automatizada do PSMA-1007- ¹⁸ F	72
Figura 17 - Ilustração das fitas de CCD-SG usadas para a determinação do TBA no PSMA-1007- ¹⁸ F	84
Figura 18 - Representação das cubas de CCD-SG no estudo dos fatores no ensaio de determinação de TBA. As letras maiúsculas representam o volume aplicado, enquanto que as letras minúsculas representam a concentração da solução padrão de TBA usada.	87
Figura 19 - Curva de decaimento de ln das amostras de PSMA-1007- ¹⁸ F.....	112

Figura 20 - Perfil cromatográfico da impureza fluoreto- ¹⁸ F (¹⁸ F ⁻) no sistema CCD empregado para análise de PSMA-1007- ¹⁸ F.....	117
Figura 21 - Perfil cromatográfico representativo do PSMA-1007- ¹⁸ F em CCD-SG, empregando acetonitrila:água na proporção 60:40 (V/V) como solvente	118
Figura 22 - Perfil cromatográfico representativo do PSMA-1007- ¹⁸ F em iCCD-SG, empregando acetonitrila:água na proporção 60:40 (V/V) como solvente	119
Figura 23 - Perfil cromatográfico em CLAE do PSMA-1007-F pelo método 1 proposto em literatura, com concentração 0,5 mg/mL em DMSO. Corrida realizada em coluna de fase reversa C18 (Waters, 250 mm x 4,6 mm, 5µm) com fase móvel acetonitrila:0,1% de ácido trifluoroacético, fluxo de 1 mL/min a 26 °C com volume de injeção de 50 µL. Apresentando perfil UV-VIS nos comprimentos de onda 280 nm e 220 nm	122
Figura 24 - Perfil cromatográfico em CLAE do PSMA-1007-F pelo método 2 proposto na monografia, com concentração 0,5 mg/mL em DMSO. Corrida realizada em coluna de fase reversa C18 (Shimadzu, 150 mm x 4,6 mm, 5µm) com fase móvel tampão fosfato (pH 2,5):acetonitrila, fluxo de 1,3 mL/min a 30 °C com volume de injeção de 20 µL. Apresentando perfil UV-VIS no comprimento de onda 225 nm.....	123
Figura 25 - Perfil cromatográfico em CLAE do DMSO. Corrida realizada em coluna de fase reversa C18 (Waters, 250 mm x 4,6 mm, 5µm) com fase móvel acetonitrila:0,1% de ácido trifluoroacético, fluxo de 1 mL/min a 26 °C com volume de injeção de 50 µL. Apresentando perfil UV-VIS no comprimento de onda 280 nm	124
Figura 26 - Perfil cromatográfico em CLAE do PSMA-1007- ¹⁸ F pelo método 1 proposto em literatura. Corrida realizada em coluna de fase reversa C18 (Waters, 250 mm x 4,6 mm, 5µm) com fase móvel acetonitrila:0,1% de ácido trifluoroacético, fluxo de 1 mL/min a 26 °C com volume de injeção de 50 µL	125
Figura 27 - Perfil cromatográfico em CLAE do PSMA-1007- ¹⁸ F pelo método 2 proposto na monografia. Corrida realizada em coluna de fase reversa C18 (Shimadzu, 150 mm x 4,6 mm, 5µm) com fase móvel tampão fosfato (pH 2,5):acetonitrila, fluxo de 1,3 mL/min a 30 °C com volume de injeção de 20 µL	126
Figura 28 - Comparação entre a intensidade das manchas do padrão de TBA nas fitas de 8,0 X 4,0 cm, volume aplicado de 2µL. Da esquerda para direita em	

cada fita: PSMA-1007- ¹⁸ F; padrão de referência de TBA; padrão negativo. (A) Concentração de TBA de 0,013 mg/mL diluído em água; (B) Concentração de TBA de 0,26 mg/mL diluído em água; (C ₁) Concentração de TBA de 0,1 mg/mL diluído em água; (C ₂) Concentração de TBA de 0,1 mg/mL diluído em água/etanol.....	133
Figura 29 - Comparação entre o volume de aplicação de TBA nas fitas de 4,0 x 8,0cm com solução padrão de TBA com concentração de 0,26 mg/mL. Da esquerda para direita em cada fita: PSMA-1007- ¹⁸ F; padrão de referência de TBA; padrão negativo. (A) Volume de aplicação de 1 µL diluído em água; (B) Volume de aplicação de 2 µL diluído em água; (C) Volume de aplicação de 5 µL diluído em água.....	135
Figura 30 - Comparação entre as fitas de 8,0 cm x 4,0 cm e 12,5 x 3,0 cm com volume aplicado de 2 µL e solução padrão de TBA com concentração de 0,26 mg/mL diluído em água. (A) Da esquerda para direita: PSMA-1007- ¹⁸ F; padrão de referência de TBA, padrão negativo. (B) Da esquerda para direita: PSMA-1007- ¹⁸ F; padrão de referência de TBA	136
Figura 31 - Fitas de 8,0 x 4,0 cm com volume de aplicação de 2 µL de concentração de TBA de 0,26 mg/mL diluído em água. (A) Comparação entre os R _f do ascorbato de sódio, PSMA-1007- ¹⁸ F e o padrão de TBA (da esquerda para direita); (B) Capacidade de separação com ascorbato de sódio e padrão de TBA, e seus respectivos R _f (da esquerda para direita: ascorbato de sódio; padrão de TBA; solução de ascorbato de sódio e TBA 1:1 V/V).....	137
Figura 32 - Perfis cromatográficos de CLAE do PSMA-1007- ¹⁸ F das amostras do estudo de estabilidade de 6 horas após a síntese.	140
Figura 33 - Estabilidade do produto PSMA-1007- ¹⁸ F em %PR durante o período de 6 horas após a síntese em temperatura ambiente	141
Figura 34 - Comparação entre as estruturas do PSMA-1007- ¹⁸ F e do PSMA-617, destacando o grupo β-naftil presente em ambos	146
Figura 35 - Curva de clareamento sanguíneo do PSMA-1007- ¹⁸ F em camundongos machos sadios (n=4).....	147
Figura 36 - Biodistribuição do PSMA-1007- ¹⁸ F (5,55 MBq, administração intravenosa) em camundongos BALB/c machos sadios expressa em %AI/g ou mL (n=4).....	150

Figura 37 - Biodistribuição do PSMA-1007- ¹⁸ F (5,55 MBq, administração intravenosa) em camundongos BALB/c machos sadios expressa em %AI/órgão (n=4).....	152
Figura 38 - Biodistribuição do PSMA-1007- ¹⁸ F (5,55 MBq; administração intravenosa) em camundongos SCID machos com tumor de próstata de células LNCaP expresso em %AI/g ou mL e seu desvio padrão (n=5)	155
Figura 39 - Biodistribuição do PSMA-1007- ¹⁸ F (5,55 MBq; administração intravenosa) em camundongos SCID machos com tumor de próstata de células LNCaP expresso em %AI/órgão e seu desvio padrão (n=5).....	157
Figura 40 - Imagens de micro PET/CT do valor padronizado de captação (SUV) do PSMA-1007- ¹⁸ F em camundongos SDIC com modelo tumoral LNCaP 1 hora, 2 horas e 1 hora com agente bloqueador PSMA I&T pós-injeção.....	162
Figura 41 - Tumor de células LNCaP no aumento de 200x no microscópio. As setas brancas indicam características de tecido tumoral	164
Figura 42 - Tumor de células LNCaP no aumento de 100x no microscópio. As seta branca indica um vaso sanguíneo no meio dos núcleos tumorais.....	164
Figura 43 - Comparação entre tecido tumoral de células LNCaP (direita) no aumento de 100x no microscópio com um tecido sadio (esquerda).....	165
Figura 44 - Avaliação da associação linear entre as variáveis do ensaio de linearidade. As linhas tracejadas representam os limites de confiança de 95%	167
Figura 45 - Avaliação da dispersão de resíduos do ensaio de linearidade. Valores dos eixos normalizados.....	169

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α	Radiação alfa; constante de distribuição
β	Constante de eliminação
β^-	Radiação beta negativo
β^+	Radiação beta positivo (pósitron)
γ	radiação gama
%AI	Porcentagem de atividade injetada
%AI/g	Porcentagem de atividade injetada por grama
%AI/mL	Porcentagem de atividade injetada por mL
%AI/órgão	Porcentagem de atividade injetada por órgão
%PR	Porcentagem de pureza radioquímica
%PR _n	Porcentagem de pureza radionuclídica
°C	Graus celsius
μ A	Microampère
μ Ci	Micro curie
μ g	Micrograma
μ m	Micrometro
μ L	Microlitro
2-PMPA	Ácido 2-fosfometil-pentadióico
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
API	Água para injetáveis
AUC	<i>Area under the curve</i> , área sobre a curva

BALB/c	<i>Bagg's albino</i> , linhagem genética do camundongo (<i>Mus musculus</i>) albino c
BPF	Boas práticas de fabricação
CCD-SG	Cromatografia em camada delgada de sílica gel
CL	Clareamento sanguíneo
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
Ci	Curie
CNEN	Comissão nacional de energia nuclear
CP	Câncer de próstata
CPM	Contagens por minuto
DL50	Dose letal que mata 50% de uma população
DMSO	dimetilsulfóxido
DOTA	ácido 1,4,7,10-tetraazociclododecano-1,4,7,10-tetraacético
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EtOH	etanol
FDA	Food and drug administration
FDG	Fludesoxiglicose
g	Gramma
GBq	Giga becquerel
GCP II	glutamato carboxipeptidase II
GLOBOCAN	Observatório mundial do câncer
Glu-Ureia-Lys	glutamato-ureia-lisina
GPC2	Glutamato carboxipeptidase II
HBED-cc	Ácido N-N'-bis-[2-hidroxi-5-

	(carboxietil)benzil]etilenediamino-N-N' diacético
iCCD-SG	Cromatografia instantânea em camada delgada de sílica gel
IM	Imagem molecular
INCA	Instituto nacional do câncer
IPEN	Instituto de pesquisas energéticas e nucleares
KDa	<i>Kilodalton</i>
kBq	<i>Kilo becquerel</i> , quilo becquerel
keV	<i>Kilo eletron Volt</i> , quilo elétron Volt
LAL	<i>Limulus ameobocyte lysate</i>
LNCaP	Célula de carcinoma prostático humano androgênio- dependente
Log P	Coeficiente de partição
M	Molar
MBq	Mega becquerel
mCi	Mili curie
MeV	<i>Mega eletron volt</i> , mega elétron volt
mg	Miligrama
mL	Mililitro
ML	Medicina laboratorial
MPQ	Matéria-prima química
MPR	Matéria-prima radioativa
NAA	Acetil-L-aspartato
NAAG	Acetil-L-aspartato-L-glutamato
NAALADase	Peptidase N-acetil-L-aspartil-L-glutamato
ng	Nano grama

nm	Nanômetros
nmol	Nano mol
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> , tampão fosfato salino
PET	<i>Positron emission tomography</i> , tomografia por emissão de pósitrons
pH	Potencial hidrogeniônico
PHI	<i>Prostate health index</i> , índice de saúde da próstata
PR	Pureza radioquímica
PSA	Antígeno prostático específico
PSMA	Antígeno de membrana prostático específico
r^2	Coefficiente de determinação
RB	Recidiva bioquímica
Rf	<i>Retention fator</i> , fator de retenção
RM	Ressonância magnética
RMM	Ressonância magnética multiparamétrica
SBCAL	Sociedade brasileira de ciências em animais de laboratório
SBOC	Sociedade brasileira de oncologia clínica
SBPC	Sociedade brasileira de patologia clínica
SBU	Sociedade brasileira de urologia
SCID	<i>BALB/c with severe combined immunodeficient</i> , camundongos <i>BALB/c</i> com imunodeficiência severa combinada
SFB	Soro fetal bovino

SPECT	<i>Single photon emission computed tomography</i> , tomografia computadorizada por emissão de fóton único
SUS	Sistema único de saúde
SUV	<i>Standardized uptake value</i>
T $\frac{1}{2}$	Tempo de meia-vida
T $\frac{1}{2}$ α	Meia-vida de distribuição
T $\frac{1}{2}$ β	Meia-vida de eliminação
TBA	Tetrabutílamônio
TBAOH	Hidróxido de tetrabutílamônio
CT	Tomografia computadorizada
TR	Tempo de retenção
UE/V	Unidade de endotoxina por volume
UV/Vis	Ultravioleta/luz visível
v/v	Volume/volume
Vd	Volume de distribuição
VOI	<i>Volume of interest</i> , volume de interesse

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	29
2 OBJETIVOS.....	33
2.1 Objetivo Geral.....	33
2.2 Objetivos específicos	33
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	34
3.1 Câncer de Próstata.....	34
3.2 Uso do Radiofármaco na Medicina Nuclear	37
3.2.1 Imagem molecular	38
3.2.1.1 FDG- ¹⁸ F	41
3.3 Antígeno Prostático de Membrana Específico (PSMA).....	42
3.3.1 Radiofármacos à base de PSMA.....	46
3.3.1.1 PSMA-11- ⁶⁸ Ga.....	49
3.3.1.1.1 Comparação entre os radionuclídeos flúor-18 e gálio-68.....	50
3.3.1.2 PSMA-1007- ¹⁸ F	53
3.3.1.2.1 Estudos clínicos com o PSMA-1007- ¹⁸ F	55
4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	58
5 MATERIAIS.....	61
5.1 Infraestrutura	61
5.2 Reagentes e Soluções.....	61
5.3 Equipamentos, Materiais e Sistemas	63
5.4 Animais.....	65
5.5 Cultivo de Linhagem Celular Humana de Tumor de Próstata Derivada da Metástase Linfonodal - LNCaP	65
6 MÉTODOS	66
6.1 Produção do PSMA-1007- ¹⁸ F	66
6.1.1 Produção do flúor-18.....	66
6.1.2 Montagem do módulo de síntese do PSMA-1007- ¹⁸ F	66
6.1.3 Radiosíntese do PSMA-1007- ¹⁸ F.....	69
6.1.4 Determinação do rendimento de síntese do PSMA-1007- ¹⁸ F	72
6.2 Controle de Qualidade do Radiofármaco PSMA-1007- ¹⁸ F.....	73
6.2.1 Identidade Radionuclídica.....	73
6.2.2 Pureza radionuclídica (PRn).....	74

6.2.3 Identidade do produto PSMA-1007- ¹⁸ F	75
6.2.4 Pureza radioquímica (PR).....	75
6.2.3.1 Determinação do perfil cromatográfico do flúoreto- ¹⁸ F livre por cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCD-SG).....	77
6.2.3.2 Análise de pureza radioquímica do PSMA-1007- ¹⁸ F por cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCD-SG) e cromatografia instantânea em camada delgada (iCCD-SG).....	77
6.2.3.3 Análise de pureza radioquímica do PSMA-1007- ¹⁸ F por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	78
6.2.5 Pureza química (PQ).....	80
6.2.5.1 Solventes residuais.....	80
6.2.5.2 Determinação do Tetrabutilamônio – TBA.....	81
6.2.5.2.1 Determinação dos fatores de estudo.....	82
6.2.5.2.1.1 Tamanho da fita.....	83
6.2.5.2.1.2 Concentração da solução padrão de TBA.....	84
6.2.5.2.1.3 Solvente.....	85
6.2.5.2.1.4 Volume de amostra.....	86
6.2.5.2.1.5 Ascorbato de sódio.....	86
6.2.5.2.2 Realização do ensaio.....	86
6.2.6 Aparência.....	88
6.2.7 pH.....	88
6.2.8 Microbiológico.....	88
6.3 Ensaio Experimentais.....	89
6.3.1 Estudo de estabilidade do PSMA-1007- ¹⁸ F.....	89
6.3.2 Determinação do coeficiente de partição (Log P) experimental.....	90
6.4 Ensaio Pré-Clínicos.....	91
6.4.1 Cultivo das células LNCaP.....	91
6.4.2 Ensaio <i>in vitro</i>	91
6.4.2.1 Ensaio de competição.....	92
6.4.2.2 Ensaio de internalização.....	93
6.4.3 Ensaio <i>in vivo</i>	94
6.4.3.1 Estudos farmacocinéticos em camundongos BALB/c sadios.....	95
6.4.3.2 Estudo de biodistribuição em camundongos BALB/c sadios.....	96
6.4.3.3 Estudo de biodistribuição em camundongos SCID com modelo tumoral LNCaP.....	97
6.4.3.3.1 Estudo de competição <i>in vivo</i>	97

6.4.3.3.2 Imagem de corpo inteiro de camundongos SDIC com modelo tumoral LNCaP em Micro PET	98
6.4.3.4 Histopatologia do tumor de próstata LNCaP	98
6.5 Validação da Metodologia Analítica para determinação da Pureza Radioquímica	98
6.5.1 Método cromatográfico a ser avaliado	99
6.5.2 Parâmetros avaliados	100
6.5.2.1 Seletividade.....	100
6.5.2.2 Linearidade.....	103
6.5.2.3 Precisão	104
6.5.2.4 Robustez.....	105
6.5.2.5 Intervalo	107
6.6 Análise Estatística	108
7 RESULTADOS E DISCUSSÕES	109
7.1 Determinação do Rendimento de Síntese do PSMA-1007- ¹⁸ F	109
7.2 Controle de Qualidade do Radiofármaco PSMA-1007- ¹⁸ F.....	111
7.2.1 Identidade radioquímica	111
7.2.2 Pureza radionuclídica (PRn).....	113
7.2.3 Pureza radioquímica (PR).....	116
7.2.3.1 Determinação do perfil cromatográfico do flúoreto- ¹⁸ F livre por cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCD-SG).....	117
7.2.3.2 Análise de pureza radioquímica por cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCD-SG) e cromatografia instantânea em camada delgada (iCCD-SG).....	118
7.2.3.3 Identidade do produto e análise da pureza radioquímica do PSMA-1007- ¹⁸ F por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	121
7.2.3.4 Cálculo da porcentagem de pureza radioquímica do PSMA-1007- ¹⁸ F. 127	
7.2.4 Pureza química (PQ).....	129
7.2.4.1 Solventes residuais.....	129
7.2.4.2 Determinação do tetrabutilamônio - TBA	132
7.2.5 Aparência.....	137
7.2.6 pH.....	138
7.2.7 Microbiológico	138
7.3 Estudo de Estabilidade do PSMA-1007- ¹⁸ F.....	139
7.4 Determinação do Coeficiente de Partição (Log P) Experimental.....	142
7.5 Ensaio Pré-Clínicos	143

7.5.1 Ensaio <i>in vitro</i>	143
7.5.1.1 Ensaio de competição	143
7.5.1.2 Ensaio de internalização	144
7.5.2 Ensaio <i>in vivo</i>	146
7.5.2.1 Estudos farmacocinéticos em camundongos BALB/c sadios	146
7.5.2.2 Estudos de biodistribuição em camundongos BALB/c sadios	148
7.5.2.3 Estudos de biodistribuição em camundongos SCID com modelo tumoral LNCaP	153
7.5.2.3.1 Estudo de competição <i>in vivo</i>	159
7.5.2.3.2 Imagem de corpo inteiro de camundongos SDIC com modelo tumoral LNCaP em Micro PET	161
7.5.2.4 Histopatologia do tumor de próstata LNCaP	163
7.6 Validação da Metodologia Analítica para determinação da Pureza Radioquímica	165
7.6.1 Seletividade	165
7.6.2 Linearidade	166
7.6.3 Precisão	169
7.6.4 Robustez.....	170
7.6.5 Intervalo	173
8 CONCLUSÃO	174
9 BIBLIOGRAFIA.....	176

1 INTRODUÇÃO

O câncer de próstata é a doença mais frequentemente diagnosticada em homens em 112 países, seguido pelo câncer de pulmão em 36 países, câncer colorretal e câncer de fígado em 11 países. Com relação à mortalidade, o câncer de pulmão é a principal causa de morte por câncer em homens em 93 países, seguido pelo câncer de próstata em 48 países e câncer de fígado em 23 países. No entanto, as taxas de mortalidade por câncer de próstata diminuíram na maioria dos países de alta renda desde meados da década de 1990, incluindo a América do Norte, Oceania e Europa do Norte e Ocidental, refletindo os avanços no tratamento e detecção precoce da doença (SUNG *et al.*, 2021).

Muitos cânceres de próstata são detectados com base em níveis elevados do antígeno específico da próstata (PSA > 4 ng/mL), uma glicoproteína normalmente expressa pelo tecido da próstata. No entanto, como níveis de PSA elevados podem ser encontrados em homens sem câncer, normalmente é indicada a realização de biópsia do tecido para confirmação da presença da doença (RAWLA, 2019).

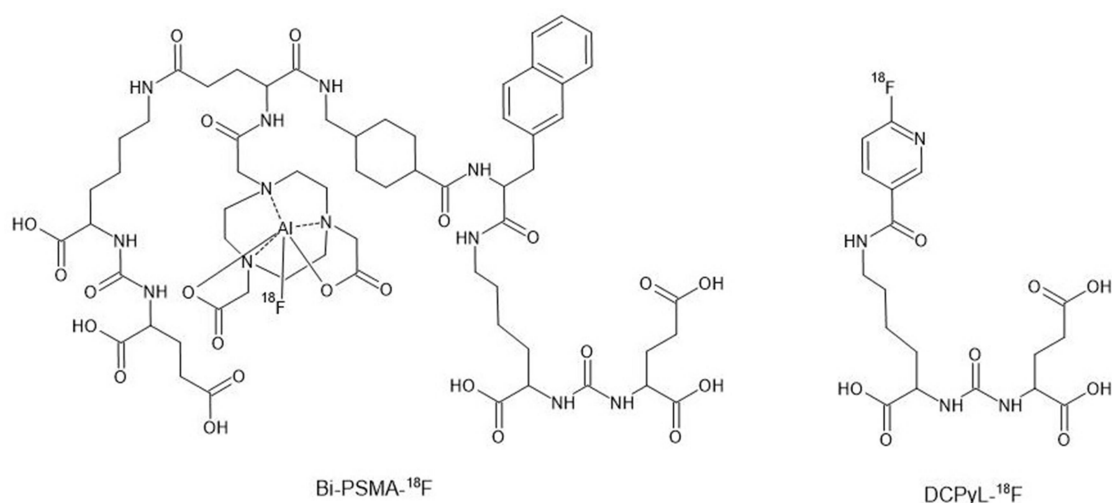
Atualmente, por meio da medicina nuclear, o diagnóstico por imagem de alvos moleculares específicos do câncer de próstata possibilita o diagnóstico de maneira precoce e mais precisa, podendo levar a uma melhor gestão dos pacientes com a doença. Duas modalidades de imagem molecular mais comumente usadas para diagnóstico ou tratamento de câncer são a tomografia computadorizada por emissão de fóton único e a tomografia por emissão de pósitrons, usando radiofármacos. A imagem molecular com radiofármacos permite a detecção não invasiva mais precisa dos vários processos moleculares e celulares ativos em pacientes com câncer de próstata. Na prática, as informações funcionais do PET (*Positron Emission Tomography*) ou SPECT (*Single Photon Emission Computer Tomography*) são quase sempre adquiridas simultaneamente com as informações anatômicas fornecidas por meio de tomografia computadorizada (*computed tomography* - CT) ou ressonância magnética (RM). As técnicas de imagem híbrida, que combinam informações funcionais e morfológicas, resultam no diagnóstico mais preciso.

Atualmente, ambas as técnicas de imagem híbrida são usadas rotineiramente na prática clínica moderna, não apenas como a principal ferramenta de estadiamento no câncer de próstata, mas também em pacientes com suspeita de recorrência da doença (OKARVI, 2019).

O PSMA é uma glicoproteína transmembrana do tipo II que é superexpressa em quase todas as células cancerígenas da próstata, quando comparadas com as células prostáticas normais. O nível de expressão de PSMA aumenta com o aumento do grau do tumor, estágio patológico e recorrência bioquímica. Desde a década de 1980, vários estudos foram realizados a fim de desenvolver ligantes para as regiões específicas do domínio intra ou extracelular do PSMA, começando com anticorpos monoclonais marcados com diferentes radioisótopos para imagens com aplicação na medicina nuclear (RUANGMA *et al.*, 2018).

Além do desenvolvimento de anticorpos monoclonais contra PSMA, pequenas moléculas com afinidade alta e inibidores de PSMA ganharam muito interesse devido ao seu tamanho, proporcionando melhor penetração no tumor do que os anticorpos. Esses inibidores de PSMA são divididos em três famílias: à base de fósforo, à base de tiol e à base de ureia, sendo que os inibidores à base de ureia têm maior afinidade e especificidade, além de internalização rápida e eficiente nas células-alvo. Vários estudos clínicos avaliando ligantes de PSMA foram realizados, dentre eles, os compostos marcados com Ga-68 e F-18, que têm atraído atenção por serem usados para imagens PET na medicina nuclear (RUANGMA *et al.*, 2018).

Exemplos de ligantes de PSMA a base de ureia e radiomarcados com F-18 estão ilustrados na Figura 1.

Figura 1 – Inibidores de PSMA à base de ureia Bi-PSMA-¹⁸F e DCPyL-¹⁸F

Fonte: Autor

O radiotraçador PSMA-específico mais amplamente estudado e que possui mais ensaios clínicos em andamento é o PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga, também descrito como PSMA-11-⁶⁸Ga. Apesar do PSMA-11-⁶⁸Ga ser o radiotraçador líder em imagens PET/CT para câncer de próstata, há vantagens dos traçadores marcados com flúor-18 em relação ao gálio-68. Inicialmente, os radiotraçadores marcados com flúor-18 podem ser produzidos em alta escala por meio da produção de F-18 em aceleradores ciclotron, tendo vantagem sobre os lotes produzidos a partir do Ga-68, obtido por meio de gerador ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga. O gálio-68 tem uma meia-vida física de 68 minutos, limitando seu uso para o centro produtor, diferente do flúor-18 que possui uma meia-vida de 110 minutos, podendo ser distribuído para centros clínicos mais distantes com a dose necessária em pronta-entrega. Além disso, a energia liberada pelo gálio-68 é maior em comparação com o flúor-18, tornando a identificação de pequenas lesões em imagens PET um desafio (FOLEY *et al.*, 2020).

O PSMA-1007-¹⁸F é um radiotraçador PSMA-específico da terceira geração de compostos à base de ureia marcados com flúor-18, que exibe depuração sanguínea rápida e quantidades mínimas de atividade são apresentadas no trato urinário, visto que sua excreção é feita primariamente via hepatobiliar. Clinicamente, uma concentração alta de agentes radioativos para imagens PET na bexiga e na uretra pode interferir no diagnóstico da doença, dificultando a detecção de recorrência local na próstata e linfonodos pélvicos.

Assim, sua farmacocinética se torna única, e vem chamando a atenção nos últimos anos (GIESEL *et al.*, 2019).

RAHBAR *et al.* (2018b) avaliaram o desempenho do PSMA-1007-¹⁸F na detecção de lesões de câncer de próstata em pacientes com recidiva bioquímica, com exames de PET/CT, em 100 pacientes analisados retrospectivamente. A taxa de PET-positivo no presente estudo foi maior do que a taxa de detecção em um estudo que investigou o desempenho do PSMA-11-⁶⁸Ga em exames PET/CT em 1.007 pacientes com recidiva bioquímica. Os resultados encontrados pelo grupo indicam que o PSMA-1007-¹⁸F possui sensibilidade maior do que o PSMA-11-⁶⁸Ga. Atualmente, o composto PSMA-1007-¹⁸F possui monografia publicada na Farmacopeia Europeia, oficializando sua atuação no campo da medicina nuclear no exterior. No Brasil, o PSMA-1007-¹⁸F pode ser produzido e comercializado mediante notificação, por unidades produtoras que demonstrem Boas Práticas de Fabricação. Entretanto, o registro do radiofármaco no Brasil ampliaria o uso, com possibilidade de cobertura de planos de saúde ou para o sistema único de saúde (SUS), a partir de estudos que demonstrem a eficácia e segurança do radiofármaco. Sua relevância na detecção e avaliação de lesões de câncer de próstata é alta, podendo ser um grande aliado no manejo de paciente com câncer de próstata no Brasil.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Produzir o radiofármaco PSMA-1007-¹⁸F, avaliando a adequabilidade dos parâmetros de síntese, contribuindo para a validação de metodologias analíticas empregadas no controle de qualidade e realizando ensaios pré-clínicos, necessários para suportar os registros do radiofármaco junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Realizar a síntese do radiofármaco PSMA-1007-¹⁸F em módulo automatizado e avaliar a adequabilidade;
- Realizar o controle de qualidade dos lotes produzidos do radiotraçador, contemplando todos os ensaios farmacopeicos, a fim de demonstrar sua aplicabilidade na rotina laboratorial;
- Avaliar a eficiência de métodos cromatográficos na determinação da pureza radioquímica do composto radiomarcado e desenvolver protocolo para validar a metodologia analítica escolhida para a avaliação de pureza radioquímica;
- Estudar a robustez do método de determinação da impureza química tetrabutylamônio (TBA);
- Realizar estudos de ligação do PSMA-1007-¹⁸F às células tumorais *in vitro*;
- Avaliar a capacidade de internalização do radiofármaco em células tumorais *in vitro*;
- Analisar a biodistribuição, farmacocinética e especificidade de ligação do PSMA-1007-¹⁸F ao tumor em modelo experimental *in vivo*, por método invasivo e de imagem PET;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

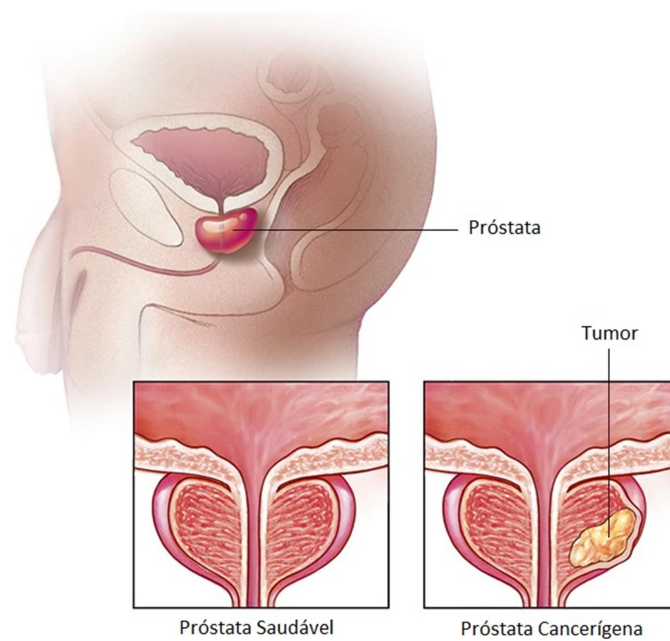
3.1 Câncer de Próstata

O câncer é uma doença caracterizada pela mutação no DNA, que resulta no crescimento descontrolado da célula mutada. O termo câncer, embora frequentemente usado para todas as neoplasias, por definição, refere-se somente à neoplasia maligna. (KLAUNIG, 2020)

Segundo a *Global Cancer Observatory – GLOBOCAN* (WHO, 2020), a estimativa de novos casos de câncer no mundo de 2020 até 2040 é de quase onze milhões, e o câncer de próstata (CP) representa um milhão e vinte mil novos casos nesta estatística. No Brasil, no ano de 2025, estima-se uma incidência de quase seiscentos e oitenta e sete mil novos casos de câncer, e ao final do ano 2030, um total de cento e trinta e seis mil casos de câncer de próstata. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o CP é o segundo mais comum entre os homens, ficando atrás somente para o câncer de pele não melanoma (INCA, 2021).

A próstata é uma glândula situada logo abaixo da bexiga e presente somente no corpo humano masculino (figura 2). Este pequeno órgão envolve uma porção da uretra, tubo pelo qual a urina é eliminada, além de produzir parte do sêmen. A próstata pode ter um crescimento benigno conforme a idade avançada, já o seu crescimento anormal pode se tornar um tumor maligno (INCA, 2021).

Figura 2 - Ilustração da próstata e do câncer de próstata



Fonte: Adaptado de MAYO CLINIC, 2021

O câncer de próstata começou a ser considerada uma forma distinta de doença no final do século XIX, quando os médicos encontraram problemas práticos em relação ao seu tratamento. A cirurgia, que se baseia na retirada de uma grande massa de tecido que envolve a próstata, no fundo da pélvis, cercada por órgãos e vasos vitais, traz riscos associados e efeitos colaterais em longo prazo, não proporcionando uma cura consistente e eficaz. No final da década de 1960, o pesquisador Richard J. Ablin da Universidade de Búffalo em Nova York começou a investigar a imunologia da próstata e identificou o antígeno prostático específico (PSA) presente no sangue, que se eleva à medida que a próstata aumenta seu volume. Posteriormente, outra equipe da mesma universidade desenvolveu um ensaio para a identificação do PSA, patenteado em 1984, que em poucos anos se tornou uma das técnicas de rastreamento mais utilizadas para o diagnóstico de câncer de próstata (BARNETT, 2018).

A maioria dos casos diagnosticados de câncer de próstata é detectada pelo teste de PSA sérico anormal, levando à biópsia transretal para sua confirmação. A biópsia foi desenvolvida em 1920 e aprimorada em 1966 com a escala de Gleason, criada pelo patologista americano Donald Gleason que

pontua uma dada amostra de CP baseada em sua aparência microscópica (BARNETT, 2018; BORLEY; FENELEY, 2009).

Mesmo sendo a técnica mais usada para a detecção de CP, a especificidade do teste de PSA é limitada, com uma alta taxa de falso-positivos levando a biópsias desnecessárias, além de resultar em tratamentos cirúrgicos dispensáveis que podem causar danos durante a vida do paciente. Assim, com a finalidade de melhorar o poder diagnóstico desse marcador, em 2013 foi desenvolvido o índice PHI, denominado índice de saúde da próstata (do inglês *Prostate Health Index*) que relaciona, matematicamente, os resultados das medidas da isoforma do PSA [-2]proPSA (identificada como p2PSA), do PSA total e da fração livre do PSA. O PHI é um exame de sangue simples e barato, e vários estudos prospectivos internacionais demonstraram superar as medições convencionais de PSA e PSA livre, além de estar consistentemente associado à pontuação de Gleason (LOEB; CATALONA, 2014).

A Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) e a Sociedade Brasileira de Urologia (SBU) aprovaram o PHI como uma atualização na vigilância do CP, devendo ser considerada como parte do arsenal urológico padrão para decisões de biópsia, tratamento de risco e seleção de tratamento (SBPC, 2018).

É importante ressaltar que o CP é uma doença silenciosa, com sintomas comumente associados a outras enfermidades como dificuldade ao urinar e sangue presente na urina. Usando essas ferramentas de triagem em homens assintomáticos, há grande probabilidade de ter um diagnóstico precoce da doença e levar a um tratamento nos estágios iniciais da doença (BORLEY; FENELEY, 2009).

Os exames de estadiamento são feitos para avaliar a disseminação da doença no paciente, que reúnem exames de imagem e exames laboratoriais como hemograma completo, função hepática, testosterona e coagulograma. O tratamento compreende a prostatectomia radical, radioterapia externa, braquiterapia e terapia hormonal, sendo que cada tratamento depende do grau da doença e da condição do paciente. Em casos de recidiva bioquímica (RB), a Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica (SBOC) atualizou para o ano de

2020 suas diretrizes de tratamentos oncológicos para próstata. Agora seus guias de conduta para doença localizada (SBOC, 2021b) e doença avançada (SBOC, 2021a) incluem exames de imagem PET em conjunto com a tomografia computadorizada, utilizando radiofármaco à base de PSMA marcado com gálio-68.

3.2 Uso do Radiofármaco na Medicina Nuclear

A medicina nuclear é um dos campos da medicina que faz uso da radiação para o tratamento e o diagnóstico de doenças. Ela combina áreas da química, física, farmácia e biologia, fornecendo informações que auxiliam na avaliação clínica do paciente (LOVELAND *et al.*, 2017).

É importante ressaltar que nem toda terapia com radiação está vinculada à medicina nuclear, como a braquiterapia e a teleterapia, que envolvem fontes seladas e externas de radiação, respectivamente. O mesmo conceito é aplicado a exames de imagens, sendo que exames de raios-X, ultrassom e ressonância magnética não fazem parte da medicina nuclear, e sim da radiologia (VARGA, 2018).

A medicina nuclear emprega radionuclídeos como fontes não seladas chamadas de radiofármaco, medicamento constituído por um fármaco e um radionuclídeo. O componente farmacêutico permite que o composto se localize preferencialmente nos órgãos ou participe de alguma função biológica. Já o radionuclídeo é um núcleo instável que passa por um ou mais processos de decaimento a fim de obter sua estabilidade. Assim, o radiofármaco nada mais é que um marcador radioativo que emite radiação para o local alvo no qual está acumulado (em casos de terapia) ou para fora do paciente (no caso de imagem), indicando o órgão de interesse (SAHA, 2010).

O radiofármaco não é um medicamento tradicional, pois normalmente não produz efeito farmacológico sobre o paciente devido à concentração extremamente baixa, administrada por via endovenosa, oral ou por inalação (VARGA, 2018).

Os radionuclídeos que são produzidos de maneira natural raramente são utilizados na medicina nuclear, sendo os que apresentam mais utilidade são

produzidos artificialmente em reatores de pesquisa, aceleradores de partículas ou através de um gerador de radionuclídeos. Em reatores nucleares são usadas reações de captura de nêutrons (n,γ ou n,p) e fissão do urânio-235 (^{235}U) para a produção de radionuclídeos, no qual estes são ricos em neutrons e se estabilizam por decaimento beta (β^-) (VENKATESH; KANG, 2021). Normalmente, estes radionuclídeos com emissão de partículas beta possuem tempo de meia-vida física ($T_{1/2}$) longa, enquanto que radioisótopos com meia-vida mais curta podem ser produzidos em aceleradores cíclotron ou por meio de geradores (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Em aceleradores de partículas, a produção mais comum de radionuclídeos para uso médico ocorre através de reações induzidas pelo próton/déuteron produzindo radioisótopos deficientes em nêutrons, que se estabiliza através da emissão de pósitrons (β^+) ou por captura de elétrons (VENKATESH; KANG, 2021). Em geradores, o radioisótopo é obtido a partir de um radionuclídeo com $T_{1/2}$ longo, no qual suas propriedades químicas são diferentes da do radioisótopo produzido com $T_{1/2}$ curta, sendo facilmente separados como é o caso do gerador $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ que decai emitindo radiação gama (γ) (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

As radiações emitidas dos radionuclídeos são partículas ou ondas eletromagnéticas, produtos da estabilização da estrutura e da dinâmica do núcleo instável do átomo. O tipo de emissão, a energia e tempo de meia-vida são os aspectos que determinam sua aplicação e, conseqüentemente, a finalidade diagnóstica ou terapêutica do radiofármaco. A escolha de um radionuclídeo também depende da sua disponibilidade, do custo envolvido na sua produção e marcação e, principalmente, da sua afinidade pelo substrato para ter um radiofármaco estável. Assim, evita-se que ocorra dissociação e a produção de produtos secundários, causando efeitos indesejáveis na aplicação como sua deposição em um órgão não-alvo, oferecendo dose de radiação desnecessária ao paciente (SAHA, 2010; LOVELAND *et al.*, 2017).

3.2.1 Imagem molecular

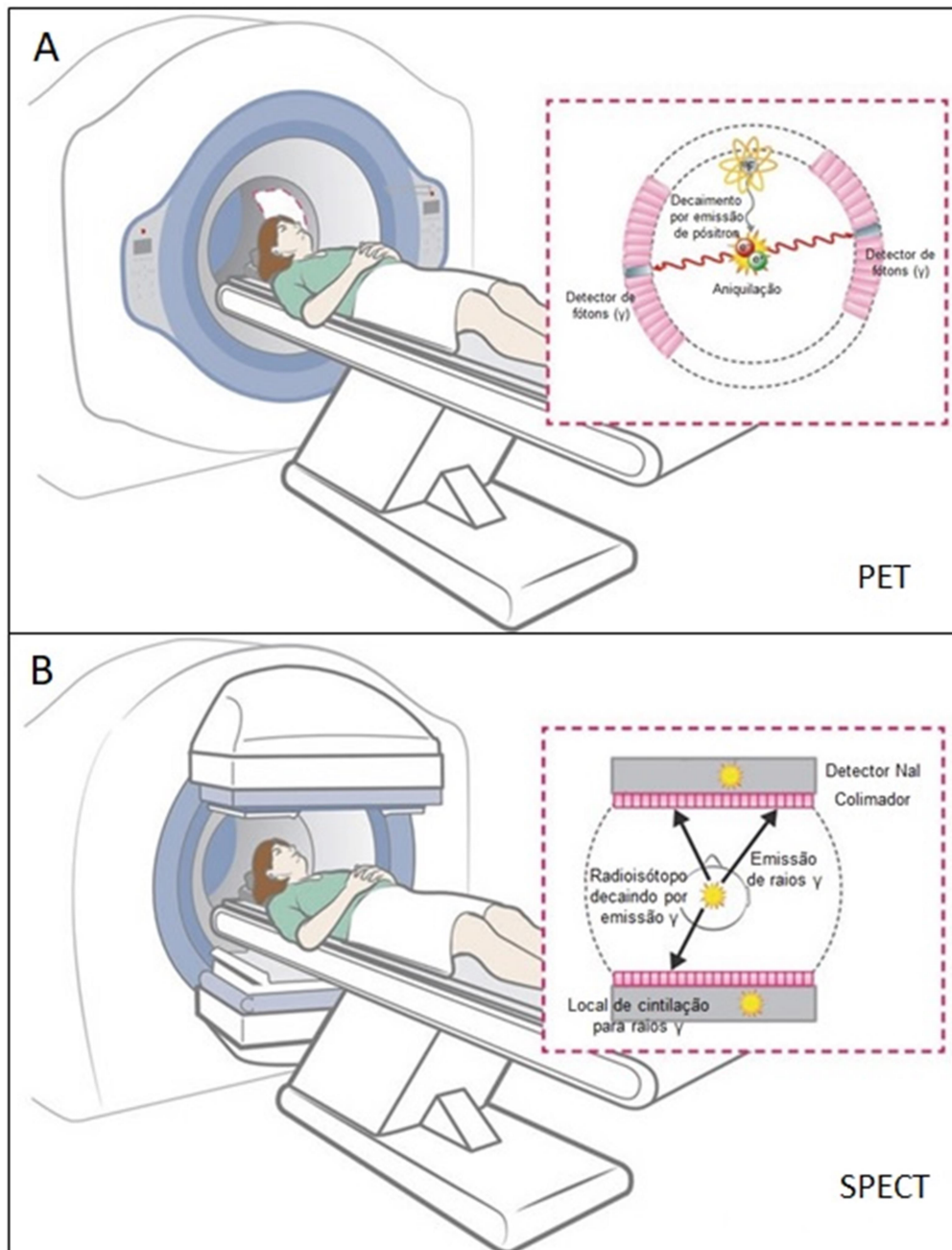
A Imagem molecular (IM) é definida como a visualização e caracterização da interação entre o órgão ou tecido alvo e o agente de

imagem, fornecendo informações sobre suas estruturas e funções, assim como processos biológicos em nível molecular e celular (JOSEPHS *et al.*, 2009).

Os radiofármacos podem ser usados como agentes de imagem por constituírem um componente sinalizador e um componente específico, que interage com o órgão-alvo. Cerca de 90% dos procedimentos diagnósticos da medicina nuclear correspondem à imagem molecular, fornecendo informações predominantemente bioquímico-funcionais (SIMAL, 2011).

A figura 3 representa o princípio de realização das imagens em exames PET e SPECT empregando radiofármacos. Para as imagens PET (figura 3, A) são usados radioisótopos de decaimento por pósitrons, no qual os pósitrons viajam pelo espaço até se aniquilarem por colisão com um elétron, produzindo dois raios γ com energia de 511 keV liberados em direções opostas. Esses raios γ são reconhecidos como fótons de coincidência pelo anel detector, sendo usados para reconstruir o ponto de origem usando informações espaciais e temporais. Já para as imagens SPECT (figura 3, B) geralmente são usadas duas câmaras gama que giram em torno do paciente para coletar os raios gama emitidos pelos radionuclídeos, sendo estes normalmente com $T_{1/2}$ mais longa do que os usados em PET, indo de horas a dias, frequentemente usado para analisar processos cinéticos mais lentos (HAEDICKE *et al.*, 2018).

Figura 3 - Princípio da formação da imagem PET (A) e SPECT (B)



Fonte: HAEDICKE *et al.*, 2018 (tradução livre).

Uma grande variedade de tecnologias em IM foi se desenvolvendo e evoluindo nos últimos tempos, incluindo ultrassom, tomografia computadorizada, imagem por ressonância magnética, PET e SPECT. A escolha da modalidade depende do processo de interesse, levando-se em conta a frequência e o período de aquisição da imagem, a área que será investigada e a resolução necessária para sua visualização. Dependendo da

aplicação, uma ou mais modalidades de imagem podem ser escolhidas. CT e ultrassom são usados para obter informações estruturais e anatômicas, já PET e SPECT permitem avaliar a atividade metabólica de tumores e metástases (HAEDICKE *et al.*, 2018).

A fusão das modalidades de imagem nuclear com as anatômicas proporciona uma visão mais detalhada da enfermidade, mesmo em casos onde a mudança é mínima. Além disso, o radiofármaco usado para a construção da imagem não interfere nem altera a função do órgão que está sendo investigado, tornando a técnica muito aplicável e desejável (VARGA, 2018).

A interação molecular entre os processos patogênicos e não patogênico é a base para a imagem molecular, retratando alterações anatômicas de modo a diagnosticar de maneira mais exata e precoce pequenas lesões e até metástases. Assim, a IM consegue elevar o entendimento sobre a biologia tumoral, bem como avaliar a presença e o estágio biológico da doença. Ela permite também o estudo farmacocinético e farmacodinâmico de drogas antitumorais, avaliar suas respostas terapêuticas e visualizar o status biológico de receptores e vias envolvidas no desenvolvimento tumoral (SIMAL, 2011).

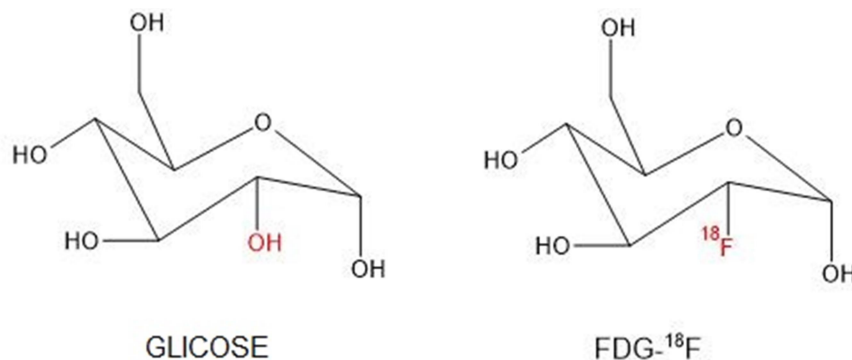
3.2.1.1 FDG-¹⁸F

A PET/CT empregando fludesoxiglicose (¹⁸F) (FDG-¹⁸F) representa a técnica de imagem mais conhecida na medicina nuclear que emprega emissores de pósitrons. O radiofármaco FDG-¹⁸F é o mais amplamente utilizado para imagiologia de tumores em geral, pois pode ser usado para imagens de tumores cerebrais, câncer de mama, de pulmão, de cabeça e pescoço, além de câncer de esôfago, melanoma e colorretal (LOVELAND *et al.*, 2017).

FDG-¹⁸F é um análogo da glicose com substituição do oxigênio na posição C-2 por flúor-18, como pode ser visto na figura 4. Sua captação se torna elevada principalmente em lesões primárias de câncer e em metástases devido ao aumento da captação de glicose relacionada ao tumor. Em casos como CP, no entanto, esse radiofármaco se torna limitado devido ao baixo metabolismo glicolítico nas células tumorais da próstata, sendo limitado para

doença em estágio metastático ou em estágio avançado (BEDNAROVA et al., 2017). A revisão de literatura realizada por JADVAR (2016), avaliando o desempenho do FDG- ^{18}F no câncer de próstata em diversos estágios da doença, corrobora a possível aplicação em casos metastáticos, limitando-se a casos agressivos da doença.

Figura 4 - Comparação entre as moléculas de glicose e FDG- ^{18}F



Fonte: Autor

Embora o FDG- ^{18}F ainda seja o radiofármaco mais amplamente usado, outros radiotraçadores específicos para lesões que não captam de maneira efetiva a glicose estão sendo investigados, para que o diagnóstico da doença-alvo seja mais preciso e seletivo (CAZZATO *et al.*, 2018).

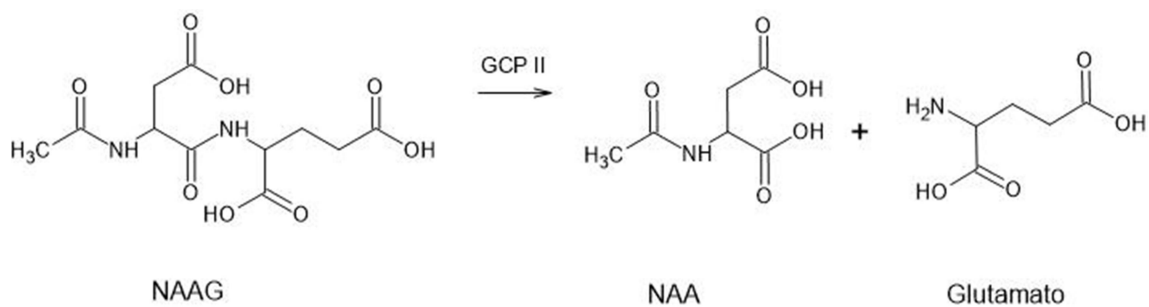
O surgimento de novas tecnologias para atender e melhorar o diagnóstico de CP por PET é cada vez mais visível. Novos marcadores tumorais capazes de avaliar sua estrutura e função através de receptores presentes no câncer de próstata potencializaram os estudos nessa linha de pesquisa. A aplicação de proteínas como traçadores PET é um bom exemplo de como a técnica pode ser refinada. Análogos dirigidos ao antígeno prostático de membrana específico, PSMA (*Prostate Specific Membrane Antigen*) vem sendo explorados como alternativas de radiofármacos para diferentes contextos clínicos do CP, como estadiamento primário, detecção de recorrência bioquímica, avaliação das respostas terapêuticas e planejamento do tratamento (BARBOSA *et al.*, 2018).

3.3 Antígeno Prostático de Membrana Específico (PSMA)

Desde os anos 2000, o PSMA tem sido investigado como um potencial alvo para exames de imagens de CP e, nos últimos anos, sua introdução em exames de PET/CT alterou drasticamente o cenário global no estadiamento do câncer de próstata, devido a sua sensibilidade alta e especificidade comparada as imagens convencionais (NIKHIL *et al.*, 2020).

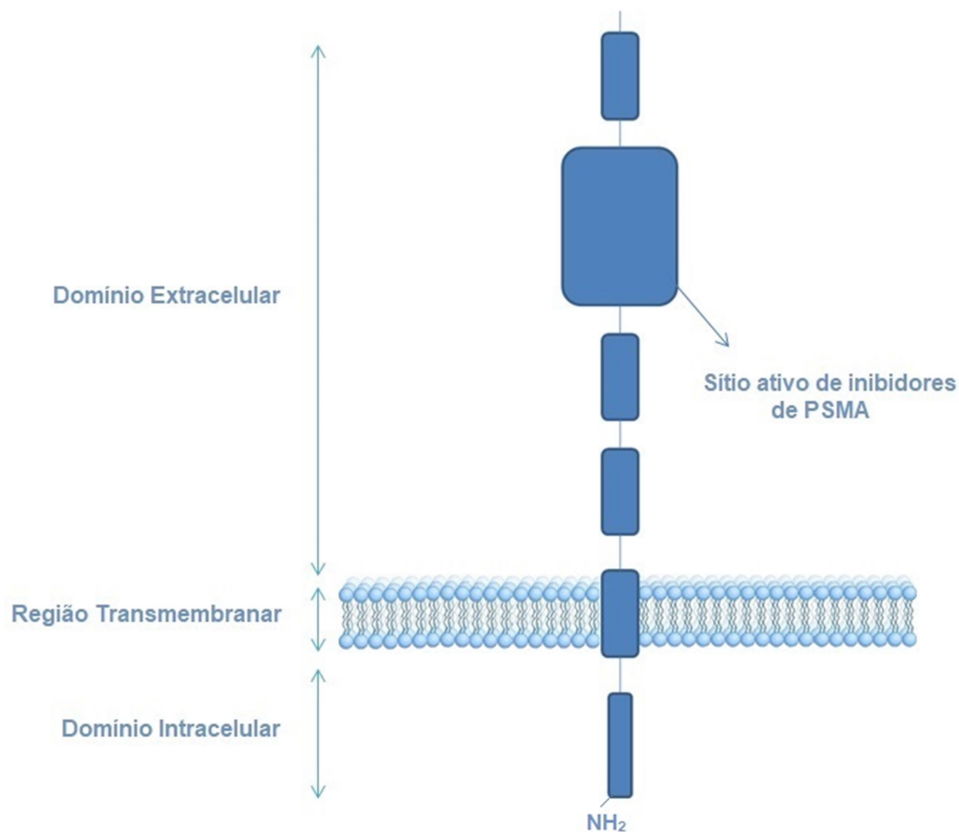
O PSMA é descrito como folato hidrolase, glutamato carboxipeptidase II (GCP II), dipeptidase ácida ligada em alfa n-acetilada (NAALADase) ou ainda por ácido N-acetilaspartilglutâmico (NAAG) peptidase. É uma proteína glicolítica transmembranar do tipo II, com peso molecular de aproximadamente 100 kDa, e tem como principal função enzimática de liberar glutamato nas moléculas do substrato. É superexpresso na superfície celular do câncer de próstata, cerca de 1000 vezes maior do que a expressão encontrada em outros tecidos, como rins, intestino delgado e o próprio tecido da próstata. A atividade do PSMA se inicia quando o substrato NAAG se liga no domínio extracelular do PSMA, ocorrendo hidrólise deste substrato que resulta nos produtos N-acetil aspartato (NAA) e glutamato (figura 5) (OKARVI, 2019).

Figura 5 - Ilustração da clivagem hidrolítica do substrato NAAG pelo PSMA (GCP II) em NAA e glutamato



Fonte: Autor

Figura 6 - Representação do PSMA e seus domínios de interesse



Fonte: Autor, baseado no trabalho de OKARVI, 2019.

O PSMA, ilustrado na figura 6, possui um terminal amino citoplasmático curto com 19 aminoácidos, um único domínio que abrange a região da membrana e um grande domínio extracelular com 707 aminoácidos. Os domínios extracelulares exibem sequências com aminopeptidases que possuem sítios de ligação de zinco binuclear, no qual os dois íons de zinco compartilham um ligante de carboxilato em ponte. O GCP II também é expresso no parênquima da próstata humana, de onde foi clonado pela primeira vez e denominado como PSMA (TATEISHI, 2020).

Em células tumorais, a melhor hipótese do PMSA ser expresso nesse tecido seria de estar envolvido na angiogênese, visto que um aumento de expressão do PSMA foi encontrado no estroma adjacente à neovascularização de tumores sólidos. Devido à expressão alta e seletiva em 90-100% das lesões locais de CP, assim como em metástases e linfonodos, o PSMA se revela como um ótimo marcador de CP (LÜTJE et al., 2015).

Além de ser significativamente superexpresso em quase todas as células de CP, a expressão do PSMA aumenta conforme os estágios da doença, sendo diretamente proporcional aos avançados das lesões. Além disso, a forma como o PSMA é capaz de captar um ligante direcionado a ele é extremamente efetiva, ocorrendo através de uma reciclagem endossômica, aumentando a captação e retendo-se ainda mais no tumor. Essa ligação fornece uma melhor qualidade de imagem para procedimentos diagnósticos e uma alta dose local para aplicações terapêuticas (EIBER *et al.*, 2017).

Neste cenário, o ProstaScint (Capromab Pendetide-¹¹¹In; EUSA Pharma) foi um dos primeiros traçadores aprovado pela *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) que tinha como foco o PSMA. O radiofármaco era formado por um anticorpo anti-PSMA radiomarcado In-111, tendo como alvo o domínio intracelular do PSMA, agindo nas células tumorais após sua internalização ou em células mortas que tinham suas membranas já corrompidas, facilitando sua entrada. Sua aplicação em imageologia ficou limitada devido à relação tumor/radiação de fundo ser baixa, além de ser observado captação não seletiva em outros órgãos. Posteriormente, vários outros anticorpos monoclonais de afinidade alta, dirigidos aos domínios extracelulares do PSMA foram desenvolvidos, mas apresentavam desvantagens que limitavam seu uso. A meia-vida circulatória relativamente longa (3-4 dias) e penetração tumoral baixa fizeram dos anticorpos monoclonais uma alternativa não adequada, especialmente em aplicações em análises com tempo precoce (LÜTJE *et al.*, 2015).

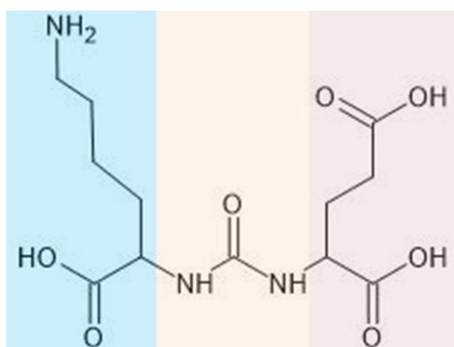
Paralelamente, pequenas moléculas de inibidores de PSMA com afinidade alta começaram a ser estudadas para atuar como agentes teranósticos. Esses pequenos compostos ganharam muito interesse devido à penetração no tumor maior e melhor, se tornando ótimos candidatos à radiomarcagem (RUANGMA *et al.*, 2018).

Atualmente, há três tipos de inibidores com base nas porções de ligação de zinco do PSMA: à base de fósforo, à base de tiol e à base de ureia. O inibidor à base de fósforo consegue se ligar ao núcleo de fosfonato nos dois íons de zinco localizados no domínio ativo do PSMA. O inibidor à base de tiol é

igual ao baseado em fósforo, diferenciando-se apenas pela sua polaridade. O inibidor à base de ureia, no entanto, é internalizado pela célula logo após sua ligação ao domínio ativo do PSMA externo (TATEISHI, 2020).

Assim, tendo como base a estrutura química do NAAG, alguns inibidores de PSMA compostos pelas espécies glutamato-ureia-R foram sintetizados. Através da modificação no grupo R, podendo ser um grupo lisina (Lys) ou outro grupo glutamato (Glu), os inibidores de PSMA demonstraram internalização alta e ligações seletivas ao PSMA. A figura 7 mostra a estrutura base para o farmacóforo à base de Lys-ureia-Glu (OKARVI, 2019).

Figura 7 - Estrutura molecular do farmacóforo à base de ureia, Lys-ureia-Glu, destacados da esquerda para a direita, respectivamente

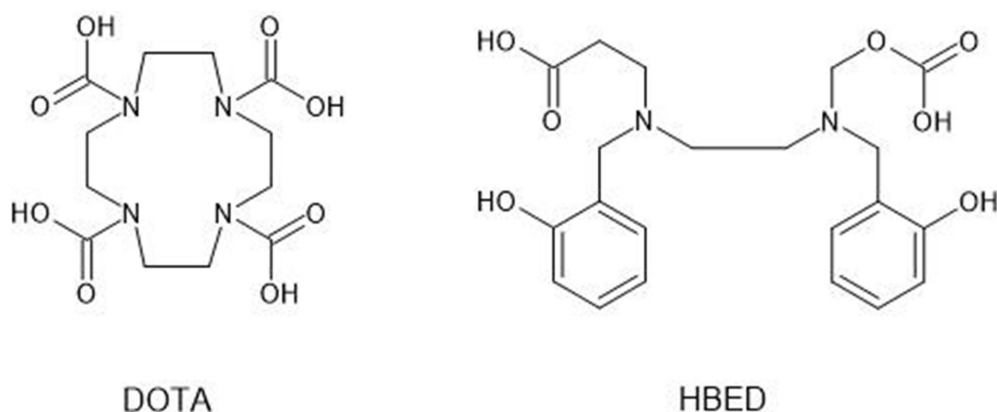


Fonte: Autor

3.3.1 Radiofármacos à base de PSMA

Para a radiomarcagem com radioisótopos metálicos, radiofármacos com o farmacóforo Glu-ureia-Lys são covalentemente ligadas a vários agentes quelantes, como DOTA e HBED-CC (figura 8), por meio de grupos ligantes. Esses agentes quelantes bifuncionais possuem a capacidade de formar um complexo forte e estável com um radiometal em uma de suas extremidades, enquanto que se liga covalentemente ao agente farmacóforo na outra extremidade. Para o radioisótopo flúor-18 é usado um agente prostético que permite a fluoração nucleofílica da proteína (OKARVI, 2019).

Figura 8 - Exemplos de agentes quelantes usados para radiomarcção de metais



Fonte: Autor

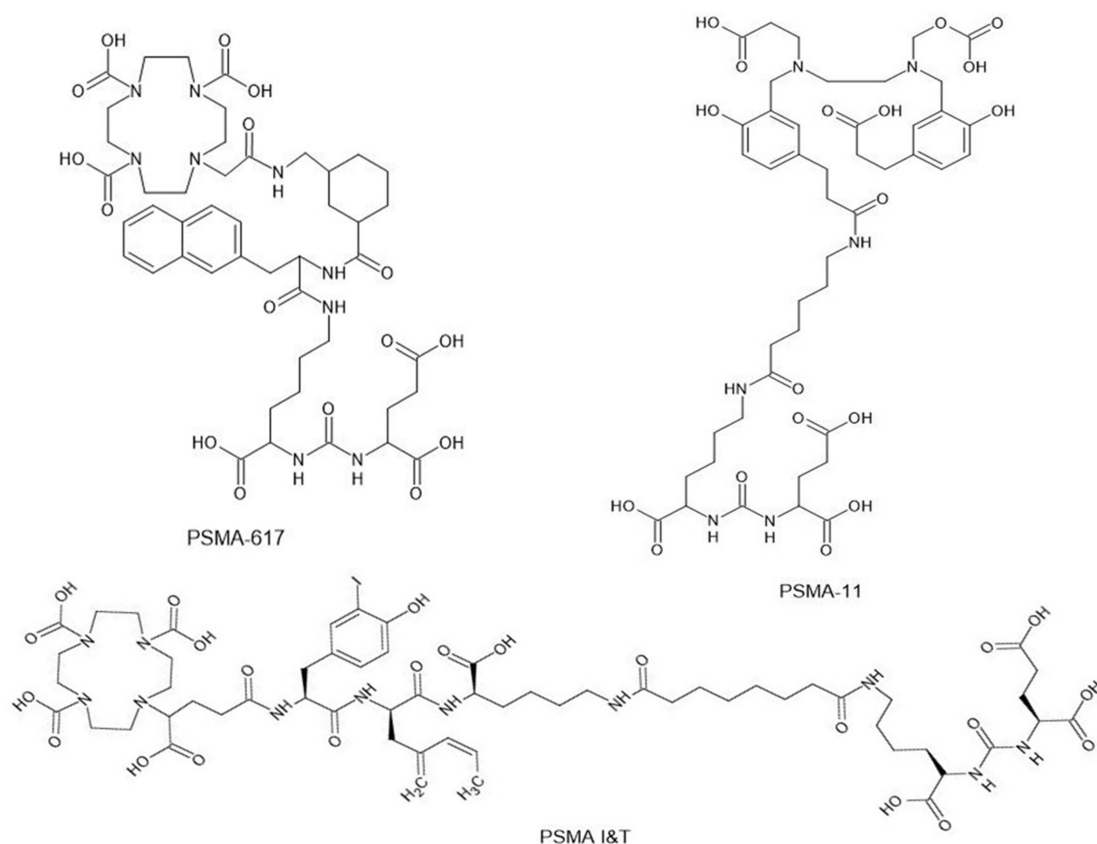
A ligação entre o farmacóforo e a porção radiomarcada é feita por grupos funcionais ligantes. Muitas vezes desempenham um papel fundamental no direcionamento dos peptídeos e na sua farmacocinética, além de influenciar diretamente na sua absorção pelo tumor (OKARVI, 2019).

Foi demonstrado em um estudo com inibidores de PSMA marcados com gálio-68 com valência III e VI, que o composto com ligante contendo fenilalanina influenciou a lipocifilidade do peptídeo, tornando-o mais lipofílico devido a presença do anel aromático, impactando positivamente no seu desempenho na geração de imagens (BANERJEE *et al.*, 2010).

Outra alternativa que fornece maior retenção ao inibidor seriam ligantes carregados negativamente, considerando que o sítio ativo do PSMA fornece uma ligação bastante específica para os aminoácidos glutamato e aspartato (WESTER; SCHOTTELIUS, 2019).

Com isso, vários agentes inibidores de PSMA foram desenvolvidos para aplicações clínicas com diferentes ligantes, radioisótopos e aplicações. Na figura 9 estão ilustrados alguns agentes já em uso para câncer de próstata.

Figura 9- Estrutura molecular base dos radiofármacos PSMA-617, PSMA I&T e PSMA-11



Fonte: Autor

Para exames SPECT/CT encontram-se descritos radiofármacos marcados com tecnécio- ^{99m}Tc como HYNIC-PSMA- ^{99m}Tc (SU *et al.*, 2017) e MIP-1404- ^{99m}Tc (SCHMIDKONZ *et al.*, 2018), ou marcado com ^{111}In , como PSMA-I&T- ^{111}In (SCHOTTELIUS *et al.*, 2015).

Para terapia de câncer de próstata, derivados de PSMA marcados com ^{177}Lu como o PSMA-I&T (WEINEISEN *et al.*, 2015) e PSMA-617 (KHREISH *et al.*, 2020), ou marcados com ^{225}Ac como o PSMA-617- ^{225}Ac (KRATOCHWIL *et al.*, 2020) e radioisótopos de iodo como $^{124}\text{I}/^{131}\text{I}$ (MIP-1095- $^{124}\text{I}/^{131}\text{I}$) (ZECHMANN *et al.*, 2014) foram descritos.

Radiofármacos como PSMA-11- ^{68}Ga (FENDLER *et al.*, 2019), DCFPyI- ^{18}F (MENA *et al.*, 2020) e o PSMA-1007- ^{18}F (WATABE *et al.*, 2021) estão entre os mais estudados, sendo que o PSMA-11- ^{68}Ga tem grande papel na medicina nuclear atual.

3.3.1.1 PSMA-11-⁶⁸Ga

Atualmente, o Glu-NH-CO-NH-Lys-(Ahx)-HBED-CC-⁶⁸Ga, mais conhecido como PSMA-11-⁶⁸Ga, está entre os agentes mais amplamente usados para imagens PET/CT de câncer de próstata. Ele pertence à classe de inibidores de PSMA à base de ureia, e os primeiros relatórios clínicos sobre o PSMA-11-⁶⁸Ga PET/CT foram publicados entre 2012 e 2013 (BOIS *et al.*, 2020).

Seu agente HBED-CC foi proposto como um eficiente quelante devido à natureza lipofílica, além de exibir cinética de complexação rápida do Ga (III) e promover estabilidade alta *in vitro* e *in vivo* (EDER *et al.*, 2012).

O radionuclídeo gálio-68 apresenta tempo de meia vida físico de 68 minutos e decai por emissão de pósitrons com abundância de 89%. Pode ser obtido através de geradores ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga, que permitiu a produção do radiofármaco em centros médicos usando kits liofilizados com alto grau de pureza e pronto uso (KURASH *et al.*, 2020).

O PSMA-11-⁶⁸Ga é amplamente utilizado em várias indicações clínicas, incluindo estadiamento de pacientes com CP de risco intermediário a alto ou para casos de recorrência bioquímica, apresentando superioridade em relação a outros radiofármacos disponíveis como colina-¹¹C em PET/CT (SCHWENCK *et al.*, 2017).

Por ser altamente específico, o PSMA-11-⁶⁸Ga apresenta taxas de detecção de aproximadamente 50%, relatadas mesmo em níveis de PSA menores que 0,5 ng/mL. Portanto, atua com grande impacto no planejamento de radioterapias e nos delineamentos pós-tratamento em pacientes (CALAIS *et al.*, 2018).

Em dezembro de 2020, a FDA aprovou o PSMA-11 marcado com gálio-68 como o primeiro medicamento para imagens PET para homens com câncer de próstata (FDA, 2020). Em abril de 2021, a monografia oficial do radiofármaco foi publicada na décima edição da Farmacopeia Europeia intitulada “*Gallium (68Ga) PSMA-11 injection*” (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021b).

Em relação ao compêndio nacional, a Farmacopeia Brasileira 6ª edição, há somente cinco radiofármacos com monografias publicadas, sendo um radiomarcado com flúor-18 e os demais com tecnécio-99m. Apesar de ser amplamente reconhecido e aplicado, o PSMA-11-⁶⁸Ga não possui monografia no Brasil.

3.3.1.1.1 Comparação entre os radionuclídeos flúor-18 e gálio-68

Flúor-18 e gálio-68 são os principais radioisótopos para traçadores à base de PSMA e, apesar do PSMA-11-⁶⁸Ga ser amplamente utilizado, o mesmo possui algumas desvantagens. Sua principal vantagem é a disponibilidade comercial que o Ga-68 oferece por meio dos geradores, permitindo a produção de lotes de aproximadamente 2–4 doses por eluição. No entanto, o Ga-68 tem tempo de meia-vida físico muito curto, permitindo apenas o uso local do radiofármaco, tornando a entrega de doses prontas com atividades suficientes para centros remotos um desafio (KESCH *et al.*, 2017a).

Em relação à formação de imagens, o F-18 possui vantagem por possuir um decaimento nuclear favorável. O F-18 exibe energia de emissão de pósitrons de 0,6 MeV, energia baixa em comparação ao do Ga-68 de 1,9 MeV. Portanto, a distância para desacelerar o pósitron vindo do flúor no tecido humano é muito menor, resultando em uma resolução de imagem muito maior (DIETLEIN *et al.*, 2015).

Para centros que não têm acesso a um ciclotron e têm um número moderado de exames, os geradores de ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga apresentam um investimento razoável. Consequentemente, em grandes centros com muitos pacientes, várias produções por dia são necessárias, ou múltiplos geradores precisam ser operados simultaneamente, multiplicando os custos. Neste caso, um acelerador ciclotron e radiotraçadores marcados com F-18 representam a melhor opção (KESCH *et al.*, 2017a).

A tabela 1 compara os dois radionuclídeos levando em consideração alguns pontos importantes, necessários para a escolha do melhor radioisótopo para a aplicação em PET.

Tabela 1 - Comparação entre Ga-68 e o F-18

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 Póstron	1,90 MeV (profundidade de penetração do póstron 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)
Marcação	Molécula quelante (necessário ambiente controlado; kits ou módulo de síntese)	Moléculas de grupo prostético (necessário ambiente controlado; requer <i>hot cells</i> e módulos de síntese)
Abordagem teranóstica	Radiomarcção com radionuclídeos diagnóstico e terapêutico (ex: ¹⁷⁷ Lu, ²²⁵ Ac, ²¹³ Bi) possíveis	Diferentes estruturas químicas dos agentes de diagnóstico e terapêutico que se relacionam (ex: PSMA-1007 / PSMA-617, DCFPyl / MIP-1095)
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); radiosintetizadores 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.*, 2017^a.

Levando em conta as limitações que o Ga-68 oferece, vários estudos foram realizados a fim de estabelecer um radiofármaco capaz de carregar o F-18 e ter um melhor desempenho na detecção de lesões. KUTEN *et al.* (2020)

avaliaram lado a lado o PSMA-11-⁶⁸Ga com um novo composto, PSMA-1007-¹⁸F, em 16 pacientes com risco alto e intermediário. Foi avaliado não só o radionuclídeo como a atuação dos dois inibidores frente aos resultados encontrados por PET, tendo como referência espécimes histopatológicos. Ambos os radiotraçadores mostraram boa performance e taxa de detecção alta, e a superioridade do flúor só ficou evidente na qualidade da imagem. Em relação às regiões de retenção, o PSMA-11-⁶⁸Ga apresentou excreção renal, enquanto que o PSMA-1007-¹⁸F apresentou excreção hepatobiliar, não tendo acúmulo de atividade na região local pélvica e, com isso, possibilitando melhor visualização das lesões locais.

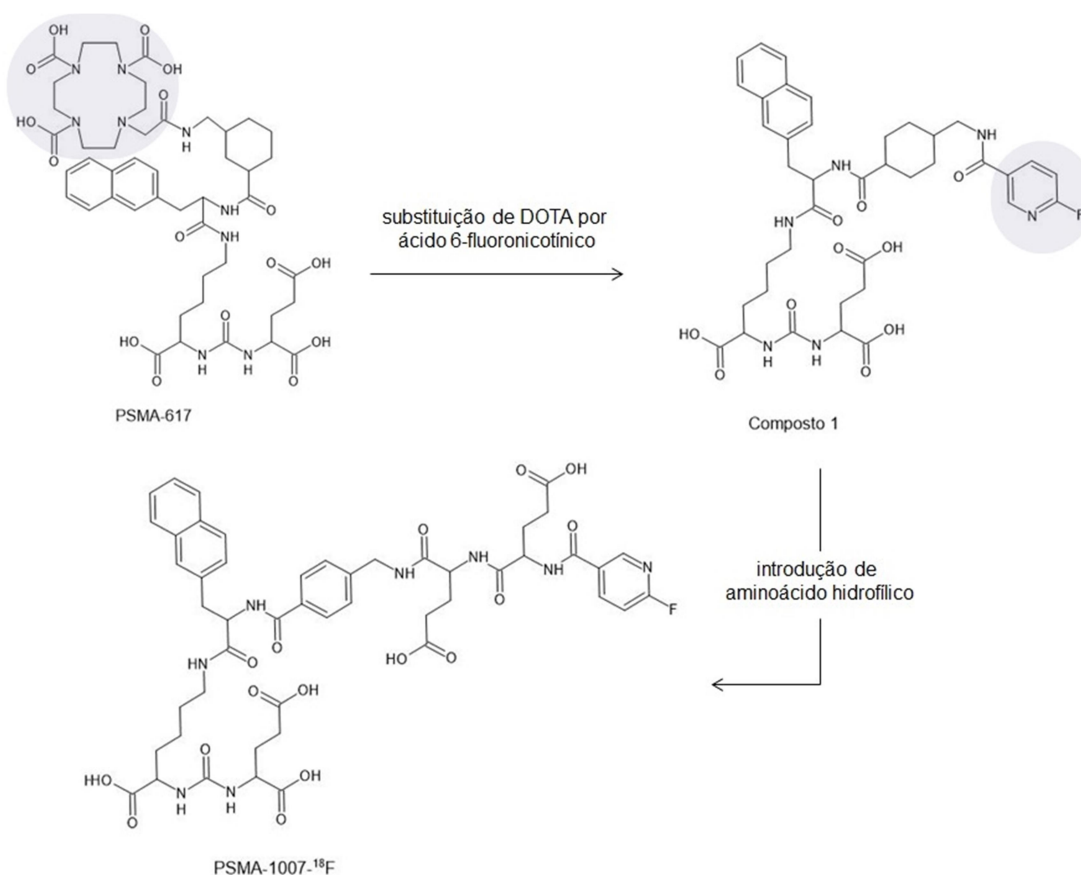
Outro estudo foi realizado comparando os dois radiotraçadores, neste caso analisando 102 pacientes com recorrência bioquímica entre os anos 2017 e 2018. O PSMA-1007-¹⁸F conseguiu detectar 369 lesões em comparação a 178 detectadas pelo PSMA-11-⁶⁸Ga, dentre elas benignas que foram identificadas 5 vezes mais do que o PSMA-11 marcado com gálio. Essa discrepância entre as detecções pode ser atribuída à energia do F-18, que melhora a resolução da imagem, além do fato do inibidor PSMA-1007 ter maior afinidade pelo PSMA e ter maior internalização do que o PSMA-11 (RAUSCHER *et al.*, 2020).

Não só o PSMA-1007-¹⁸F, mas outros inibidores marcados com F-18 foram desenvolvidos e vêm chamando a atenção por apresentar propriedades nucleares e biológicas comparáveis ou até superiores aos inibidores marcados com Ga-68. Um estudo comparativo entre PSMA-11-⁶⁸Ga e o composto DCPyL-¹⁸F, segunda geração de compostos à base de ureia marcados com F-18, investigou retrospectivamente a biodistribuição dos dois radiotraçadores em 34 pacientes. No geral, ambos os inibidores apresentaram retenção em órgãos não-alvo como rins, baço e glândulas salivares, órgãos receptores de PSMA, indicando especificidade. O tempo de meia vida físico do F-18 tornou capaz realizar imagens mais tardias, nas quais compostos mais lipofílicos conseguem ter uma razão tumor/radiação de fundo maior e detectar lesões menores com uma definição melhor. Limitação essa que o PSMA-11-⁶⁸Ga não conseguiu superar o DCPyL-¹⁸F, mas para rotina médica, ambos são excelentes opções (FERREIRA *et al.*, 2019).

3.3.1.2 PSMA-1007-¹⁸F

O PSMA-1007-¹⁸F (((3S, 10S, 14S) -1- (4 - (((S) -4-carboxi-2- ((S)-4-carboxi-2- (6-¹⁸F-fluoronicotinamido)butanamido)butanamido)metil)fenil)-3-(naftaleno-2-ilmetil)-1,4,12-trioxo-2,5,Ácido11,13-tetraazahexadecano-10,14,16-tricarboxílico)) foi descoberto em 2016 como resultado de um estudo de desenvolvimento de novos ligantes de PSMA radiofluorados para o diagnóstico de câncer de próstata. Sua estrutura foi baseada no PSMA-617, pois o mesmo oferece amplas oportunidades de radiomarcagem com diferentes radionuclídeos para imagens e terapia por meio do quelante DOTA em sua estrutura (CARDINALE *et al.*, 2020). No desenvolvimento de novas novas moléculas, o agente quelante foi substituído pelo ácido 6-fluoronicotínico, que permite a fácil introdução de flúor-18 na molécula. Essa mudança fez com que o inibidor perdesse sua hidrofiliabilidade e impactasse negativamente na sua biodistribuição. Assim, aminoácidos hidrofílicos foram adicionados ao ligante, levando ao desenvolvimento de PSMA-1007-¹⁸F (CARDINALE *et al.*, 2020).

Na Figura 10 está ilustrado o esquema de formação do radiofármaco PSMA-1007-¹⁸F a partir do PSMA-617.

Figura 10 - Esquema de composição do PSMA-1007-¹⁸F a partir do PSMA-617

Fonte: Autor

O PSMA-1007 foi desenvolvido na Alemanha com sua patente publicada em 6 de abril de 2017, oficializando sua descoberta para o mundo. Mesmo tendo diferenças em suas estruturas, o PSMA-1007 e o PSMA-617 mostram biodistribuições similares, podendo atuar em conjunto como agente teranóstico (GIESEL *et al.*, 2016).

O fato do ligante ser marcado com F-18, que possui energia de pósitrons baixa, oferece melhor qualidade de imagem, e a meia-vida de 110 minutos permite o transporte para centros de medicina nuclear mais distantes quando comparado ao gálio. Havendo a possibilidade de radiofarmácias PET serem conectadas a um ciclotron local, o PSMA-1007-¹⁸F consegue ser produzido em larga escala. Além disso, o PSMA-1007-¹⁸F é eliminado principalmente pela via hepatobiliar devido às suas características lipofílicas moderadas vindas do ligante. Portanto, quase nenhuma atividade via urina ocorre, proporcionando condições ideais e superiores aos do PSMA-617 (KESCH *et al.*, 2017b).

O radiofármaco é extremamente específico, como foi demonstrado por SOEDA *et al.* (2019) que estudaram a influência de concentrações de peptídeos na biodistribuição do PSMA-1007-¹⁸F *in vivo*. Diferentes concentrações de peptídeos de PSMA não radiomarcado foram usados em camundongo a fim de avaliar as mudanças na biodistribuição usando o PSMA-1007-¹⁸F como base, variando sua atividade molar. Este estudo revelou que uma diminuição da atividade molar da solução injetada de PSMA-1007-¹⁸F resultou na diminuição da captação no tumor e em órgãos normais. A glândula salivar foi mais sensível do que o tumor à diminuição da atividade, e seu ajuste pode reduzir a captação da glândula salivar enquanto mantém a captação do tumor. Essa alta captação de inibidores de PSMA pela glândula salivar pode ser usado a favor da medicina, visto que o PSMA-PET/CT pode ser usado para a detecção de cânceres de glândulas salivares recorrentes e metastáticos, carcinomas de células escamosas ou tumores benignos de glândulas salivares. Essa quantificação individual desses tecidos traz benefícios para uma aplicação radioterapêutica (TILSEN *et al.*, 2021).

3.3.1.2.1 Estudos clínicos com o PSMA-1007-¹⁸F

GIESEL *et al.* (2018b) realizaram o primeiro estudo comparando o PSMA-1007-¹⁸F com o DCPyL-¹⁸F, respectivamente, terceira e segunda geração de compostos inibidores de PSMA radiomarcados com F-18. Doze pacientes foram submetidos aos dois radiotraçadores a fim de comparar intraindividualmente seu desempenho, visto que ambos carregam o mesmo radionuclídeo e compartilham o mesmo farmacóforo. O estudo demonstrou que tanto DCPyL-¹⁸F quanto PSMA-1007-¹⁸F fornecem excelente qualidade de imagem de CP local e metastático. Como a avaliação de imagens da pele é mais frequentemente utilizada, a excreção não urinária do PSMA-1007-¹⁸F apresenta uma vantagem prática, especialmente para o estadiamento primário e em casos de suspeita de recorrência local.

Mais tarde, em 2021, WONDERGEM *et al.* (2021) realizaram mais um estudo comparando os dois radiotraçadores, agora com 240 pacientes. Comprovaram a eficiência dos dois radiofármacos e salientaram a relevância clínica do PSMA-1007-¹⁸F sobre o DCPyL-¹⁸F. O PSMA-1007-¹⁸F detecta significativamente mais lesões suspeitas do que o DCPyL-¹⁸F na região

prostática, e isso para pacientes com recorrência bioquímica é de extrema importância clínica decorrente da menor secreção urinária desse radiofármaco. Outro fator importante é a captação alta de lesões ósseas duvidosas encontradas com PSMA-1007-¹⁸F, fato que se tornou frequente em sua literatura resultando em uma característica indesejada e de pouco valor clínico. Contudo, esta desvantagem não resultaria em sua eliminação como candidato à radiotraçador para pacientes que procuram um bom diagnóstico.

Investigações com o consagrado FDG-¹⁸F também foram realizadas, estudando sua eficiência contra o PSMA-1007-¹⁸F. Por se tratar de mecanismos de captação diferentes, era esperado que o PSMA-1007-¹⁸F obtivesse resultados superiores ao FDG-¹⁸F, o que realmente aconteceu. Dos 21 pacientes avaliados com lesões metastáticas e primárias, o PSMA-1007-¹⁸F detectou lesões em 100 % dos pacientes avaliados (21/21) enquanto que o FDG-¹⁸F detectou somente 67 % (14/21). A captação alta pelos órgãos não-alvo também foi observada pelo PSMA-1007-¹⁸F, no qual esse fenômeno foi atribuído ao fato de a captação ocorrer também em processos inflamatórios, mas ainda não pode ser confirmado (ZHOU *et al.*, 2021).

RAHBAR *et al.* (2018a) estudaram o tempo de aquisição de imagem usando 40 pacientes, dos quais 28 apresentaram recidiva bioquímica, 9 foram examinados para acompanhamento de terapia e 3 foram examinados para estadiamento primário. O grupo avaliou os tempos 60 e 120 minutos, e atestou que todas as 136 lesões ficaram visíveis em ambos os tempos, com exceção de um linfonodo que ficou visível apenas em 120 minutos. As lesões características de CP, que englobam metástases, linfonodos e a própria próstata mostraram captação e contraste significativamente maiores nas imagens tardias, levando o grupo a recomendar que imagens PET/CT com PSMA-1007-¹⁸F sejam realizadas em 120 minutos ao invés de 60. Um fato que corrobora essa afirmação seria a farmacocinética do PSMA-1007-¹⁸F, que é mais lenta do que a do PSMA-11-⁶⁸Ga, o que reforça a recomendação para um exame mais tardio.

Em relação aos métodos utilizados atualmente para detecção de câncer de próstata, a imagem PET/CT com PSMA-1007-¹⁸F se apresenta como uma

ferramenta tão boa quanto as demais. Um estudo conduzido por KESCH *et al.* (2017b) comparou a eficiência do radiotraçador em relação à ressonância magnética multiparamétrica (RMM), que combina as técnicas de difusão e perfusão tornando-a mais sensível e específica para localizar e detectar lesões. Tendo como alvo dez pacientes com CP de alto risco, o PSMA-1007-¹⁸F mostrou alta sensibilidade (71 % do total), especificidade (81 % do total) e precisão (75 % do total), tendo resultados superiores ao RMM nas análises por lesões, com menos falsos negativos e menos falsos positivos. O PET/CT com PSMA-1007-¹⁸F se apresenta como uma ótima ferramenta para detecção e formação de imagens de CP, podendo ser usado em conjunto com a RMM.

MALASPINA *et al.* (2021) compararam prospectivamente PET/CT com PSMA-1007-¹⁸F, ressonância magnética de corpo inteiro usando imagem ponderada em difusão e CT no estadiamento primário de homens com CP de risco intermediário e alto. Setenta e nove pacientes foram submetidos aos três métodos de diagnóstico dentro de um período de duas semanas. Para a validação das lesões, foram utilizados espécimes histopatológicos e dados de acompanhamento clínico. Em trinta e um pacientes (39 %) portadores de metástase em linfonodos pélvicos, apenas o PSMA-1007-¹⁸F por PET/CT foi capaz de detectar linfonodos metastáticos em 8/31 (26 %) pacientes, enquanto as outras duas modalidades de imagem foram relatadas como negativas. De todas as lesões metastáticas detectadas pelo PSMA 1007-¹⁸F, 126/170 (74 %) eram menores que o valor de corte anatômico de 8 mm, dos quais 90 linfonodos tinham o diâmetro entre 5 e 8 mm e 36 eram menores que 5 mm. Com isso, em comparação com as outras duas modalidades de imagem, o PET/CT com PSMA-1007-¹⁸F demonstrou sensibilidade e precisão superiores e taxa de detecção maior, sendo concordante com a histopatologia em 14/17 (82 %) pacientes, enquanto que os números correspondentes para RM e CT foram 12/17 (71 %) e 11/17 (65 %), respectivamente.

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O trabalho se iniciou com o estudo da síntese do radiofármaco PSMA-1007-¹⁸F por meio de teste feitos sem a presença de produto radioativo, para a avaliação da metodologia, módulo e programação utilizada. Posteriormente, as sínteses com material radioativo foram realizadas a fim de determinar o rendimento para diferentes atividades de flúor-18 empregadas. O procedimento seguiu as descrições fornecidas pelo fabricante e a literatura correspondente foi consultada garantindo sua eficiência. Nenhuma modificação foi necessária na programação usada, mantendo o arquivo original.

As sínteses do radiofármaco PSMA-1007-¹⁸F foram realizadas com atividade alta, sendo necessário seu fracionamento em amostras com atividades menores para sua manipulação em bancada, além de simular o processo rotineiro de fracionamento do produto em doses comerciais.

O processo seguiu com a divisão das amostras para o controle de qualidade e para os ensaios planejados. As metodologias usadas para a determinação da pureza radioquímica foram retiradas da literatura e da monografia do PSMA-1007-¹⁸F da Farmacopeia Europeia 10ª edição, incluindo os testes de pureza química, pureza radioquímica, pH, pureza e identidade radionuclídica, aparência do produto, esterilidade e endotoxinas bacterianas. Além dos testes descritos, realizou-se estudo de estabilidade do radiofármaco para determinar o prazo de validade e a determinação do coeficiente de partição para avaliar a lipofilicidade do radiofármaco.

Com base nos dados extraídos do ensaio de pureza radioquímica, foi elaborado e executado o protocolo de validação da metodologia analítica aplicada na determinação da pureza radioquímica do PSMA-1007-¹⁸F por cromatografia em camada delgada, afim de demonstrar sua adequabilidade às condições de análise empregadas.

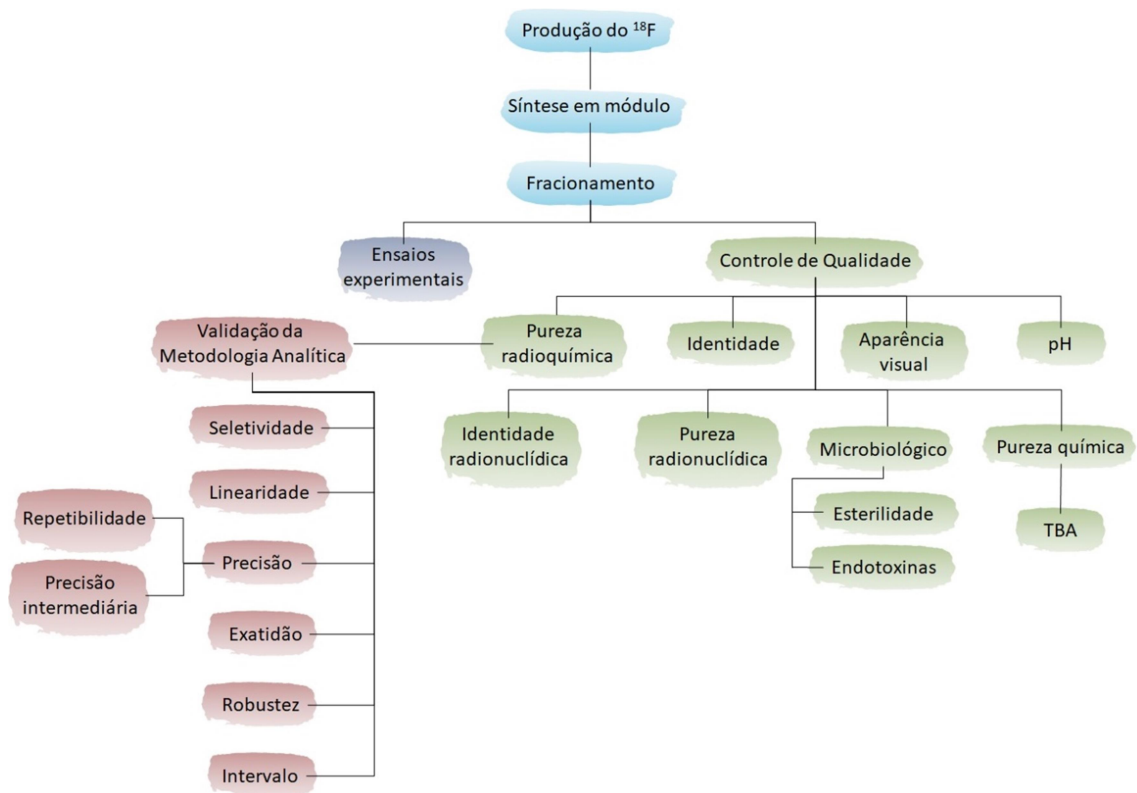
O trabalho contemplou os ensaios pré-clínicos *in vivo* e *in vitro*. Os ensaios *in vitro* foram realizados com base na literatura, e o ensaio de internalização e de competição foram executados em colaboração com o Centro de Biotecnologia do IPEN/CNEN-SP, por meio do cultivo celular do

modelo tumoral LNCaP. Os ensaios *in vivo* foram feitos em duas etapas: a primeira com animais BALB/c sadios com o objetivo de estudar a biodistribuição do PSMA-1007-¹⁸F e sua farmacocinética; a segunda com animais SCID com modelo tumoral LNCaP, além de realizar um estudo de competição *in vivo* com o agente competidor PSMA I&T e de imagens em micro PET/CT para ilustrar o comportamento biológico e especificidade do radiofármaco.

Foi elaborado um ensaio para estudar a robustez do método de determinação do tetrabutylamônio (TBA) no produto final, usando como base os parâmetros disponíveis na literatura do próprio PSMA-1007-¹⁸F, capítulo geral sobre TBA em preparações radiofarmacêuticas e em monografias que utilizam o TBA em sua formulação.

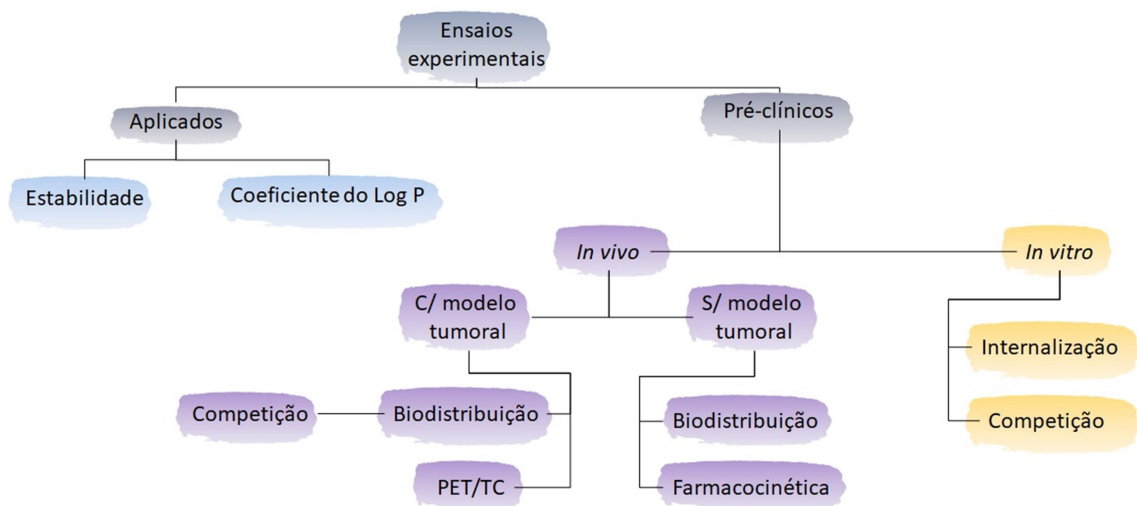
Na figura 11 está ilustrado o esquema do delineamento experimental do trabalho, e na figura 12 o esquema dos ensaios realizados.

Figura 11 - Esquema do delineamento experimental do presente trabalho



Fonte: Autor

Figura 12 - Esquema dos estudos químicos e biológicos realizados no presente trabalho



Fonte: Autor

5 MATERIAIS

5.1 Infraestrutura

Este trabalho foi executado nos laboratórios de Pesquisa e Desenvolvimento e laboratórios de Controle de Qualidade na instalação de radiofarmácia e na instalação de aceleradores cíclotron do Centro de Radiofarmácia; nos laboratórios de Cultivo Celular e Biotério do Centro de Biotecnologia. Todas essas dependências se encontram no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP), e todas oferecem infraestrutura adequada para a produção, manipulação e descarte de materiais radioativos, bem como soluções químicas, células e animais para os experimentos.

5.2 Reagentes e Soluções

- Kit de marcação do PSMA-1007-¹⁸F para síntese automatizada com os seguintes componentes:
 - Agulha Sterican ® Safety 0,60 x 60 mm, 23G x 2 ³/₈” (B.Braun, Alemanha);
 - Agulhas Sterican ® Safety 0,90 x 70 mm, 20G x 2 ³/₄” (B.Braun, Alemanha);
 - Bolsa de 100 mL ± 10% de água para injetáveis (ABX, Alemanha);
 - Cassete para marcação (ABX, Alemanha);
 - Cartucho de coluna catiônico PS-H⁺ (Merck, Alemanha);
 - Cartucho de coluna orgânica C18ec (Merck, Alemanha);
 - Cartucho pré-condicionado Sep-PAK ® QMA com CO₃²⁻ como contra-íons (ABX, Alemanha);
 - Filtro respiradouro hidrofóbico Millex-25 0,2 µm com agulha (Merck, Alemanha);
 - Filtro Cathivex-GV 0,22 µm (Merck, Alemanha);
 - Frasco âmbar com 2,2 mL ± 0,1 mL de Dimetilsulfóxido (ABX, Alemanha);

- Frasco âmbar com 400 mg \pm 20 mg de ascorbato de sódio (ABX, Alemanha);
- Frasco com 8,5 mL \pm 0,3 mL de solução etanol 30% (ABX, Alemanha);
- Frasco com 8,0 mL \pm 0,2 mL de etanol (ABX, Alemanha);
- Frasco com 15 mL \pm 0,5 mL de solução tampão fosfato salina (ABX, Alemanha);
- Frasco com 5,7 mL \pm 0,2 mL de etanol para bolsa de água (ABX, Alemanha);
- Frasco com 1,6 mg \pm 0,1 mg de precursor PSMA-1007 (ABX, Alemanha);
- Frasco com 750 μ L \pm 20 μ L de solução de hidróxido de tetrabutílamônio estabilizada com etanol (ABX, Alemanha);
- Seringas BD Plastipak de 3 mL (Becton, Dickinson and Company - BD, EUA)
- Seringas BD Plastipak de 30 mL (Becton, Dickinson and Company - BD, EUA)
- Seringa Injekt Luer de 10 mL (B.Braun, Alemanha);
- Ácido fosfórico (H₃PO₄) (Merck, Alemanha);
- Acetonitrila (Merck, Alemanha);
- Água enriquecida em ¹⁸O (Rotem, Israel);
- Água purificada (purificador Milli-XR, EUA);
- Água para injetáveis (API) (Europharma, Brasil);
- Álcool etílico para limpeza (Merck, Alemanha);
- Amônia 25% (NH₃) (Merck, Alemanha);
- Ascorbato de sódio (Sigma Aldrich, EUA);
- Cristais de iodo (Merck, Alemanha);
- Dimetilsulfóxido (C₂H₆OS) (Sigma Aldrich, EUA);
- Etanol (C₂H₅OH) (Merck, Alemanha);
- Fosfato de sódio dibásico (HNa₂ P O₄) (Merck, Alemanha);
- Fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) (Sigma Aldrich, EUA);
- Fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄) (Merck, Alemanha);

- Hidróxido de tetrabutilamonio 30-hidratado ((C₁₆H₃₇NO · 30H₂O)) (Merck, Alemanha);
- Isoflurano – anestésico (Cristália, Brasil);
- Kit de reagente LAL para determinação de endotoxinas bacterianas (The Charles River Endosafe, EUA);
- Meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, EUA)
- Metanol (CH₃OH) (Merck, Alemanha);
- N-octanol (C₈H₁₈O) (Merck, Alemanha);
- Padrão de PSMA-1007-F (ABX, Alemanha);
- Solução de cloreto de sódio (NaCl 0,9%) (Merck, Alemanha);
- Soro fetal bovino (Cultilab, Brasil)
- Tripsina EDTA 0,25% (Cultilab, Brasil)

5.3 Equipamentos, Materiais e Sistemas

- Agitador de microtubos Vortex (Biomixer, China);
- Agitador magnético com aquecimento 725A (Fisatom, EUA);
- Balança analítica (Mettler Toledo, USA);
- Cabine de fluxo laminar para cultivo de células Classe 2 (Scanlaf, EUA);
- Calibrador de dose CRMTM-35R (Capintec, USA);
- Células blindadas para módulos de síntese e processamento de radiofármacos (Comecer, Itália)
- Cíclotron de 18 MeV Cyclone 18/9 do tipo isócrono com 8 saídas de feixe (Ion Beam Applications, IBA. Bélgica);
- Coluna de fase reversa C18 para CLAE – 250 mm x 4,6 mm, 5 µm Symmetry® (Waters, EUA);
- Contador automático tipo poço com cristal NaI (TI) – D5002 Cobra II (Perkin Elmer, USA);
- Cromatógrafo gasoso modelo GC-17A, sistema de injetor automático de amostras AOC-20i. Acoplado na unidade encontra-se o módulo de detecção CBM-102 (Shimadzu, Japão);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo Prominence, composto pelo sistema modulado constituído pela unidade de injetor automático de amostras SIL-AC20 HT, bomba LC-20AT, desgaseificador DGU-20 SR,

detector UV/Vis SPD-20A e módulo comunicador CBM-20A (Shimadzu, Japão). Acoplado a esta unidade, encontra-se o detector de radiação gama – Flow-RAM Radio HPLC Detector (Lablogic, Inglaterra);

- Cubas de vidro para cromatografia de camada delgada (Perlab, Brasil);
- Detector de germânio hiperpuro (HPGe) modelo GX1518, acoplado a um sistema de aquisição multicanal (Canberra, EUA). Dados são tratados pelo software GENIE-PC (Mirion Technologies, EUA);
- Estufa de CO₂ (Binder, EUA);
- Frascos para cultivo de célula (Costar, EUA);
- GraphPad Prism 8.0.2® (GraphPad 8.0.2®, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA);
- LabSolutions GC analysis – software para o controle do sistema de CG (Shimadzu, Japão)
- Laura 4.0 – software para controle do sistema de CLAE (Lablogic, Inglaterra);
- Materiais plásticos descartáveis em geral, tais como ponteiras, seringas, microtubos cônicos com tampa para reação, tubos capilares e tubos cônicos;
- MicroPET/SPECT/CT focus 220 (Siemens AG, Munique, Alemanha)
- Placa para CCD com base de alumínio e matrix de sílica gel 60 20 cm x 20 cm (Merck, Alemanha);
- Placa para CCD com base de alumínio e matriz de sílica gel 60 20 cm x 20 cm (Shijiazhuang Lemandou Chemicals Co, China);
- Placas para cultivo de células aderentes com seis poços (Jet Biofil, China)
- PMOD v3.3 – software para o controle de aquisição de imagens do MicroPET/SPECT/CT (PMOD Technologies LLC, Zurique, Suíça)
- Radiocromatógrafo Scan-RAM Radio-TLC Detector (Lablogic, Inglaterra);
- Seringa de insulina com agulha de 12,7 mm x 0,33 mm (Becton, Dickinson and Company - BD, EUA);
- Sintetizador TracerLab MX (GE, USA);
- Tiras indicadoras de pH (Merck, Alemanha);

- Vidrarias em geral, tais como béqueres, erlenmeyers, balões volumétricos e provetas.

5.4 Animais

Os animais utilizados para os ensaios *in vivo* foram camundongos machos da linhagem BALB/c e SCID, para os ensaios sem e com modelo tumoral, respectivamente, com idade entre 12 e 22 semanas de vida fornecidos pelo Biotério do IPEN/CNEN-SP.

O uso de animais, assim como os experimentos realizados neste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IPEN/CNEN-SP (projeto nº 238/19), realizados de acordo com as normas e orientações estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL).

5.5 Cultivo de Linhagem Celular Humana de Tumor de Próstata Derivada da Metástase Linfonodal - LNCaP

As células de câncer de próstata humano androgênio-dependentes LNCaP foram cultivadas no laboratório do centro de Biotecnologia, sob orientações da Dra Maria Helena Bellini.

6 MÉTODOS

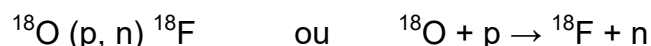
As atividades descritas a seguir foram realizadas com base na literatura disponível, nas especificações e orientações fornecidas pelos fornecedores e nos métodos adotados pela instituição e os critérios de avaliação e de aceitação se encontram em seus respectivos tópicos.

6.1 Produção do PSMA-1007-¹⁸F

Neste item são abordados os conceitos e métodos aplicados na produção automatizada do radiofármaco PSMA-1007-¹⁸F.

6.1.1 Produção do flúor-18

O radioisótopo flúor-18 foi produzido por irradiação de água enriquecida em oxigênio-18 (98 %, Rotem Industries Ltd., Israel) em ciclotron de 18 MeV (Ion Beam Applications - IBA, Bélgica) de acordo com a reação nuclear abaixo:



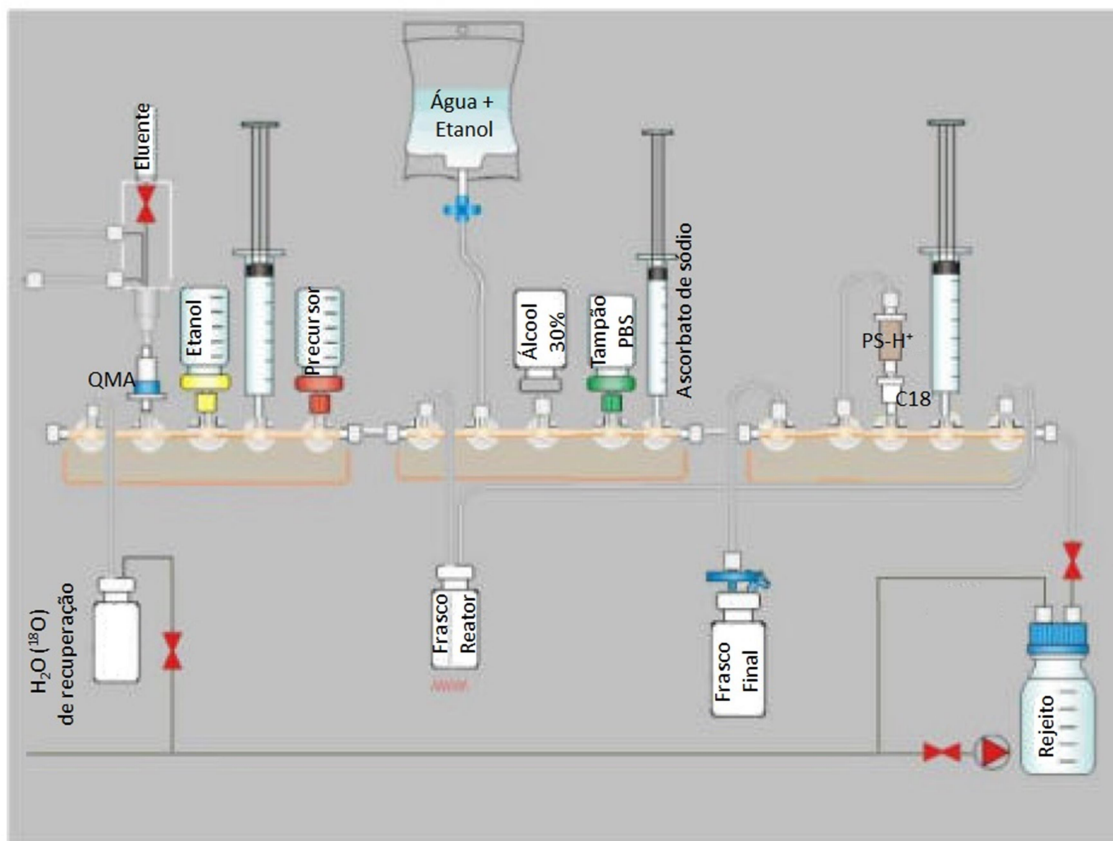
As irradiações foram realizadas na instalação de aceleradores ciclotrons, do IPEN, com feixe de prótons de 18 MeV em um ciclotron de íons positivos. Todas as irradiações foram realizadas da mesma forma, utilizando um alvo de Nióbio. A corrente alvo do ciclotron foi de 5,5 μA , empregando-se cerca de 2,7 mL de água enriquecida em oxigênio-18. O tempo médio de bombardeio para todas as sínteses foi de 90 ± 30 minutos.

6.1.2 Montagem do módulo de síntese do PSMA-1007-¹⁸F

A produção do PSMA-1007-¹⁸F ocorreu em módulo automatizado, por meio de reação de fluoração, purificação e envase do lote, sem a necessidade de manipulação do produto. Para tanto, utilizou-se o módulo de síntese TRACERLAB™ MX (GE, USA) multipropósito. O equipamento foi instalado em uma célula blindada específica para a produção de radiofármacos, operado através de um computador remoto por meio de um software.

Para a síntese do PSMA-1007- ^{18}F foi necessária a utilização de uma programação específica para o radiofármaco fornecida pelo fabricante do kit (ABX, Alemanha). Assim, em conjunto com os reagentes, cartuchos e soluções fornecidas pela ABX, completam o kit de marcação do produto. A tabela 2 lista os componentes integrantes do kit comercial, enquanto que a figura 13 ilustra como os elementos que ficam dispostos no módulo no momento da síntese.

Figura 13 - Esquema de montagem do kit de marcação do PSMA-1007- ^{18}F



Fonte: ABX, 2019 (tradução livre)

Tabela 2 - Itens que compõem o kit de marcação para a síntese do PSMA-1007-¹⁸F e suas respectivas funções

Item	Temperatura	Componentes	Função
Cassete	Temperatura ambiente ($\leq 30\text{ }^{\circ}\text{C}$)	Régua contendo o frasco reator, válvulas, agulhas de plástico e tubos conectores	Componente que permite a formulação do radiofármaco no módulo
	Freezer ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$)	1,6 mg Precursor PSMA-1007	Molécula base que dá origem ao PSMA-1007- ¹⁸ F
Reagentes	Geladeira (2 e 5 $^{\circ}\text{C}$)	Coluna aniônica QMA	Retenção do flúor-18 vindo do ciclotron
		750 μL de solução de TBA-OH (0,075 M)	Eluente do flúor-18 da coluna QMA
	Temperatura ambiente ($\leq 30\text{ }^{\circ}\text{C}$)	8,0 mL de etanol	Condicionamento das colunas de purificação
		2 seringas de 30 mL	
		2 mL de DMSO	Diluição do precursor
		Bolsa de 100 mL de água para injetáveis	Lavagem do cassete e diluição do produto radiomarcado
		5,5 mL de etanol para água	Limpeza de impurezas químicas e radioquímicas
		8,5 mL de etanol 30%	Eluição do produto
		15 mL de tampão fosfato-salina	Solução de envase do produto
		400 mg de ascorbato de sódio	Estabilidade do produto final
		Filtro hidrofóbico Millex-25 0,2 μm	Filtragem do ar no frasco de envase
		Filtro Cathivex-GV 0,22 μm	Filtragem dos líquidos no frasco de envase
		Coluna orgânica C18	Purificação e retenção do produto radiomarcado
Coluna catiônica PS-H ⁺	Purificação do produto radiomarcado		

Fonte: Autor

O processo se inicia com o preparo dos reagentes. De acordo com as orientações providas pelo fornecedor, três preparações preliminares foram realizadas:

1^a: Diluição do precursor (1,6 mg) em 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO)

2^a: Diluição de 5,5 mL de etanol na bolsa de água

3ª: Diluição do ascorbato de sódio (400 mg) em 3 mL de solução tampão fosfato-salino (PBS); A seringa com a solução é colocada na posição indicada no cassete.

Após o preparo dos reagentes iniciou-se a montagem do cassete. O cassete é a peça que liga todos os componentes ao módulo de síntese. Nele os frascos, seringas, cartuchos de filtração e colunas são encaixados e então o cassete é posicionado no módulo. As válvulas presentes na parte de trás do cassete são encaixadas no equipamento e através do software, são abertas ou fechadas para a transferência de reagentes e soluções para os devidos frascos durante a síntese. A figura 14 representa o módulo após a montagem do kit para a marcação.

Figura 14 - Módulo de síntese TRACERLab MX com o cassete e o conjunto de reagentes do PSMA-1007-¹⁸F



Fonte: Autor

Após a montagem do módulo, iniciou-se uma série de testes para avaliar pontos críticos do funcionamento do módulo, como vácuo, fluxo de nitrogênio e conexões, antes de iniciar a síntese.

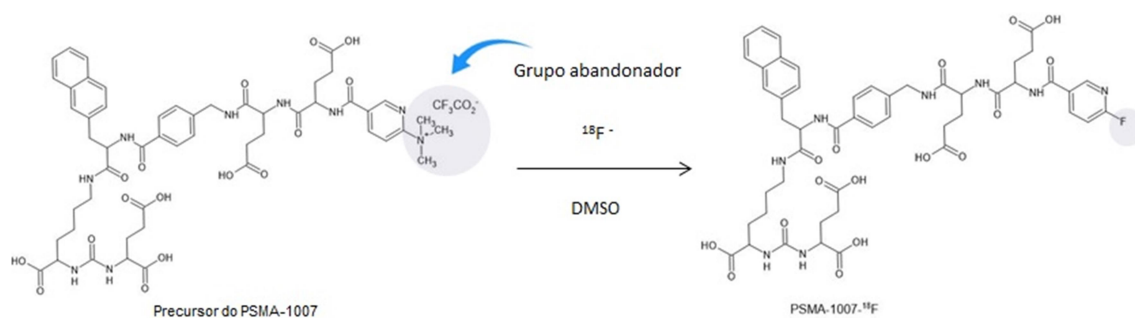
6.1.3 Radiossíntese do PSMA-1007-¹⁸F

A síntese do radiofármaco PSMA-1007- ^{18}F se dá basicamente através da reação de substituição nucleofílica $\text{S}_{\text{N}}2$ entre o íon fluoreto (nucleófilo) e o grupo abandonador presente na molécula do precursor. Para tanto, a síntese se iniciou com a chegada da água enriquecida irradiada no módulo, ficando dentro do funil acima do cartucho de QMA. Cerca de 2,7 mL de $\text{H}_2\text{O}(^{18}\text{O})$ passaram pela coluna QMA retendo o $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$, enquanto a água flui para o frasco de recuperação. O flúor-18 foi então eluído da coluna com 750 μL de TBA-OH 0,075 M, localizado no compartimento logo acima do funil (figura 14), sendo enviado para o frasco de reação, chamado de reator, usando vácuo. No reator, o TBA com $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ passou por um processo de secagem usando um fluxo de nitrogênio a 105 $^{\circ}\text{C}$.

Feito isso, foi adicionado ao reator 1,6 mg do precursor do PSMA-1007 diluído em 2 mL de DMSO. O DMSO é um solvente aprótico polar que permite que a reação $\text{S}_{\text{N}}2$ do flúor aconteça, prevenindo a solvatação e influenciando o ataque do nucleófilo e a saída do grupo abandonador presente no precursor. Além de aumentar sua velocidade de reação (SOLOMONS; FRYHLE, 2012).

A figura 15 ilustra a reação de marcação do precursor pelo flúor-18.

Figura 15 - Reação de substituição $\text{S}_{\text{N}}2$ do flúor-18, dando origem ao PSMA-1007- ^{18}F



Fonte: Autor

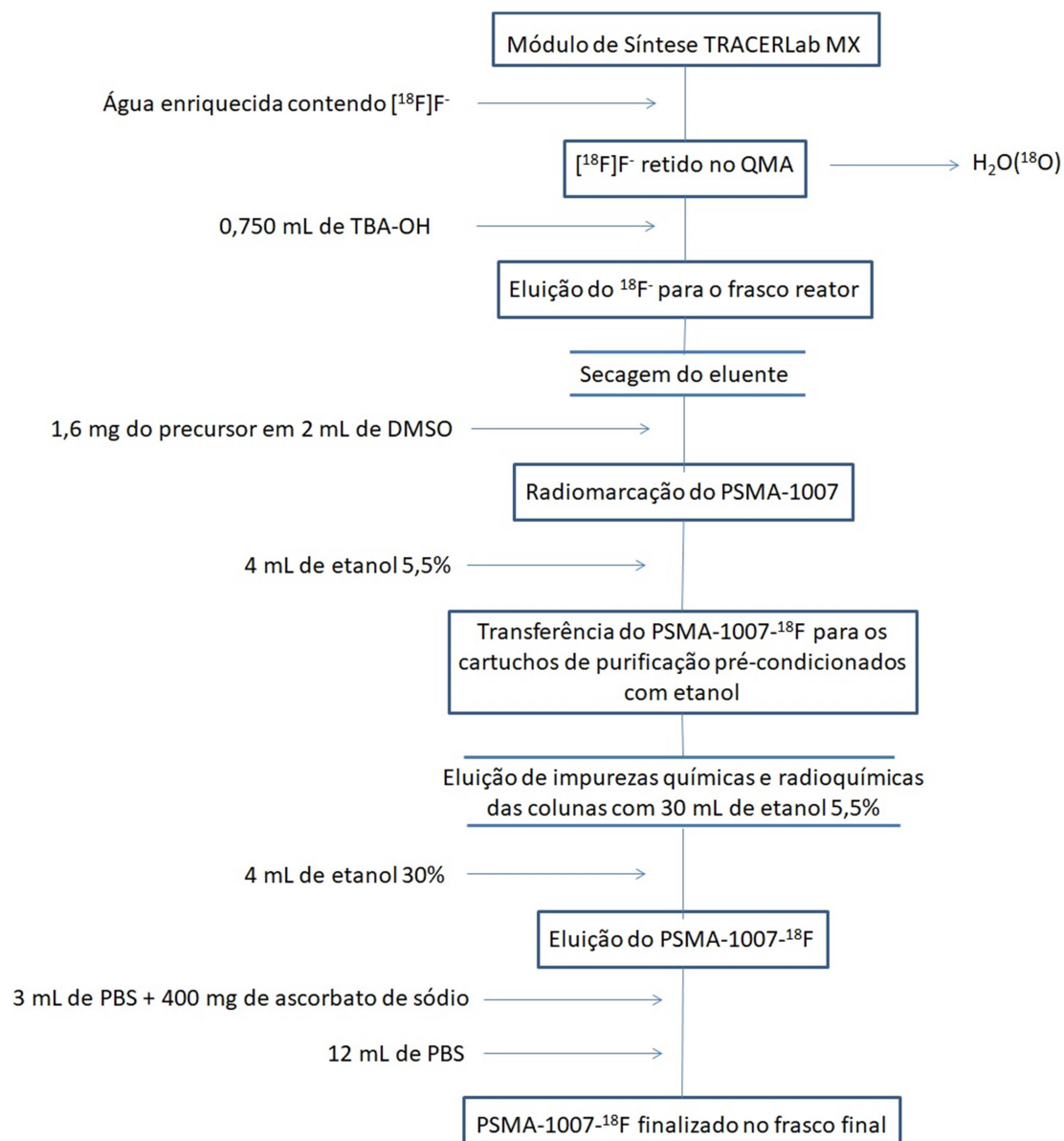
A reação de marcação ocorreu durante 10 minutos sob temperatura de 105 $^{\circ}\text{C}$. Completada a reação, o produto já marcado foi diluído com 4 mL de etanol 5,5% e transferido para os cartuchos de purificação pré-condicionados com etanol. O produto ficou retido na coluna C18 e iniciou-se o processo de purificação com 30 mL de etanol 5,5% para retirar impurezas químicas e

radioquímicas. Por fim, o PSMA-1007-¹⁸F foi eluído da coluna com 4 mL de etanol 30%, sendo levado para o frasco final que se localiza em outra cela blindada, facilitando a retirada do frasco. Antes de ser envasado, o produto foi esterilizado por uma membrana filtrante tipo de poro 0,22 µm tipo cathivex. Foram transferidos para o frasco final 3 mL de tampão fosfato-salino contendo o ascorbato de sódio, seguido dos 12 mL restantes do tampão, completando o volume final do produto de aproximadamente 19 mL. A presença do ascorbato de sódio confere estabilidade ao produto final, não interferindo em suas características químicas.

O tempo total de síntese foi de 43 minutos, incluindo todo o processo de purificação e de transferência. Um alerta apareceu na tela do computador, indicando o final da síntese e a liberação do produto no frasco final. Assim, a atividade do frasco final foi medida por meio de um calibrado de doses (Comerce, Itália) localizado no interior da cela de envase. Essa atividade final prática foi utilizada para o cálculo de rendimento de síntese, item importante a ser analisado para verificar a eficiência da produção.

Na figura 16 está esquematizado todo o processo de produção do PSMA-1007-¹⁸F descrito em um fluxograma.

Figura 16 - Fluxograma do processo de síntese automatizada do PSMA-1007-¹⁸F



Fonte: Autor

6.1.4 Determinação do rendimento de síntese do PSMA-1007-¹⁸F

De acordo com a literatura, o rendimento de síntese esperado para o PSMA-1007-¹⁸F por meio do módulo TRACERLab MX é em torno de 43,3 - 52,8 % (CARDINALE *et al.*, 2017a).

O cálculo realizado para a determinação do rendimento tem como base o tempo de síntese, a atividade de entrada no módulo e a atividade final do

frasco de envase, medida imediatamente ao final da síntese. A porcentagem de rendimento foi calculada de acordo com as fórmulas (1) e (2) abaixo:

$$A_{ft} = A_o \times e^{(\ln 2 \times \frac{t}{T_{1/2}})} \quad (1)$$

$$\text{Rendimento (\%)} = \left(\frac{A_{fp}}{A_{ft}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Onde:

A_{ft}= Atividade final teórica

A_{fp}= Atividade final prática, ou seja, a atividade medida no frasco final

A_o= Atividade de entrada do módulo

t= tempo de síntese (43 minutos)

T_{1/2}= tempo de meia vida do flúor-18 (109,7 minutos)

As atividades na coluna de QMA e no frasco reator são apresentadas pelo software em tempo real, medidas pelo próprio módulo. Sendo assim, a atividade dada na coluna QMA foi considerada a atividade de entrada para o cálculo de rendimento.

6.2 Controle de Qualidade do Radiofármaco PSMA-1007-¹⁸F

As metodologias analíticas para o controle de qualidade do radiofármaco PSMA-1007-¹⁸F foram baseadas na literatura e comparadas com os métodos encontrados na monografia oficial do radiofármaco da Farmacopeia Europeia 10^{ed}. Os ensaios aqui descritos foram avaliados com o objetivo de estabelecer os melhores métodos para avaliação da qualidade do produto, considerando uma rotina de produção do radiofármaco no IPEN/CNEN-SP.

6.2.1 Identidade Radionuclídica

É possível identificar o radionuclídeo em uma amostra calculando seu tempo de meia vida físico, por meio de contagens de sua atividade em intervalos de tempo. Através do cálculo de regressão linear, é possível prever se os valores encontrados se comportam com velocidade cinética de primeira

ordem, confirmado pelo coeficiente de determinação (r^2). O coeficiente angular da reta encontrada é denominado como constante de decaimento, usada para estabelecer o tempo de meia-vida físico do radioisótopo (ATKINS; JONES; LAVERMAN, 2018).

O cálculo para a determinação do $T_{1/2}$ do radionuclídeo é realizado através da fórmula (3) abaixo, onde k é a constante de decaimento.

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

Desta forma, para identificar o F-18 no produto, uma amostra de PSMA-1007- ^{18}F foi analisada no calibrador de doses CRMTM-35R (Capintec, EUA) a cada 10 minutos em um período de 30 minutos. A atividade foi plotada em um gráfico usando o software GraphPad Prism 8.0.2® (GraphPad Software, Inc., EUA) para a determinação da equação da reta, seus coeficientes e o r^2 .

O tempo de meia-vida deve estar entre 105 minutos e 115 minutos. Este critério de aceitação é igual para todos os radiofármacos marcados com flúor-18, visto que se trata do radionuclídeo, não do produto (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021c; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019; USP, 2018).

6.2.2 Pureza radionuclídica (PRn)

A pureza radionuclídica do PSMA-1007- ^{18}F foi realizada através das energias emitidas pela amostra do produto, identificadas por um detector de germânio ultra-puro (Canberra, EUA). O ensaio foi realizado a partir de uma amostra de 370 kBq (10 μCi) do produto, sendo que o frasco contendo a amostra foi posicionado na prateleira mais distante do detector. A aquisição das diferentes emissões gama emitidas pela amostra foi feita no tempo de 10 minutos e os resultados obtidos foram interpretados como áreas sob a curva (AUC). Por meio das contagens das diferentes energias, foi possível determinar a porcentagem de pureza do flúor-18 através da equação (4):

$$\%PRn = \frac{\sum \text{atividade do flúor-18}}{\sum \text{atividade do flúor-18} + \sum \text{atividade de contaminantes}} \quad (4)$$

A atividade de contaminantes descrita na equação (4) são energias que estão acima de 100 keV, diferente daquelas esperadas para o flúor-18. Abaixo dessa energia não foram consideradas por serem consideradas raios-X.

O critério de aceitação para este ensaio consiste de, no mínimo, 99,9% do total da radioatividade presente, correspondente ao flúor-18 com fótons de energia de 511 keV ou 1022 keV (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021c).

6.2.3 Identidade do produto PSMA-1007-¹⁸F

Dois métodos estão disponíveis para a identificação do PSMA-1007-¹⁸F por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Ambos estão descritos a seguir:

Pela literatura, a identidade do produto foi feita a partir do padrão não radioativo PSMA-1007-F (ABX, Alemanha). A análise se fez a partir da comparação entre o pico radioativo da amostra de PSMA-1007-¹⁸F e o pico do PSMA-1007-F no UV-VIS, nos comprimentos de onda de 220 nm e 280 nm, sendo que o pico de interesse não deve variar $\pm 0,5$ minutos de diferença do pico referência (SHAMNI *et al.*, 2019).

Pela monografia do PSMA-1007-¹⁸F, a identificação do produto se dá pela comparação entre o tempo de retenção do pico principal do radiocromatograma obtido com a amostra teste (PSMA-1007-¹⁸F) e o tempo de retenção do pico principal do cromatograma (UV, 225 nm) obtido com o padrão frio, sendo que ambos devem ser similares (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021c).

Assim, tanto o método da literatura quanto o farmacopeico foram realizados, empregando os dois sistemas de identificação descritos no ensaio de pureza radioquímica. Para tanto, foi preparado o padrão de referência com 1 mg do padrão PSMA-1007-F em 0,5 mL de DMSO (0,5 mg/mL). A solução foi analisada por CLAE nas mesmas condições descritas no item 6.2.4.3, obtendo-se um pico com um tempo de retenção característico.

6.2.4 Pureza radioquímica (PR)

A Pureza Radioquímica (PR) é definida como a fração da radioatividade total na forma química desejada no radiofármaco, neste caso, a forma PSMA-1007-¹⁸F. As impurezas radioquímicas surgem da decomposição do produto devido à ação do solvente, mudança na temperatura ou pH, luz, presença de agentes oxidantes ou redutores, reação incompleta e radiólise. A decomposição por radiólise depende da atividade específica do material radioativo, do tipo e da energia da radiação emitida e da meia-vida do radionuclídeo. A absorção de radiações por moléculas de H₂O resulta na formação de radicais livres com elétrons desemparelhados, o que, por sua vez, produz H₂O₂ ou H₂O₂[·], as quais são agentes oxidantes fortes, podendo degradar as moléculas orgânicas marcadas. Por isso, é de extrema importância que este ensaio seja realizado para qualquer radiofármaco (SAHA, 2010).

As possíveis impurezas que podem ser encontradas, segundo a monografia do radiofármaco, são o [¹⁸F]F⁻, determinado a partir do ensaio de cromatografia de camada delgada (CCD) e outras impurezas radioquímicas, determinadas pela CLAE. Neste trabalho, foi comparada a eficiência de separação entre a Cromatografia de Camada Delgada de sílica gel (CCD-SG) e a Cromatografia em Camada Delgada de sílica gel instantânea (iCCD-SG) para a quantificação do fluoreto livre no produto (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021c).

Para o cálculo da porcentagem de pureza radioquímica (%PR) do PSMA-1007-¹⁸F, foi utilizada a seguinte fórmula (5) abaixo:

$$\% PR = (100 - B) \times T \quad (5)$$

Onde:

B= Porcentagem da radioatividade da impureza radioativa (fluoreto [¹⁸F]F⁻), determinada pela CCD-SG

T= Proporção da radioatividade do pico referente ao PSMA-1007-¹⁸F em relação ao total da radioatividade eluída no cromatograma de CLAE. Desconsidere qualquer pico com retenção relativa em relação ao pico de PSMA-1007-¹⁸F de 0,8 ou menos.

De acordo com a monografia oficial do produto, o critério de aceitação para este ensaio é de %PR \geq 91% (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021c).

Em contrapartida, o critério de aceitação na literatura é de \geq 95%. Por ser uma monografia muito recente, a literatura do PSMA-1007-¹⁸F tinha como base as monografias disponíveis de radiofármacos marcados com flúor-18, como o Fluorotimidina-¹⁸F (FLT-¹⁸F) (CARDINALE *et al.*, 2017^a; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021a).

Por esse motivo, este trabalho teve como critério o limite de \geq 95%, contemplando ambos os limites.

6.2.3.1 Determinação do perfil cromatográfico do flúoreto-¹⁸F livre por cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCD-SG)

O estudo se iniciou com a análise do perfil cromatográfico da impureza radioquímica mais provável na amostra de PSMA-1007-¹⁸F, o flúor-18 livre. Para isso, foram realizadas produções de NaF-¹⁸F, utilizando amostras de concentração 37 MBq/mL (1mCi/mL) com 2 μ L de aplicação nas fitas de CCD-SG nos tamanhos de 12,5 cm X 1,5 cm. O sistema cromatográfico aplicado para o NaF-¹⁸F foi o mesmo que foi aplicado para o PSMA-1007-¹⁸F encontrado na literatura (descrito no item 6.2.3.2), a fim de identificar o fator de retenção da impureza (CARDINALE *et al.*, 2017^a; FESAS *et al.*, 2019).

A partir dos resultados encontrados neste tópico, foi realizado o estudo sobre a pureza radioquímica do radiofármaco PSMA-1007-¹⁸F, tendo como base o perfil cromatográfico da impureza detectável por CCD-SG e iCCD-SG.

6.2.3.2 Análise de pureza radioquímica do PSMA-1007-¹⁸F por cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCD-SG) e cromatografia instantânea em camada delgada (iCCD-SG)

A pureza radioquímica do PSMA-1007-¹⁸F foi avaliada por CCD-SG e por iCCD-SG. A razão da comparação entre os dois suportes do sistema cromatográfico foi a de avaliação de eficiência de separação e o tempo de corrida, visto que o tempo gasto para cada análise na rotina de controle de qualidade é importante para a liberação do produto.

Assim, foram usadas fitas de sílica gel com base de alumínio nas dimensões 12 cm X 1,5 cm com 10 cm de corrida como fase estacionária para CCD-SG (Merck, Alemanha), e fitas de fibra de vidro impregnada com sílica gel nas mesmas dimensões para iCCD-SG (Merck, Alemanha). As fitas foram ativadas por meio de aquecimento em estufa a 60 °C seguindo o protocolo do laboratório, e aplicou-se 2 µL do produto PSMA-1007-¹⁸F, com concentração 37 MBq/mL (1 mCi/mL), no início da fita. Após a secagem da amostra aplicada, a fita foi posta dentro de uma cuba previamente saturada pela mistura dos solventes acetonitrila (Merck, Alemanha) e água purificada, na proporção 60:40 V/V como fase móvel (CARDINALE *et al.*, 2017^a; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021c).

Após a corrida, as fitas foram secas em estufa e cortadas em 10 segmentos de 1 cm, colocadas em tubos para a contagem da radioatividade em um contador gama do tipo poço (Cobra II, Packard – Perkin Elmer, EUA). O cálculo para a porcentagem de flúor livre presente nas fitas foi realizado de acordo com a fórmula (6) abaixo.

$$\frac{CPM \text{ do } 1^{\circ} \text{ segmento}}{\sum CPM \text{ da fita}} \times 100 \quad (6)$$

Onde:

CPM= contagens por minuto

Visto que a impureza não corre pela fita, foi considerada somente a contagem no primeiro segmento. Em ambos os sistemas foram realizadas corridas em triplicata para cada lote do radiofármaco produzido.

6.2.3.3 Análise de pureza radioquímica do PSMA-1007-¹⁸F por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Foi utilizado o cromatógrafo modelo Prominence, com injetor automático SIL-AC20 HT, bomba LC-20AT, desgaseificador DGU-20 SR, detector UV/Vis SPD-20A e módulo comunicador CBM-20A (Shimadzu, Japão) para a quantificação da pureza radioquímica do produto PSMA-1007-¹⁸F. Para a detecção da radioatividade, foi usado o detector de radiação gama – Flow-RAM Radio HPLC Detector (Lablogic, Inglaterra), acoplado a unidade de detector

UV/VIS. A coluna usada para estes ensaios foi a de fase reversa C18 4,6 mm x 250 mm, 5 μ m da Symmetry (Waters, EUA) (CARDINALE *et al.*, 2017a).

Utilizou-se gradiente descrito na literatura, empregando como fase móvel a mistura de acetonitrila (Merck, Alemanha) como solvente A e 0,1% de ácido trifluoroacético (Merck, Alemanha) como solvente B. Iniciou-se o ensaio com o condicionamento da coluna com 20 % do solvente A por 30 minutos com fluxo de 1 mL/min, com a injeção de 50 μ L da amostra do produto PSMA-1007-¹⁸F, com concentração 37 MBq/mL (1 mCi/mL) na coluna a 26 °C. A análise contou com o seguinte gradiente (CARDINALE *et al.*, 2017a):

- 20% do solvente A entre 0-0,3 min;
- 30% de A entre 0,3-2 min
- Manter a condição por 15 min;
- Aumento do solvente A para 95% nos 6 minutos seguintes;
- Manter a condição por 2 min;
- Diminuição do solvente A para 20% de A em 1 min;
- Término da corrida em 20% de A por 9 minutos para limpeza da coluna.

Tempo total de corrida: 35 minutos.

De acordo com a monografia oficial do PSMA-1007-¹⁸F publicada em julho de 2021, esse ensaio conta com as seguintes condições (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021c):

- Coluna de fase reversa C18 (2,7 μ m)
- Tamanho: L= 0,15 m, \varnothing = 4,6 mm
- Fluxo: 1,3 mL/min
- Volume de injeção: 20 μ L
- Temperatura da coluna: 30 °C
- Fase móvel:
 - Solvente A: Em 1 L de 3,12 g/L de solução de fosfato monossódico, adicionar 10,0 mL de uma solução 90 g/L de ácido fosfórico, ajustando o pH para $2,5 \pm 0,1$ com ácido fosfórico.
 - Solvente B: Acetonitrila para cromatografia

- Gradiente: início com 77% do solvente A por 2 minutos, seguido da diminuição da porcentagem do solvente A para 70% dentro de 12 minutos. Dos 14 minutos até aos 17 minutos de corrida conta com a diminuição do solvente A de 70% para 40%, finalizando a corrida sob o mesmo fluxo e porcentagem de solvente A por mais 4 minutos, completando a corrida com tempo total de 21 minutos.

Para fins de comparação, foi feita uma corrida nas mesmas condições acima descritas, mudando somente o diâmetro da partícula da coluna, a fim de avaliar a capacidade de separação do método. Não foi feita a identificação das impurezas, mas todas foram consideradas para o cálculo da %PR.

6.2.5 Pureza química (PQ)

Os ensaios para a determinação da pureza química do produto PSMA-1007-¹⁸F estão descritos nos próximos itens, consistindo na quantificação dos solventes no produto final e o estudo sobre a metodologia na determinação semi-quantitativa do tetrabutylamônio.

6.2.5.1 Solventes residuais

Os solventes usados na síntese que não foram removidos pelo processo de purificação e permanecem no produto final são denominados solventes residuais ou produtos químicos orgânicos voláteis. Esses solventes podem impactar no rendimento e nos níveis de pureza do produto radiofarmacêutico, e seus níveis devem ser controlados para garantir que o material atenda aos critérios de aceitação da especificação e limites toxicológicos (REID, 2020).

Sendo assim, os potenciais solventes residuais do produto PSMA-1007-¹⁸F são etanol (EtOH) e dimetilsulfóxido (DMSO), empregados no processo de síntese e purificação. Para a quantificação desses solventes foi utilizado o cromatógrafo a gás (GC-17A – Shimadzu, Japão), do laboratório de controle de qualidade do Centro de Radiofarmácia. Os parâmetros usados estão descritos a seguir.

- Sistema SPLIT

- Coluna 0,25 mm x 30 m, 0,5 μ de F.E.
- Gás de arraste: hélio
- Fluxo: 20 mL/min
- Volume injetado: 1 μ L
- Rampa de temperatura: inicial de 75 °C, mantendo por 2 minutos; aumento da temperatura até 250 °C durante 3 minutos, mantendo até o final da corrida.
- Duração da corrida: 7,13 minutos

A corrida ocorreu em triplicata, com os picos do etanol e DMSO já pré-definidos pelos métodos na biblioteca do software como 2,34 minutos e 6,59 minutos respectivamente. A amostra foi diluída 20 vezes com água purificada, em um volume final de 1 mL. Os resultados são dados em partes por milhão (ppm), sendo o critério de aceitação descrito tanto na literatura quanto na Farmacopeia Europeia de 10% V/V (100.000 ppm) e o máximo de 2,5 g/dose (densidade: 0,790 g/mL) para o etanol. Para o DMSO, considerado como solvente de baixa toxicidade de classe 3 pela Farmacopéia Europeia, o máximo permitido é de 5.000 ppm ou 0,5% (CARDINALE *et al.*, 2017^a; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021d).

6.2.5.2 Determinação do Tetrabutylamônio – TBA

O TBA é usado nas preparações radiofarmacêuticas atuando como catalisador de fase. Ambos permitem a fluorinação nucleofílica do produto livre de carregador ou n.c.a (do inglês *no-carrier-added*), o que é essencial para uma boa marcação. A identificação e quantificação desses elementos no produto final devem ser realizadas antes de ser liberado para o uso (FUKUMORI; BARBOZA, 2011).

O kryptofix é um aminopoliéter que, assim como o TBA, deve ser retirado antes do envase do produto final. Para isso, no processo de síntese ocorre a filtração do produto marcado pelo cartucho de resina catiônica PS-H⁺, que retira essas possíveis impurezas. Para garantir a qualidade do produto, a Farmacopeia Europeia indica para os radiofármacos marcados com flúor-18

FLT-¹⁸F e PSMA-1007-¹⁸F que a determinação do TBA seja feita por CLAE e por CCD, respectivamente, enquanto que para o aminopoliéter é indicado SPOT TEST (KUNTZSCH *et al.*, 2014; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021e).

Para a determinação do TBA no produto PSMA-1007-¹⁸F, foi verificada a literatura disponível e monografias da Farmacopeia Europeia. Visando a otimização da metodologia, unificando fatores divergentes como concentração do padrão e solvente aplicado, foi realizado um estudo comparando pontos essenciais para melhor identificação do TBA no PSMA-1007-¹⁸F.

6.2.5.2.1 Determinação dos fatores de estudo

Apesar dos elementos kryptofix e TBA não serem da mesma família de éter coroa, ou seja, compostos cíclicos formados por um anel com vários grupos éter, ambos são usados como reagentes de fase e considerados impurezas no produto final. Segundo a monografia do FLT-¹⁸F e do PSMA-1007-¹⁸F, o aminopoliéter pode ser detectado através de um SPOT TEST, utilizando uma solução padrão como referência e comparando a coloração das duas amostras. Por existirem estudos comparando-os em relação à eficiência de marcação e usando a mesma metodologia para identificá-los, foi usado como um dos fatores de estudo os dados disponíveis para a concentração do kryptofix para a identificação do TBA (JIANG *et al.*, 2020).

Por ser um método de baixo custo, rápido e prático, o CCD-SG foi o método escolhido para a determinação do TBA como contaminante para o produto PSMA-1007-¹⁸F, o mesmo indicado no capítulo geral da Farmacopeia Europeia para determinação de TBA em formulações radiofarmacêuticas (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021e). Além de conseguir fornecer um resultado semi-quantitativo, este método também consegue separar o elemento de interesse do produto final, fornecendo uma informação mais assertiva. Neste sistema cromatográfico, o fator de retenção (Rf) do TBA foi de 0,1. Após a corrida, as placas foram secas e a mancha correspondente ao TBA foi revelada com vapor de iodo e o critério de aceitação para este ensaio foi o grau de coloração da mancha do padrão de TBA, sendo que a intensidade da

coloração da mancha correspondente ao produto PSMA-1007-¹⁸F não deverá ser mais intensa que a do padrão.

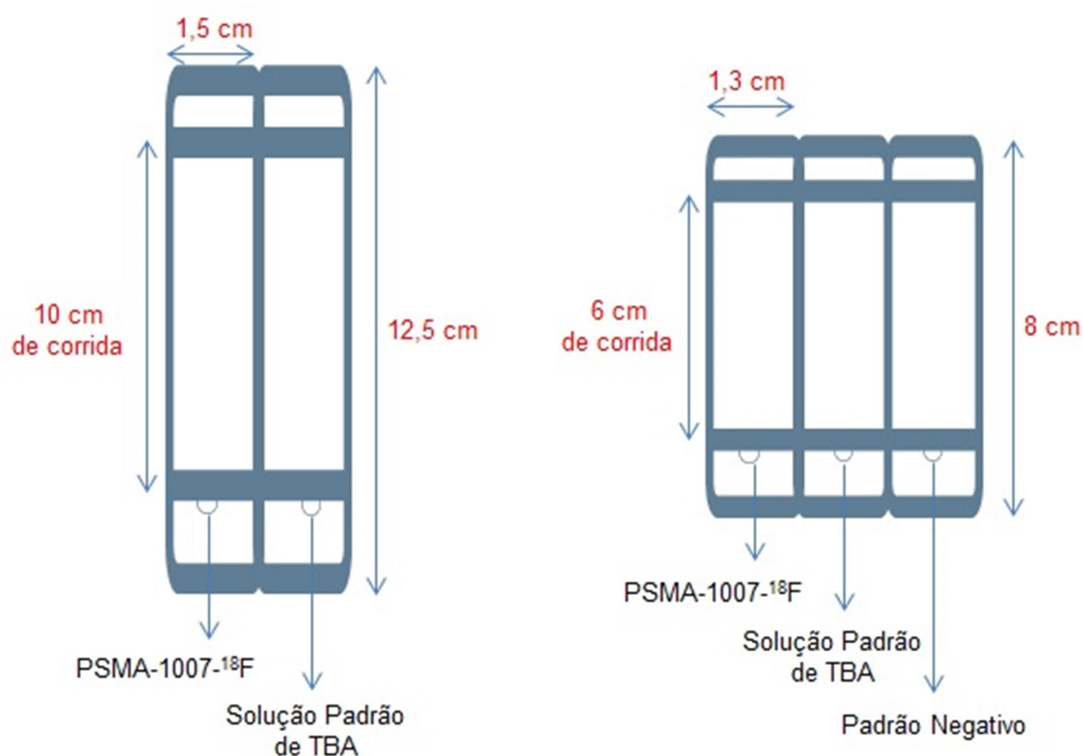
Alguns fatores que poderiam influenciar na determinação do TBA pelo método CCD-SG foram avaliados, conforme descrito a seguir. Este ensaio foi realizado com o produto já decaído.

6.2.5.2.1.1 Tamanho da fita

Foram avaliados dois tamanhos de fitas de sílica gel com base de alumínio: 12,5 cm x 3,0 cm (comprimento usado no controle da pureza radioquímica), com duas fitas de 1,5 cm juntas, representando amostra de PSMA-1007-¹⁸F e a solução padrão de TBA; 8,0 cm x 4,0 cm (tamanho encontrado na literatura), com 3 fitas de aproximadamente 1,3 cm de largura juntas, representando uma amostra do produto PSMA-1007-¹⁸F, a solução padrão de TBA e um padrão negativo (CARDINALE *et al.*, 2017a).

Os dois modelos de fitas cromatográficas estão ilustradas na figura 17.

Figura 17 - Ilustração das fitas de CCD-SG usadas para a determinação do TBA no PSMA-1007-¹⁸F



Fonte: Autor

6.2.5.2.1.2 Concentração da solução padrão de TBA

Foram estudadas três concentrações diferentes de solução padrão de referência. A primeira é uma concentração baseada da Farmacopeia Europeia para a determinação de aminopoliéter, para a qual 11 mg de TBAOH·30H₂O são dissolvidos em 25 mL de água, originando a solução 1. Posteriormente, 1 mL da solução 1 é diluída em V, sendo V o volume máximo da dose (o volume de 10 mL foi considerado para o PSMA-1007-¹⁸F). A solução referência final é de 2,2 mg/V (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021a; 2021c).

Considerando que o TBA usado para o ensaio é 30 vezes hidratado, o resultado da concentração calculada foi multiplicado pelo fator de correção de 0,302, anulando o peso extra vindo da água e considerando somente o TBA, tornando a concentração final de 0,013 mg/mL de TBA.

A segunda solução padrão também foi baseada da Farmacopeia Europeia para a determinação do TBA por CLAE. De acordo com a monografia do FLT-¹⁸F consultada, 170 mg de TBAOH·30H₂O foram diluídas em 20 mL de água formando a solução 1. Posteriormente, 1 mL da solução 1 foi diluído em V, sendo V o volume máximo em dose (o volume de 10 mL foi considerado para do PSMA-1007-¹⁸F), resultando da solução referência com concentração de 2,6 mg/V. Aplicando o fator de correção, a concentração final da solução foi de 0,26 mg/mL de TBA ou 2,6 mg/V de TBA (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021a; 2021c).

O capítulo geral sobre TBA em formulações radiofarmacêuticas usada como referência para o produto PSMA-1007-¹⁸F usa a mesma concentração de 2,6 mg/V, onde V é o volume em dose, mas em um volume muito alto de solução. O preparo da solução do padrão de TBA se dá através da diluição de 0,86 g de TBAOH·30H₂O em 100 mL de solução etanol:água 1:9 V/V, seguido da diluição de 1 mL dessa mistura em V. Considerando que a quantidade de TBA usada para este ensaio é mínima, foi escolhida a preparação prescrita no parágrafo anterior, onde obteve a mesma concentração usando uma quantidade menor de recursos (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021e).

A terceira e última solução foi retirada da literatura do produto, onde 330 mg de TBAOH·30H₂O são diluídos em 10 mL de uma mistura 9:1 de água e etanol, formando a solução 1. Posteriormente, 100 µL dessa solução foram diluídos em 10 mL da mesma mistura de solventes, resultando em uma concentração de 0,1 mg/mL de TBA já corrigida (CARDINALE *et al.*, 2017a).

6.2.5.2.1.3 Solvente

De acordo com as referências para o tópico 6.2.5.2.1.2, os solventes usados para a preparação das soluções padrão de TBA são água:etanol e água somente. Assim, ambos foram considerados para o estudo e cada concentração foi preparada com os dois solventes.

Já em relação ao solvente para as corridas, uma solução de metanol e amônia 25% em proporção 9:1 foi usada como fase móvel para este ensaio (CARDINALE *et al.*, 2017^a; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021e).

6.2.5.2.1.4 Volume de amostra

De acordo com a literatura, os volumes de 1 µL, 2 µL e 5 µL são comumente usados para a determinação do TBA, seja para fitas de CCD ou para SPOT TEST. Assim, foram testados os volumes de 1 µL, 2 µL e 5 µL para determinar o volume mais indicado para a identificação do TBA (DI IORIO *et al.*, 2021; CARDINALE *et al.*, 2017a).

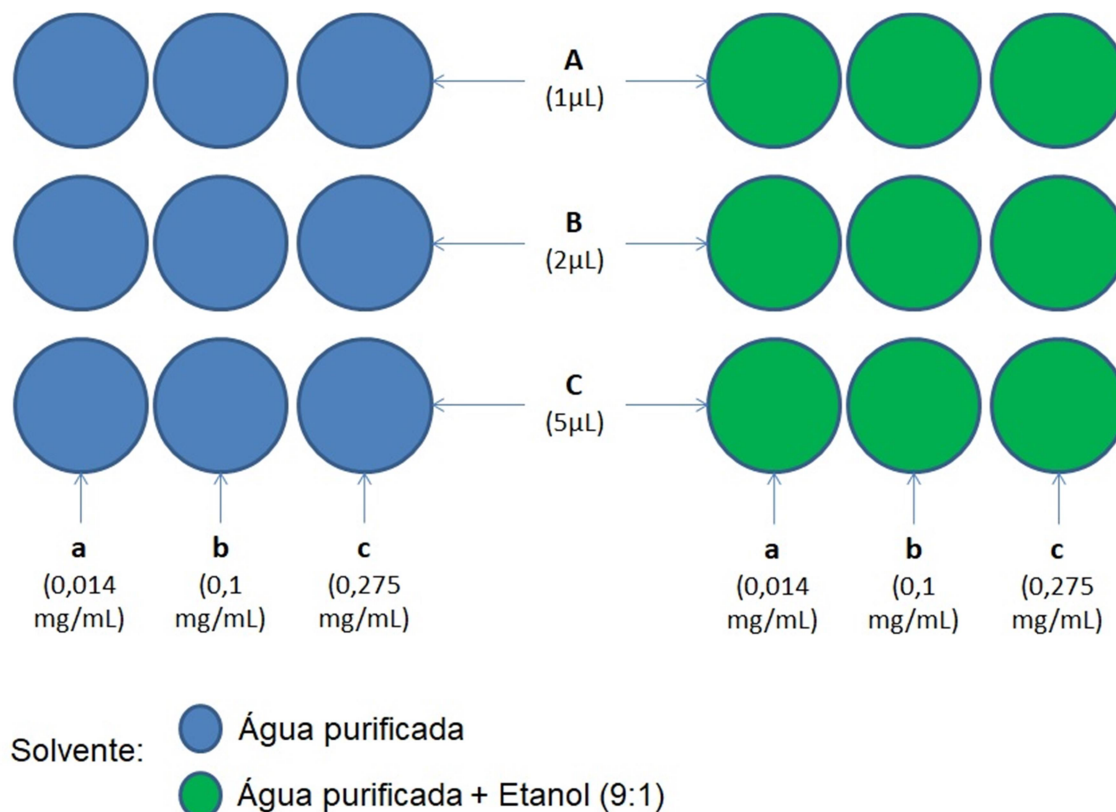
6.2.5.2.1.5 Ascorbato de sódio

Visto que produtos orgânicos coram na presença de iodo e que a concentração do produto radiomarcado é muito pequena nos volumes usados, foi feita uma análise usando uma solução de ascorbato de sódio, agente estabilizante presente no produto final, em conjunto com as demais amostras. Usando as mesmas condições usadas no momento da síntese, uma solução de 20 mL com 400 mg de ascorbato de sódio foi preparada e analisada em conjunto com o PSMA-1007-¹⁸F a fim de comparar os fatores de retenção encontrados. Outra corrida foi feita misturando-se 1 mL de cada solução padrão de TBA a 1 mL da solução de ascorbato de sódio, para verificar o poder de separação do método escolhido. Essa análise foi realizada com ambos os solventes para a preparação do padrão de TBA descritos no tópico 6.2.5.2.1.3.

6.2.5.2.2 Realização do ensaio

O ensaio foi realizado usando um total de 18 cubas (9 para o padrão diluído em água purificada e 9 para o padrão diluído em água purificada + etanol), dividindo as fitas e suas cubas em grupos de a-c e A-C, de acordo com a figura 18 abaixo.

Figura 18 - Representação das cubas de CCD-SG no estudo dos fatores no ensaio de determinação de TBA. As letras maiúsculas representam o volume aplicado, enquanto que as letras minúsculas representam a concentração da solução padrão de TBA usada.



Fonte: Autor

Foram feitas corridas variando o volume de aplicação, a concentração da solução padrão de TBA, o solvente usado para a diluição do mesmo e o tamanho da fita. Assim, o ensaio se iniciou com a aplicação dos volumes em suas respectivas fitas, começando com as fitas de tamanho 8,0 cm x 4,0 cm. As fitas foram colocadas em cubas de vidros previamente saturadas com a fase móvel, tomando cuidado para não encostar nas laterais da cuba. Após as corridas, as fitas foram retiradas da cuba e secas em uma estufa com temperatura de 60°C. Durante a secagem das fitas, outra cuba com cristais de iodo foi aquecida entre 50 - 80°C até que vapores de iodo na cor roxa aparecessem. Com a cuba preenchida pelos vapores e as fitas totalmente secas, uma a uma foram introduzidas na cuba de iodo para revelação das manchas de TBA. Após 1 minuto, as fitas foram retiradas e as manchas reconhecidas e registradas.

Este mesmo processo foi feito com as fitas de 12,5 cm x 3,0 cm e com as amostras de ascorbato de sódio.

6.2.6 Aparência

A descrição do produto foi realizada a partir da observação visual, com o critério de solução límpida, incolor e sem a presença de partículas (CARDINALE *et al.*, 2017a).

6.2.7 pH

O pH é um elemento importante a ser controlado em preparações líquidas, pois impacta diretamente na solubilidade de fármacos e, conseqüentemente, na estabilidade e posterior absorção. Sua determinação pode ser feita por pHmetro ou por fitas de testes de pH.

A determinação do pH do produto PSMA-1007-¹⁸F foi realizada utilizando-se fitas de teste de pH, sendo o intervalo aceito pela Farmacopeia Europeia de 4,5 a 8,5 (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021c).

6.2.8 Microbiológico

Foram realizados ensaios de esterilidade e endotoxinas bacterianas pelo método LAL (Lisado de Amébócitos de *Limulus*) no laboratório de controle de qualidade microbiológico do Centro de Radiofarmácia do IPEN. Os ensaios foram executados por profissionais treinados e de acordo com as técnicas descritas na FARMACOPEIA BRASILEIRA (2019), adaptadas para o controle biológico de radiofármacos.

Para tanto, os ensaios foram realizados com o material PSMA-1007-¹⁸F decaído, com uma amostra de aproximadamente 100 µL do produto previamente fracionado em uma cela de processamento asséptico. A amostra foi diluída com 9,9 mL de solução estéril de cloreto de sódio 0,9% no laboratório de ensaios microbiológicos.

Para o teste de esterilidade, 1 mL da amostra foi semeado em tubos contendo os meios de cultura tioglicolato (T) e soja tripticase (TSB), que foram incubados e mantidos nas temperaturas de 32,5 ± 2,5 °C e 22,5 ± 2,5 °C,

respectivamente, por 14 dias. Esse procedimento ocorreu em triplicata, sendo a formação de turvação do meio de cultura interpretada como a presença de crescimento microbiano e o produto reprovado no ensaio de esterilidade.

Já para o teste de endotoxinas bacterianas foi utilizado o método LAL (lisado de amebócito de limulus), método semi-quantitativo baseado na formação de gel. Uma amostra de 100 µL do radiofármaco foi adicionada em um tubo contendo 100 µL de LAL previamente solubilizado, que ficou incubado por 60 ± 2 minutos a 37 ± 1 °C. A interpretação do resultado se dá pela observação de formação ou não de gel que se adere à parede do tubo ao inverter o mesmo de cima para baixo. O critério de aceitação do ensaio deve ser menor que 17,5 unidades de endotoxinas por mL (UE/mL) (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021c).

6.3 Ensaio Experimentais

Os ensaios apresentados a seguir têm como objetivo complementar o estudo sobre o radiofármaco PSMA-1007-¹⁸F, contemplando ensaios de estudo de estabilidade e lipofilicidade. Dados necessários para fundamentar futuro registro do mesmo junto a ANVISA.

6.3.1 Estudo de estabilidade do PSMA-1007-¹⁸F

O estudo de estabilidade do radiofármaco é de extrema importância, tendo em vista que a estabilidade de um composto depende do tempo de exposição à luz, de mudanças de temperatura e da radiólise que pode ocorrer. Quanto mais tempo um composto fica exposto a essas condições, mais ele tenderá a se decompor. Por esta razão, substâncias como ascorbato de sódio, ácido ascórbico e sulfito de sódio são frequentemente adicionadas ao produto final a fim de manter a estabilidade dos radiofármacos (SAHA, 2010).

Neste trabalho foi analisado o efeito desses fatores, em especial o efeito da radiólise, tendo em vista a alta atividade específica do PSMA-1007-¹⁸F (28,521 GBq/µg ou 770,837 mCi/µg). Apesar desse efeito ser mais pronunciado em radiofármacos de terapia, radionuclídeos para diagnósticos com alta atividade podem provocar a quebra da ligação entre ele e a molécula,

promovendo doses desnecessárias em tecidos normais e prejudicando o diagnóstico (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

O ensaio foi realizado simulando o processo de produção do radiofármaco, com base no histórico de produção da instituição para o FDG-¹⁸F. Segundo a literatura consultada, a média da atividade de PSMA-1007-¹⁸F para doses em humanos é de $303,4 \pm 66,6$ MBq ($8,2 \pm 1,8$ mCi), com volume máximo de dose injetada de 10 mL. Para o presente ensaio, foi considerada a atividade de 370 MBq/dose (10 mCi) no volume máximo de 10 mL (1mCi/mL) (CARDINALE *et al.*, 2017a; GIESEL *et al.*, 2018a, 2018b; SPRUTE *et al.*, 2021).

Considerando a produção de uma dose para centros médicos fora do estado de São Paulo, como Bahia ou Porto Alegre, foi feita a correção para seis horas de decaimento do flúor, totalizando uma dose no momento da fabricação de 10,77 GBq (291 mCi).

Assim, foi feita a produção do PSMA-1007-¹⁸F com concentração de 1,077 GBq/mL (29,1 mCi / mL) para estudar sua estabilidade frente às seis horas de transporte, considerando a atividade máxima que a blindagem de chumbo pode transportar. Neste ensaio, a %PR da solução mãe foi analisada por CLAE e CCD-SG, com amostras de 1 mCi/mL sendo retiradas a cada uma hora durante o período de seis horas após a síntese.

6.3.2 Determinação do coeficiente de partição (Log P) experimental

Para determinar as propriedades lipofílicas do radiofármaco, foram preparados três tubos, cada um contendo 3 mL de n-octanol (fase orgânica) e 3 mL de solução tampão fosfato salino pH 7,4. Misturaram-se as fases por processo de agitação e aguardou-se por 24 horas até a completa ambientação e separação das fases. Em seguida, adicionou-se, em cada tubo, 100 µL do radiofármaco, contendo aproximadamente 12,58 kBq (0,34 µCi). Prontamente, agitaram-se os tubos durante 1 hora em temperatura ambiente. Após a separação das fases, recolheu-se uma alíquota de 100 µL de cada uma delas para contagem em contador automático do tipo poço. O coeficiente de partição (Log P) foi determinado pela fórmula (7) (DURKAN *et al.*, 2007).

$$\text{Log } P = \log \frac{\text{cpm da fase orgânica}}{\text{cpm da fase aquosa}} \quad (7)$$

6.4 Ensaios Pré-Clínicos

Os ensaios apresentados a seguir têm como objetivo complementar o estudo sobre o radiofármaco PSMA-1007-¹⁸F, contemplando ensaios *in vitro* e *in vivo* com modelo tumoral LNCaP. Os dados aqui recolhidos serão usados para fundamentar seu futuro registro junto a ANVISA.

6.4.1 Cultivo das células LNCaP

A linhagem celular escolhida foi a LNCaP por ser PSMA+, ou seja, expressa a glicoproteína PSMA de modo que o produto PSMA-1007-¹⁸F consegue se ligar especificamente a ela (BOUVET *et al.*, 2016).

Para os ensaios pré-clínicos, as células LNCaP (ATTC® CRL-1740TM) foram cultivadas em frascos de cultura com 75 cm² com meio de cultura RPMI 1640 (Life Technologies, MD, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Life Technologies, MD, EUA), 100 U/mL de penicilina e 300 µg/m de estreptomicina (Life Technologies, MD, EUA). As células foram mantidas em estufa úmida a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂, com a troca do meio de cultura realizada duas vezes por semana. Na etapa de tripsinização, foram utilizados 3 mL de tripsina EDTA 0,25% com 8 minutos de incubação em estufa a 37 °C.

Para os estudos *in vitro*, células foram semeadas em placas de seis poços para células aderentes, com 2 mL de meio de cultura RPMI 1640 com 10 % V/V de SFB em cada poço. As placas foram incubadas em estufa por 4 horas a 37 °C em estufa com 5% de CO₂ para promover a adesão das células.

Para os ensaios *in vivo*, foram preparadas suspensões de 100 µL contendo aproximadamente 5 milhões de células em PBS pH 7,4.

6.4.2 Ensaios *in vitro*

Os dois ensaios descritos a seguir foram baseados da literatura, com o objetivo de determinar a especificidade do radiofármaco para com células cancerígenas PSMA+. Os ensaios foram adaptados para maior viabilidade do processo, com o número de células determinado de 1×10^5 células por poço (CARDINALE *et al.*, 2017b).

6.4.2.1 Ensaio de competição

Para esse ensaio foi usado padrão PSMA-1007-F e o PSMA-11 marcado com gálio-68 como amostra radioativa competidora. Devido à alta atividade específica que o produto PSMA-1007- ^{18}F apresenta foi usada essa metodologia descrita em literatura, na qual a contagem da atividade foi feita com base no gálio-68 (CARDINALE *et al.*, 2017b). Assim, 20 μg do PSMA-11 foi marcado com 4 mL do eluato do gerador- ^{68}Ge - ^{68}Ga (atividade de marcação entre 125,8 – 138,38 MBq; 3,40 – 3,74 mCi), empregando-se procedimento padronizado no IPEN e a pureza radioquímica da preparação foi determinada por CCD, apresentando resultado de pureza superior a 98%. O PSMA-11- ^{68}Ga foi diluído para 10 mL com o meio de cultura, sendo utilizados 2,11 nmol/poço (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) do produto finalizado. Já o PSMA-1007-F foi diluído em meio de cultura a uma concentração de 2,11 $\mu\text{mol}/\text{poço}$ (1000x excesso).

O ensaio foi realizado em triplicata utilizando seis poços com 1×10^5 células LNCaP, três com o agente competidor PSMA-1007-F e três com o material radioativo PSMA-11- ^{68}Ga , somente. Iniciou-se o ensaio com a adição de 1 mL do PSMA-11 radiomarcado em todos os poços, seguido pela adição de 1 mL de meio de cultura em metade dos poços e 1 mL do PSMA-1007-F na outra metade, caracterizando a ligação total e a ligação por competição pelo PSMA de membrana, respectivamente.

A incubação ocorreu à temperatura de 4 °C por uma hora seguido do processamento dos poços, consistindo da retirada do sobrenadante de todos os poços, colocado em tubos de contagens identificados (1-3 com competidor; 4-6 sem competidor), seguida da lavagem dos poços com 1mL de PBS pH 7,4. O sobrenadante de lavagem também foi recolhido e transferido para os respectivos tubos (1-3 e 4-6). Por fim, foi adicionado aos poços 1 mL de

hidróxido de sódio (NaOH) 1 M para a lise das células, à temperatura ambiente, por 10 minutos. O sobrenadante das células lisadas de cada poço foi então recolhido e transferido para outros tubos de contagens identificados (1'-3' com competidor; 4'-6' sem competidor). Esse último passo foi feito duas vezes, totalizando 3 tubos para ligação total e 3 para ligação específica.

Em paralelo, foi feito o preparo do padrão do PSMA-11-⁶⁸Ga em triplicata, com a dose aplicada em cada poço em um volume de 2 mL. Ao final do processamento das células e seu recolhimento em cada poço, foi realizada a contagem de cada tubo em um contador automático do tipo poço, com valores obtidos em contagens por minuto (CPM). Estes valores foram convertidos em porcentagem e usados para o cálculo da porcentagem de ligação específica do PSMA-1007-F em função da atividade do PSMA-11-⁶⁸Ga.

6.4.2.2 Ensaio de internalização

Para o ensaio de internalização foi usado o produto PSMA-1007-¹⁸F com concentração de 1 mCi/mL, em placa de 6 poços contendo 1×10^5 células LNCaP em cada poço. O ensaio se iniciou com a adição de 1 mL do produto radiomarcado em cada poço, com incubação em estufa à 37 °C por uma hora. Em seguida foi realizado o processamento dos poços de modo semelhante ao item 6.4.2.1 com o recolhimento do sobrenadante e transferência para tubos de contagem (T_6), seguida da lavagem dos poços com PBS e a transferência do volume para os mesmos tubos (T_6).

A segunda parte do processamento dos poços contou com o tratamento ácido, através da adição de 1 mL de tampão glicina 0,1 M (pH 2,8) em cada poço em temperatura ambiente por 5 minutos, seguido do recolhimento do volume em tubos de contagens (T_6') para a retirada do peptídeo ligado na superfície da célula.

A terceira e última parte contou com o tratamento básico através da adição de 1 mL de hidróxido de sódio 1 M em cada poço por 10 minutos para a quebra das células e a verificação da porcentagem de internalização do peptídeo. Essa ação foi realizada duas vezes em temperatura ambiente, com os volumes de cada lavagem coletados em tubos de contagem (T_6'')

As contagens de cada tubo obtidas em CPM foram usadas para o cálculo de porcentagem de internalização, ligação superficial e ligação total do produto PSMA-1007-¹⁸F.

6.4.3 Ensaios *in vivo*

O uso de modelo animal é de extrema importância para avaliar o potencial de novos radiofármacos, incluindo os materiais radiomarcados com ¹⁸F com potencial de serem desenvolvidos no Centro de Radiofarmácia do IPEN como radiotraçadores de imagem molecular para o diagnóstico de câncer. Em estudos de medicamentos, vários modelos animais foram desenvolvidos na tentativa de melhor reproduzir a doença, tal como ocorre no organismo humano. Os modelos animais são altamente relevantes para avaliar o potencial destes medicamentos na fase de estudos pré-clínicos e futura aplicação na clínica translacional (SUZUKI *et al.*, 2008).

O rato é o animal mais usado em pesquisa, seguido pelo camundongo, coelho, cão, suíno e primatas. Cerca de 85 % dos artigos da Medline e 70,5 % dos artigos da Lilacs empregam ratos e camundongos, quando se trata de radiofármacos de F-18. É frequentemente encontrado na literatura o uso de ratos e camundongos como modelo animal para câncer de próstata, com foco em machos para a formação de tumores com células PC-3 e LNCap. CARDINALE *et al.* (2017b) usaram camundongos machos da linhagem BALB/c para estudar a biodistribuição do radiofármaco PSMA-1007-¹⁸F. ZLATOPOLSKIY *et al.* (2018), trabalharam com ratos para comparar compostos radiomarcados com flúor-18 e gálio-68 em relação à especificidade e sensibilidade em imagens PET/CT.

Para avaliar o comportamento do radiofármaco PSMA-1007-¹⁸F quando presente no organismo vivo e, assim, validar os dados presentes na literatura, foram realizados os ensaios descritos a seguir (CARDINALE *et al.*, 2017b; PUJATTI, 2012).

6.4.3.1 Estudos farmacocinéticos em camundongos BALB/c sadios

A farmacocinética estuda a cinética das variáveis absorção, distribuição, metabolismo e excreção em relação ao tempo. Esses diferentes parâmetros farmacocinéticos oferecem uma imagem clara dos dados quantitativos *in vivo* para um determinado medicamento sob estudo pré-clínico e clínico, ajudando na tomada de decisões sobre os efeitos terapêuticos e segurança dos medicamentos. Esse estudo é feito durante o desenvolvimento do medicamento, no qual a análise desses aspectos pré-clínicos é vital para sua aplicação (RAJPOOT *et al.*, 2021).

Sendo assim, o ensaio de farmacocinética foi realizado em conjunto com o ensaio de biodistribuição em camundongos BALB/c sadios entre 12-13 semanas de vida. Por meio de administração intravenosa caudal, 5,55 MBq (150 μ Ci) do produto PSMA-1007-¹⁸F, diluídos em 100 μ L de solução injetável de cloreto de sódio 0,9%, foram injetados e a captação sanguínea foi avaliada nos tempos de 15 minutos, 30 minutos, 1h, 2h e 4h após a administração, em 4 animais para cada tempo. Ao final de cada tempo, os animais foram anestesiados por inalação de isoflurano, sendo sacrificados logo após a coleta da amostra de sangue do coração por meio de uma seringa de insulina (BALIEIRO, 2020).

A radioatividade das amostras de sangue foi analisada em um contador automático do tipo poço e os dados em CPM foram processados em porcentagem de atividade injetada (%AI) em relação ao CPM do padrão, conforme descrito na fórmula (8). Assim, os dados foram analisados e plotados em um gráfico utilizando-se o software GraphPad Prism 8.4.3 sob o modelo de distribuição bicompartimental, caracterizado por duas exponenciais, representando a fase de decaimento rápido e fase de decaimento lento.

$$\%AI \text{ total} = \frac{CPM \text{ da amostra} \times \text{volemia total}}{\text{volume da amostra} \times (CPM \text{ do padrão} - CPM \text{ da cauda})} \times 100 \quad (8)$$

Os parâmetros estudados neste ensaio foram: Constante de distribuição (α), Constante de eliminação (β), Meia-vida de eliminação ($T_{1/2\beta}$), Meia-vida de distribuição ($T_{1/2\alpha}$) e a Área sob a curva (AUC). Além desses pontos, o

clareamento sanguíneo (CL) e o volume de distribuição (Vd) foram calculados por meio das fórmulas (9) e (10).

$$CL = \frac{\text{Atividade total administrada (CPM)}}{AUC} \quad (9)$$

$$Vd = \frac{CL}{\beta} \quad (10)$$

6.4.3.2 Estudo de biodistribuição em camundongos BALB/c sadios

O método utilizado para analisar a variação das concentrações do radiofármaco PSMA-1007-¹⁸F nos diferentes fluidos e tecidos do organismo foi o método invasivo. O presente ensaio foi realizado de acordo com o especificado no item 6.4.3.1. Após a coleta de sangue, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os principais órgãos foram retirados e pesados. A radioatividade presente no sangue e tecidos foi contada em um contador gama tipo poço, com os dados ajustados em software de CPM para captação nos tecidos em função da porcentagem da atividade injetada (%AI) e por atividade por grama do tecido (%AI/g) através das fórmulas (11) e (12) abaixo.

$$\%AI = \frac{CPM (\text{órgão/tecido})}{CPM (\text{padrão}) - CPM (\text{cauda})} \times 100 \quad (11)$$

$$\%AI/g = \frac{CPM (\text{órgão/tecido})}{\text{peso do órgão (g)} \times (CPM \text{ padrão} - CPM \text{ cauda})} \times 100 \quad (12)$$

Para o cálculo da atividade presente nos ossos (%AI/osso total) e nos músculos (%AI/músculo total) em porcentagem, foi considerado o peso do esqueleto como 12 % e dos músculos como 40 % do peso corporal do animal (BOFF, 2008).

$$\%AI(\text{osso total}) = \frac{CPM \text{ fêmur} \times 12 \times \text{peso corpóreo (g)}}{\text{peso fêmur (g)} \times (CPM \text{ padrão} - CPM \text{ cauda})} \quad (13)$$

$$\%AI(\text{músculo total}) = \frac{CPM \text{ músculo} \times 40 \times \text{peso corpóreo (g)}}{\text{peso músculo (g)} \times (CPM \text{ padrão} - CPM \text{ cauda})} \quad (14)$$

6.4.3.3 Estudo de biodistribuição em camundongos SCID com modelo tumoral LNCaP

Para o presente estudo foram utilizados cinco camundongos machos SCID entre 13 e 22 semanas de vida para avaliar a biodistribuição para cada tempo avaliado, sendo 30 minutos, 1 hora, e 2 horas após a administração do radiofármaco. Para o desenvolvimento do modelo tumoral, 1×10^5 células de tumor LNCaP em 50% de Matrigel foram injetadas subcutaneamente na pata esquerda dos camundongos, com os estudos iniciados após duas semanas do dia de inoculação. O diâmetro dos tumores palpáveis ficou em torno de 6 a 7 mm.

A metodologia do estudo seguiu conforme descrita no item 6.4.3.2 e a coleta de sangue foi feita pelo plexo ocular utilizando-se um tubo capilar heparinizado, de volume 70 μL . O sacrifício dos animais e a retirada dos órgãos foram realizados conforme descrito para os camundongos saudáveis, incluindo a retirada do tumor para determinação da %AI/órgão ou tumor e %AI/g.

6.4.3.3.1 Estudo de competição *in vivo*

Em conjunto com o ensaio de biodistribuição em camundongos SCID com tumor, um grupo de cinco animais foi incluído no tempo de 1 hora para um estudo de competição, com o objetivo de demonstrar a especificidade do produto PSMA-1007- ^{18}F *in vivo*. Assim, 100 μg de PSMA I&T diluídos em 100 μL de água para injetáveis (API) foram injetados via caudal 30 minutos antes da aplicação do radiofármaco, atuando como agente bloqueador. Por ser específico para PSMA e por não haver um estudo comparativo com o PSMA-1007- ^{18}F na literatura até o momento, o PSMA I&T foi incluído no estudo como agente competidor (CYTAWA *et al.*, 2020).

Os animais foram sacrificados juntamente com os animais sem a presença de competidor, tendo o mesmo tratamento descrito anteriormente.

6.4.3.3.2 Imagem de corpo inteiro de camundongos SDIC com modelo tumoral LNCaP em Micro PET

Foram realizadas imagens em micro PET/CT em três animais com modelo tumoral nos tempos de 1 hora, 1 hora com bloqueio e de 2 horas após a administração de 5,55 MBq (150 μ Ci) do radiofármaco, para avaliar a imagem de biodistribuição e captação tumoral. Para a realização das imagens, os animais foram anestesiados com isoflurano por inalação (concentração inicial 0,5% - anestesia geral 1,0 a 1,87 %) e sacrificados nos determinados tempos, e colocados na câmara de escaneamento microPET/SPECT/CT (microPET/SPECT/CT focus 220 siemens). A aquisição da imagem PET foi realizada por 15 minutos, seguida de imagem CT (35 keV, 400 μ A). Durante esse período, a câmara de escaneamento foi mantida a 35 °C.

A visualização das imagens, processamento e análise foram realizados com o software PMOD v3.3. Para a análise das imagens PET, os arquivos foram calibrados por SUV (do inglês *standardized uptake value*) e a captação no tumor foi obtida após seleção do VOI (do inglês *volume of interest*) do tumor a partir da imagem CT e aplicação desse VOI na imagem PET.

6.4.3.4 Histopatologia do tumor de próstata LNCaP

Um exame histopatológico consiste em avaliar um fragmento de tecido através de um microscópio para confirmação de um diagnóstico, no caso deste trabalho, o objetivo foi a avaliação do tecido tumoral para confirmação. Após a realização do ensaio completo de biodistribuição em animais SCID com modelo tumoral, os tumores recolhidos foram cortados e fixados em lâminas com parafina para análise histopatológica. A avaliação das lâminas foi realizada por meio de um microscópio Nikon Eclipse Ci, onde foi possível registrar as imagens da camada superficial e interna dos tumores.

6.5 Validação da Metodologia Analítica para determinação da Pureza Radioquímica

Como parte complementar do trabalho e também um processo importante para a implementação de uma rotina de produção do radiofármaco

PSMA-1007-¹⁸F, foi realizada a validação da metodologia analítica de CCD empregada detecção do flúor-18 livre na determinação da pureza radioquímica. Além de ser um requerimento das Boas Práticas de Fabricação (BPF), é uma das atividades que asseguram a qualidade do produto farmacêutico e garante resultados analíticos confiáveis.

Seguindo as diretrizes da RDC Nº 166 da ANVISA (ANVISA, 2017), esta parte do trabalho teve como objetivo garantir que o método escolhido seja adequado e satisfaz os requisitos descritos no capítulo de radiofármacos da 6ª edição da FARMACOPEIA BRASILEIRA (2019).

O presente ensaio foi realizado visando a validação completa do método analítico, contemplando os parâmetros de validação por doseamento, que inclui: Seletividade; Linearidade; Precisão – repetibilidade; Precisão intermediária; Exatidão; Robustez e Intervalo. O ensaio de Exatidão não foi realizado, pois não há disponível uma substância química de referência (SQR) para avaliar a capacidade do método analítico em recuperar o analito da amostra, tão pouco se tem disponível outro método validado que possa ser utilizado de maneira comparativa.

6.5.1 Método cromatográfico a ser avaliado

O método analítico escolhido para validação foi a cromatografia de camada delgada de sílica gel 60 com suporte aluminizado nas dimensões 12,5 x 1,5 cm, com ponto de aplicação a 1,5 cm do início da fita e a frente do solvente a 11,5 cm, totalizando 10 cm de corrida e como solvente a mistura de acetonitrila e água purificada nas proporções 40:60, em cuba de vidro pré-saturada por 30 minutos com a mistura de solventes (3-4 mL) (CARDINALE *et al.*, 2017a).

A concentração radioativa padrão do produto PSMA-1007-¹⁸F usada para a validação foi de 37 MBq/mL (1 mCi/mL), diluída (quando necessário) em solução de cloreto de sódio 0,9%. O volume de aplicação foi de 2 µL, com a corrida iniciada logo após a secagem da amostra. Ao final da corrida, as fitas foram secas e cortadas em 10 segmentos de 1 cm, colocados em tubos de contagem para leitura em contador gama do tipo poço.

Como método de avaliação do método, foi estudado o poder de separação entre a impureza flúor-18 livre e o produto radiomarcado, sendo avaliado não só o fator de retenção de ambos os materiais como também sua porcentagem de atividade residual. Sendo assim, foi considerado o critério de aceitação para pureza radioquímica do PSMA-1007-¹⁸F previsto na literatura de $\geq 95\%$, definindo a porcentagem permitida para o flúor-18 livre de $\leq 5\%$ (CARDINALE *et al.*, 2017a), o que vai de encontro com o critério estipulado na monografia do PSMA-1007-¹⁸F (EUROPEAN PHARMACOPUEIA, 2021c). O cálculo da porcentagem de pureza radioquímica (%PR) foi efetuado de acordo com a fórmula (16), subtraindo-se de 100% a porcentagem calculada de flúor-18 livre. Por sua vez, a porcentagem de flúor-18 livre foi calculada de acordo com a fórmula (15).

$$\%Flúor\ livre = \frac{CPM\ do\ 1^o\ segmento}{\Sigma\ CPM\ da\ fita} \times 100 \quad (15)$$

$$\%PR = 100 - \%Flúor\ livre \quad (16)$$

O Rf do produto PSMA-1007-¹⁸F e a impureza radioquímica flúor livre se encontra na tabela 3.

Tabela 3 - Fator de retenção das espécies radioquímicas do produto PSMA-1007-¹⁸F

Rf do produto (PSMA-1007- ¹⁸ F)	Rf da impureza (¹⁸ F livre)
Entre 0,9 e 1,0	0,0

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

6.5.2 Parâmetros avaliados

6.5.2.1 Seletividade

Este parâmetro teve como objetivo demonstrar que a presença de impurezas, possíveis contaminantes e produtos químicos ou radioativos na matriz não interferem na identificação ou na quantificação do produto. Assim, de acordo com o processo de produção, foram selecionadas duas matéria-primas químicas (MPQ) e uma matéria-prima radioativa (MPR) que podem

interferir no Rf do PSMA-1007-¹⁸F e, conseqüentemente, invalidar o método escolhido.

A MPR usada foi o Na¹⁸F, obtido no mesmo módulo de síntese empregado na produção do PSMA-1007-¹⁸F, a partir da extração do íon fluoreto (¹⁸F⁻) do cartucho QMA com cloreto de sódio 0,9%. A concentração da MPR foi de 37 MBq/mL (1 mCi/mL).

A MPQ 1 foi o solvente DMSO, enquanto que a MPQ 2 foi uma solução de TBA na mesma concentração da solução referência da Farmacopeia Europeia de 2,6 mg/V.

A partir das soluções interferentes, foram preparadas sete soluções testes a fim de avaliar o comportamento de cada interferente isoladamente e na presença do PSMA-1007-¹⁸F. As soluções foram preparadas de acordo com a tabela 4.

Tabela 4 - Descrição do preparo das soluções testes para o ensaio de seletividade

Solução Teste	PSMA-1007-¹⁸F	MPR ¹⁸F⁻	MPQ1 DMSO	MPQ2 TBA
1	0,1 mL	-	-	-
2	-	0,1 mL	-	-
3	0,1 mL	0,1 mL	-	-
4	0,1 mL	-	20 µL	-
5	-	0,1 mL	20 µL	-
6	0,1 mL	-	-	20 µL
7	-	0,1 mL	-	20 µL

Fonte: Autor

Com as soluções teste preparadas, foi aplicado o método CCD-SG para a determinação da pureza radioquímica do produto PSMA-1007-¹⁸F em triplicata. A mistura do produto com os demais interferentes não deve influenciar no seu Rf, assim como a mistura dos interferentes entre si não deve alterar o Rf das espécies radioquímicas. Este critério de aceitação está evidenciado na tabela 5.

Tabela 5 - Critério de aceitação para o ensaio de seletividade

Solução teste	Critério de aceitação
1	Rf entre 0,9 e 1,0 (% PR \geq 95%)
2	Rf em 0,0 (MPR fluoreto $^{18}\text{F}^-$)
3	Rf entre 0,9 e 1,0 (Sem interferência da MPR no Rf do PSMA-1007- ^{18}F)
4	Rf entre 0,9 e 1,0 (Sem interferência da MPQ 1 no Rf do PSMA-1007- ^{18}F)
5	Rf em 0,0 (Sem interferência da MPQ 1 no Rf do fluoreto $^{18}\text{F}^-$)
6	Rf entre 0,9 e 1,0 (Sem interferência da MPQ 2 no Rf do PSMA-1007- ^{18}F)
7	Rf em 0,0 (Sem interferência da MPQ 2 no Rf do fluoreto $^{18}\text{F}^-$)

Fonte: Autor

Foi calculado o desvio padrão (17) e o desvio padrão relativo (18) da %PR da solução teste 1, definindo o quanto os valores encontrados se desviam da média. O DPR deve ser \leq 5%.

$$DP = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \text{média}_x)^2}{n-1}} \quad (17)$$

$$DPR = \frac{DP}{\text{média}_x} \times 100 \quad (18)$$

Onde:

DP = Desvio padrão

DPR = Desvio padrão relativo

x_i = valor da %PR encontrada individual

média_x = média das %PR encontradas

n = número de análises realizadas

6.5.2.2 Linearidade

O ensaio de linearidade teve como objetivo avaliar a reprodução de uma resposta linear entre a concentração do produto e a radioatividade que ele apresenta, dentro de um intervalo específico. Para isso, foi utilizada uma amostra de PSMA-1007-¹⁸F com concentração padrão de 37 MBq/mL (1 mCi/mL), considerada como uma solução 100%. Com base nesta amostra, diluições de 5% a 120% foram preparadas a fim de avaliar a linearidade entre a concentração do produto e a atividade medida em CPM no contador gama. A tabela 6 detalha o preparo das amostras.

Tabela 6 - Preparo das diluições das amostras para o ensaio de linearidade

Amostra	1	2	3	4	5	6
Concentração	5%	10%	50%	8%	100%	120%
	(0,05 mCi/mL)	(0,1 mCi/mL)	(0,5 mCi/mL)	(0,8 mCi/mL)	(1,0 mCi/mL)	(1,2 mCi/mL)
PSMA-1007-¹⁸F	Volume necessário para se obter a atividade próxima à desejada					
Cloreto de sódio 0,9%	Volume necessário para a diluição até a atividade desejada					

Fonte: Autor

Este estudo foi realizado por SPOT TEST e a capacidade de detecção do sistema foi avaliada frente à linearidade em relação à diluição da amostra. As análises foram feitas em quintuplicata com as fitas de CCD-SG divididas em 5 segmentos de 2 cm cada, com o volume de aplicação da amostra de 2 µL. Após a secagem das amostras, as fitas foram cortadas e contadas em um contador gama do tipo poço, onde as CPM encontradas foram avaliadas e tratadas conforme descrito a seguir:

- Representação gráfica das respostas em função da concentração do analito;
- Gráfico de dispersão dos resíduos, acompanhado de sua avaliação estatística;
- Equação da reta de regressão de y em x, estimada pelo método dos mínimos quadrados;

- d) Avaliação da significância do coeficiente angular:
- Homocedasticidade;
 - Nos testes estatísticos foi utilizado um nível de significância de 5%;
 - Avaliação da associação linear entre as variáveis por meio dos coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2).

Como critério de aceitação, os resultados das contagens de cada amostra devem ser diretamente proporcionais à concentração de ^{18}F . Em somatória, o coeficiente angular deve ser significativamente diferente de zero.

6.5.2.3 Precisão

O ensaio avaliou a concordância entre os resultados obtidos por meio dos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária, com amostras preparadas conforme descrito no item 6.5.1, utilizando um único lote do produto. As amostras foram preparadas no início de cada procedimento de maneira independente dos demais estudos realizados neste trabalho.

O ensaio de repetibilidade seguiu os critérios de avaliação utilizando seis réplicas com 100 % da concentração padrão de 37 mBq/mL (1 mCi/mL), com as análises feitas pelo mesmo operador, no mesmo dia, com a mesma instrumentação e método de detecção.

O ensaio de precisão intermediária foi conduzido por dois analistas diferentes, no mesmo dia, com as análises feitas no mesmo laboratório e empregando a mesma instrumentação e método de detecção. O ensaio foi feito em triplicata para cada analista, contemplando as mesmas concentrações de 37 MBq/mL (1 mCi/mL).

Este estudo é interpretado pela dispersão dos resultados, sendo calculado o desvio padrão relativo dos resultados da porcentagem de pureza radioquímica encontrada em ambas as análises. A variância (V) foi calculada a partir do desvio padrão relativo entre os resultados analisando o quão distante cada valor do conjunto encontrado está do valor esperado, encontrado na repetibilidade. A fórmula (19) usada para esta finalidade se encontra abaixo.

$$DP = \sqrt{V} \quad (19)$$

6.5.2.4 Robustez

O ensaio de robustez avalia a capacidade do método escolhido em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas padrão, não afetando seu Rf e sua pureza. Se o método se diz robusto o suficiente, maior é a confiança nos resultados de precisão vistos no estudo anterior, pois um complementa e influencia o outro.

Em junho de 2020, o INMETRO publicou orientação sobre validação de métodos analíticos, segundo a qual o ensaio de robustez é totalmente opcional (INMETRO, 2020). A RDC N° 166 não estipula um método ou parâmetros a serem avaliados usando CCD, ficando a critério do analista determinar quais são os pontos críticos a serem avaliados neste estudo (ANVISA, 2017).

Para esse estudo, utiliza-se como procedimento analítico padrão no Centro de Radiofarmácia do IPEN o teste de Youden, proposto em 1975 por Youden e Steiner, que avalia a influência de variações múltiplas no resultado final de forma individual (BONFILIO *et al.*, 2012).

Este mesmo teste é proposto pela União Europeia na versão de 2002 de diretrizes para o desempenho dos métodos analíticos e na interpretação dos resultados. No documento publicado, é dito como convencional o teste de Youden para análises de pequenas e grandes alterações na validade de robustez (COMISSÃO EUROPEIA, 2002).

A estratégia do teste conta com a identificação dos fatores que influenciam diretamente nos resultados, seguido pela denominação como valores de alto nível e baixo nível, representados pelas letras maiúsculas e minúsculas, respectivamente. A partir disso, o experimento é organizado de maneira fracionária pelo modelo de Plackett-Burman, que permite que o estudo seja feito com até sete fatores de variáveis em oito experimentos. Assim, o efeito de cada fator é estimado como a diferença entre o resultado médio obtido no alto nível e o obtido no baixo nível (KARAGEORGOU; SAMANIDOU, 2014).

Com base nisso, para o presente estudo foram determinadas três variáveis em quatro ensaio em triplicata: Concentração do produto PSMA-

1007-¹⁸F, volume aplicado e o solvente utilizado na fase móvel (F.M.). A condição padrão de análise, denominada como valores de alto nível, estão especificadas na tabela 7 com letras maiúsculas. A condição variável, denominada como valores de baixo nível, estão especificadas com letras minúsculas. Os parâmetros foram organizados e conduzidos de acordo com a tabela 8.

Tabela 7 - Fatores escolhidos para o estudo de robustez, especificando os valores de alto e baixo nível

Parâmetros	Valores	
	Alto nível	Baixo nível
Concentração da amostra	37 MBq/mL (A)	18,5 MBq/mL (a)
Volume da amostra	2 µL (B)	5 µL (b)
Composição da fase móvel (v/v)	Acetonitrila/H ₂ O purificada (60:40) (C)	Acetonitrila/H ₂ O purificada (40:60) (c)

Fonte: Autor

Tabela 8 - Esquema adotado nos experimentos de robustez considerando os fatores de alto e baixo nível

Parâmetros	Número de experimentos			
	1	2	3	4
A/a	A	A	a	a
B/b	B	b	B	b
C/c	C	c	c	C
Resultados	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄

Fonte: Autor

A %PR de cada experimento foi calculada de acordo com os demais ensaios. O efeito de cada parâmetro foi estimado a partir da diferença (D) entre a média obtida nos valores de alto nível e baixo nível, seguindo as fórmulas (20) e (21).

$$\text{Média da \%PR}_{A/B/C/a/b/c} = \frac{\sum R_{A/B/C/a/b/c}}{2} \quad (20)$$

$$D = Média_{A/B/C} - Média_{a/b/c} \quad (21)$$

O teste de t de student foi adotado para determinar se os fatores selecionados têm um efeito significativo no resultado final, tendo como referência um valor tabulado bicaudal com nível de confiança de 95%. O cálculo de cada variável foi feito segundo a fórmula (22).

$$T = \frac{média - média_0}{\frac{D.P.}{\sqrt{n}}} \quad (22)$$

Onde:

média = média dos valores

Média₀ = Média da população, que é igual a 0

D.P. = Desvio padrão dos valores

n = número de experimentos, que é igual a 12

Como critério de aceitação, os efeitos encontrados foram comparados com o valor unilateral para (n-1) graus de liberdade. O método é considerado robusto se o valor T calculado (T_{cal}) encontrado for menor que valor de T tabelado (T_{tab}) da Distribuição T de Student (MILLER; MILLER, 2018).

6.5.2.5 Intervalo

Segundo a RDC nº166 (ANVISA, 2017), o ensaio de intervalo é obrigatório na validação por doseamento e avalia se a quantidade do analito presente na amostra está dentro de um limite mínimo e máximo de trabalho previamente estabelecido, onde estes limites pode ser determinado pelo próprio laboratório ou, se o radiofármaco tiver monografia em compêndios reconhecidos pela ANVISA, usar os dados fornecidos pelo documento oficial. Normalmente é o último ensaio a ser realizado, pois ele analisa os resultados de linearidade e exatidão a fim de determinar esse intervalo de trabalho de modo otimizado (EMA, 1995).

6.6 Análise Estatística

Para a análise estatística utilizou-se o programa GraphPad Prism 8.4.3. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). Foi aplicado teste t de Student com distribuição bicaudal para comparação entre grupos. Diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor que 0,05.

7 RESULTADOS E DISCUSSÕES

7.1 Determinação do Rendimento de Síntese do PSMA-1007-¹⁸F

Foram realizados testes de qualificação da programação do módulo, fornecido pelo fabricante do kit de reagentes para a síntese do radiofármaco PSMA-1007-¹⁸F (ABX, Alemanha), por meio de simulações da síntese do radiofármaco. Esta avaliação teve como objetivo verificar a adequabilidade da planilha do software, possibilitando a operação do módulo sem interrupções ou falhas.

Partindo para a síntese com flúor-18, a partir da irradiação em ciclotron da água enriquecida em ¹⁸O, foram realizadas 10 sínteses de PSMA-1007-¹⁸F com a planilha original. Todas as produções foram feitas com alta atividade de entrada, com tempo de irradiação de 1 hora e 30 minutos \pm 30 minutos.

As produções de PSMA-1007-¹⁸F ocorreram de acordo com a literatura, com tempo de síntese de 43 minutos (WITKOWSKA-PATENA *et al.*, 2020). A tabela 9 apresenta as atividades de entrada e de saída do módulo, usadas para o cálculo de rendimento corrigido. Uma das produções foi interrompida devido a um problema na válvula da liberação de TBA-OH, fazendo com que o radionuclídeo não fosse eluído do cartucho QMA e a síntese do PSMA-1007-¹⁸F não teve continuidade. Ainda assim, foi possível calcular o rendimento de síntese das demais produções e compará-las ao critério de aceitação da literatura.

Tabela 9 - Rendimento de marcação do PSMA-1007-¹⁸F

Síntese	Atividade de Entrada (GBq)	Atividade de saída (GBq)	Rendimento corrigido	Critério de aceitação na literatura*
1	105,9	19,3	23,9%	43,3% - 52,8%
2	91,0	44,3	64,6%	
3	89,1	1,0	1,2%	
4	51,8	-	Interrompida	
5	42,0	16,0	49,9%	
6	81,8	15,7	25,2%	
7	67,2	26,0	53,9%	
8	101,3	51,7	67,8%	
9	120,6	43,0	47,4%	
10	89,1	29,7	43,5%	

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

Três sínteses apresentaram resultados de rendimento abaixo do descrito em literatura (síntese 1, 3 e 6), sendo usadas para validação da metodologia analítica empregada para pureza radioquímica do PSMA-1007-¹⁸F. Na primeira síntese houve uma troca nos frascos de envase, onde o volume final era maior do que o frasco podia comportar, levando à interrupção do processo de envase. Como o volume não foi inteiramente para o frasco, o rendimento calculado foi subestimado, ficando abaixo do limite esperado. O baixo rendimento observado nas sínteses 3 e 6 foram atribuídos, respectivamente à falha de comunicação que ocorreu entre o computador e o módulo pelo cabo USB, travando o programa no momento da síntese e falha mecânica do módulo. A comunicação entre o computador e o módulo é de extrema importância, pois sem o software o módulo não realiza a síntese, e essa falha fez com que a produção não fosse feita de maneira correta, levando a um rendimento desprezível. Já para a síntese 6, a provável razão foi que o módulo não tenha desempenhado os comando corretamente (falha mecânica), visto que um volume remanescente foi encontrado em cada frasco de reagente ao final da produção.

Algo que deve ser observado, no entanto, é que a medida da atividade de flúor-18 na entrada do módulo é realizada de forma estimada pelo detector no cartucho QMA, não sendo possível medir a atividade com precisão. Já a

atividade do produto acabado é efetivamente determinada por meio de um calibrador de doses presente na cela de envase.

No geral, o rendimento obtido nas produções estão de acordo com o encontrado na literatura por outros autores de $57,0 \pm 10,1\%$, corroborando a ideia de que a metodologia aplicada neste trabalho é efetiva (FESAS et al., 2019).

Todas as produções realizadas foram utilizadas para a realização dos ensaios deste trabalho. As sínteses do radiofármaco PSMA-1007- ^{18}F no módulo TRACERLab MX apresentaram rendimentos altos que não variaram significativamente em função da atividade de entrada ($P < 0,0001$), capazes de atender a inúmeras doses do radiofármaco, dependendo da calibração empregada. A atividade de PSMA-1007- ^{18}F empregada em estudos clínicos varia de acordo com a literatura consultada, sendo de 356 – 111 MBq (GIESEL et al., 2017), 240 – 260 MBq (GIESEL et al., 2018b), 154 – 326 MBq (GIESEL et al., 2018a) ou 4 MBq/kg (KUTEN et al., 2020; RAHBAR et al., 2018a). Considerando-se uma atividade média administrada de 250 MBq, a síntese 8, por exemplo, que resultou em atividade final de 51,7 GBq, corresponderia a 206 doses do radiofármaco, sem considerar a correção para a data de calibração.

7.2 Controle de Qualidade do Radiofármaco PSMA-1007- ^{18}F

7.2.1 Identidade radioquímica

O ensaio foi realizado em conjunto com o Serviço de Controle de Qualidade do Centro de Radiofarmácia do IPEN/CNEN, por meio da medida da atividade em função do tempo das amostras de PSMA-1007- ^{18}F para determinar o tempo de meia-vida física do flúor-18.

O decaimento radioativo é um processo que não depende de fatores externos, sendo que a velocidade de decaimento nuclear depende unicamente da identidade do isótopo, não de sua forma química ou da temperatura. Assim, a velocidade de decaimento é de primeira ordem, visto que a relação entre a velocidade de decaimento e o número de núcleos radioativos é dada pela lei de

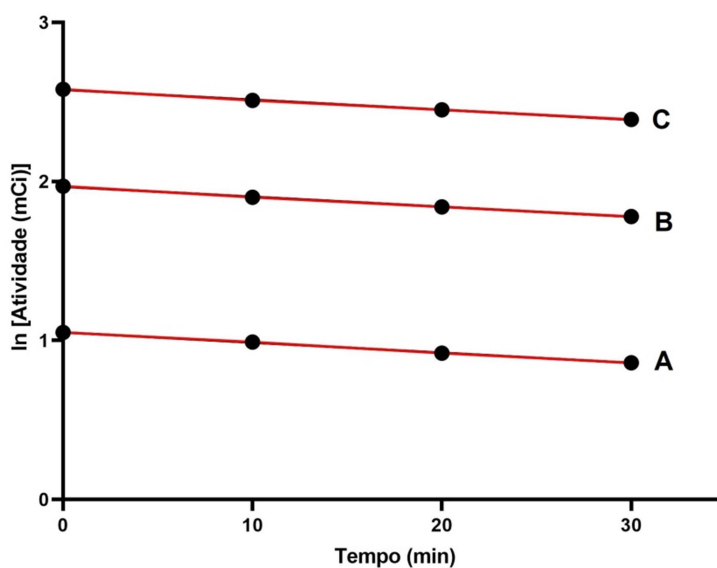
decaimento radioativo descrita a seguir (23), onde k é a constante de decaimento (ATKINS; JONES; LAVERMAN, 2018).

$$\text{Atividade} = \text{velocidade de decaimento} \times k \quad (23)$$

A lei de velocidade de primeira ordem implica em um decaimento exponencial entre a concentração do reagente pelo tempo e, sabendo que a atividade de uma amostra radioativa é proporcional ao número de átomos presentes na amostra, é possível verificar se a reação vista nas amostras de PSMA-1007- ^{18}F são de primeira ordem lançando em um gráfico o logaritmo natural das atividades em função do tempo, esperando um comportamento de uma reta onde a sua inclinação é $-k$ (ATKINS; JONES; LAVERMAN, 2018).

A figura 19 ilustra o comportamento de decaimento visto nas amostras de PSMA-1007- ^{18}F , e na tabela 10 encontram-se os dados calculados através das medidas da atividade, respectivamente. ($n=4$).

Figura 19 - Curva de decaimento de \ln das amostras de PSMA-1007- ^{18}F



Fonte: Autor

Tabela 10 - Dados obtidos através da análise estatística da atividade encontrada nas amostras de PSMA-1007-¹⁸F na sua identificação radionuclídica

Síntese (n)	Equação da reta	coeficiente angular (-k)	r ²	T _{1/2} calculado (minutos)
A	Y = -0,006400*X + 1,051	-0,006400	0,9990	108,3
B	Y = -0,006300*X + 1,967	-0,006300	0,9985	110,0
C	Y = -0,006300*X + 2,577	-0,006300	0,9985	110,0

Fonte: Autor

O coeficiente de determinação calculado mostra o grau de variação entre os valores obtidos e quanto mais próximo de 1, maior é a sua precisão. Os r² das 3 amostras analisadas indicam grande ajuste ao modelo estatístico linear usado, caracterizando perfeito comportamento de cinética de primeira ordem, em especial a síntese A. Com isso, foi possível confirmar estatisticamente de que se trata de um processo de decaimento radioativo, podendo-se determinar o T_{1/2} do radioisótopo pela equação 3 do item 6.2.1.

A equação da reta pode ser interpretada da seguinte forma: $\ln_{\text{atividade}} = kt + b$, onde b é o coeficiente linear e k o coeficiente angular, termo que acompanha x, em minutos. Aplicando os valores encontrados na equação 3, foram calculados os tempos de meia-vida representados na tabela 10. Pelas monografias do FDG-¹⁸F (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019), FLT-¹⁸F (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2021a) e PSMA-1007-¹⁸F (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2021c), a meia-vida do flúor-18, determinada usando um sistema de detecção adequado, deve estar entre 105 e 115 minutos, critério também adotado na literatura do radiofármaco (CARDINALE *et al.*, 2017a). O T_{1/2} de cada síntese ficou dentro do critério aceito para o flúor-18, confirmando ser o radionuclídeo presente na amostra de PSMA-1007-¹⁸F.

7.2.2 Pureza radionuclídica (PRn)

A pureza radionuclídica foi avaliada em amostras do PSMA-1007-¹⁸F conforme procedimentos estabelecidos pelo Serviço de Controle de Qualidade

do Centro de Radiofarmácia do IPEN/CNEN. As análises foram realizadas em média 2 horas após bombardeamento, e detectadas por um detector de germânio ultrapuro com limites de detecção de fótons entre 1 e 65.535 keV por 10 minutos. O equipamento consegue detectar fótons vindos de radioisótopos emissores de raios gama e pósitrons. Os pósitrons são emitidos por núcleos deficientes de nêutrons que interagem com os elétrons do meio e são aniquilados, dando origem a dois fótons de 511 keV que são emitidos em direções opostas e identificados pelo detector (SAHA, 2010).

Através dessa medição, foi possível determinar quantitativamente o flúor-18 presente na amostra de PSMA-1007-¹⁸F através da área dos picos de energia. O pico que obteve energia maior nas análises realizadas foi o pico característico do pósitron de 511 keV, e o pico de 1.022 keV foi encontrado em duas análises, sendo considerado, em conjunto com 511 keV, para o cálculo de % pureza radionuclídica (%PRn). Essa energia de 1.022 keV se dá pela soma das duas energias de 511 keV (SAHA, 2010).

De acordo com KILIAN *et al.* (2014), as principais impurezas radionuclídicas encontradas que contribuem para a atividade do produto final são ⁵²Mn, ⁵⁶Co, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁹⁵Tc e ¹⁸³Re, e as energias características destes radionuclídeos não foram encontradas nas leituras das amostras de PSMA-1007-¹⁸F analisadas (tabela 11). Kilian afirma que a presença de outros radionuclídeos é possível e altamente variável, pois depende diretamente de fatores externos como parâmetros de produção (porta-alvo usado, energia dos prótons e corrente de feixe), possível contaminação no fracionamento, equipamento usado para medição e o tempo decorrido desde o final do bombardeamento até a medição da amostra.

Tabela 11 - Impurezas radionuclídicas que podem ser encontradas na produção de radiofármacos marcados com flúor-18

Radionuclídeos	Energia (keV)
⁵² Mn	1434,1 / 935,5 / 744,2
⁵⁶ Co	846,8
⁵⁷ Co	122,1
⁵⁸ Co	810,8
⁹⁵ Tc	765,8
¹⁸³ Re	1345

Fonte: KÖHLER *et al.*, 2013; MARENGO *et al.*, 2008.

Tabela 12 - Energias encontradas nas leituras das amostras de PSMA-1007-¹⁸F para a análise de pureza radionuclídica (n=5)

Origem	Energia (keV)	Área do pico
Raio-X	30,11	$5,03 \times 10^3$
	30,36	$1,14 \times 10^4$
	80,42	$4,45 \times 10^3$
	84,49	$3,10 \times 10^2$
	84,87	$6,48 \times 10^2$
Impurezas desconhecidas	310,87	$6,48 \times 10^2$
	335,71	$6,87 \times 10^2$
	364,50	$2,56 \times 10^3$
	571,13	$4,95 \times 10^1$
	636,95	$7,15 \times 10^1$
¹⁸ F	510,96	$2,55 \times 10^5 - 6,12 \times 10^5$
	1021,78	$4,51 \times 10^1 - 6,88 \times 10^1$

Fonte: Autor

A tabela 12 mostra as impurezas radionuclídicas encontradas nas amostras de PSMA-1007-¹⁸F em contagens consideráveis, mas não suficientes para interferir na pureza radionuclídica do radiofármaco, de acordo com os critérios de aceitação (tabela 13). O critério de aceitação para a pureza radionuclídica do PSMA-1007-¹⁸F é o mesmo adotado para outros radiofármacos com flúor-18 como FDG-¹⁸F (FARMACOPEIA BRASILEIRA,

2019) e FLT-¹⁸F (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021a). Para o cálculo de %PRn, os picos com energias abaixo de 100 keV não foram incluídos por serem considerados como raios-X.

Tabela 13 - Porcentagem de pureza radionuclídica de diferentes produções de PSMA-1007-¹⁸F

Sínteses (n)	%PRn calculada	Critério de aceitação*
5	99,9%	99,9%
6	98,9%	
7	99,9%	
8	99,99%	
10	99,99%	

Fonte: autor. *(EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021c)

A purificação realizada pelo cartucho QMA no momento da síntese do PSMA-1007-¹⁸F promoveu a retenção da maior parte dos contaminantes vindos do ciclotron, contribuindo para a pureza radionuclídica observada (KÖHLER *et al.*, 2013).

A síntese 6 apresentou pureza radionuclídica de 98,9%, não atendendo ao critério de aceitação. Uma das possíveis causas foi o baixo rendimento de síntese (25,2%). O problema no software no momento da síntese pode ter ocasionado uma falha na etapa de purificação da água irradiada e com isso ter carregado mais impurezas para o produto final.

Sendo assim, segundo a monografia do PSMA-1007-¹⁸F supracitada, 4 dos 5 lotes produzidos do radiofármaco foram aprovados pois atingiram a pureza radionuclídica mínima de 99,9%. É necessário um estudo mais aprofundado para a detecção dessas impurezas, visto que as energias encontradas nas amostras de PSMA-1007-¹⁸F não correspondem às citadas na literatura. Leituras com tempos mais tardios, por exemplo, de 9 horas após a síntese podem ser uma opção para elucidar as divergências aqui descritas.

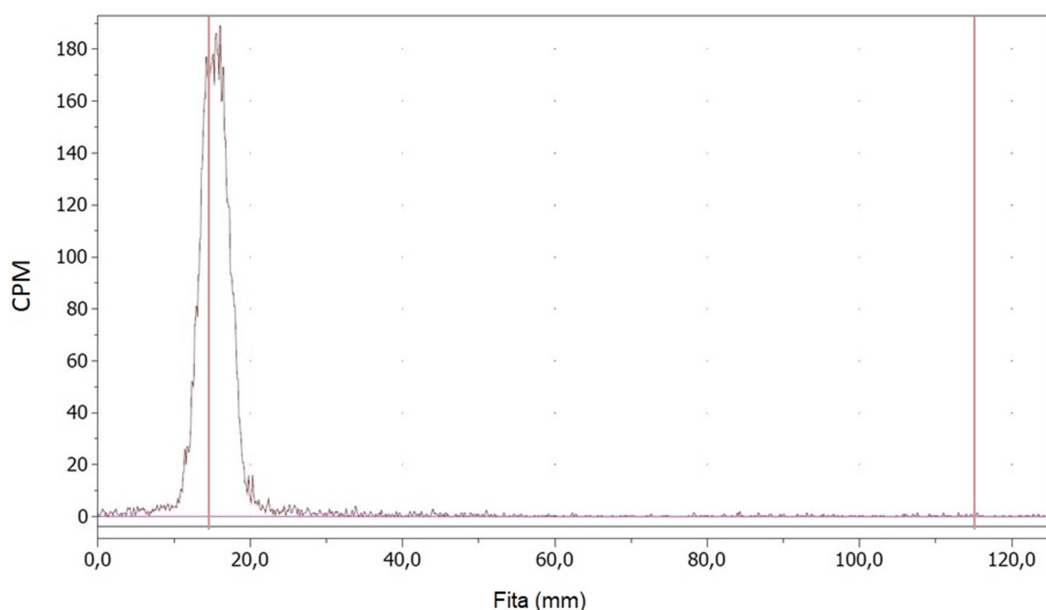
7.2.3 Pureza radioquímica (PR)

Para o estudo de pureza radioquímica do radiofármaco PSMA-1007- ^{18}F , as fitas foram ativadas 30 minutos antes para melhor desempenho da corrida. As propriedades de separação da sílica gel 60 dependem do estado "ativado" do adsorvente, que está relacionado com o teor de água presente na fita. Por isso é recomendado aquecer a placa, tanto de CCD quanto de iCCD, 10-20 minutos à 110 °C antes do uso (DECRISTOFORO *et al.*, 2007).

7.2.3.1 Determinação do perfil cromatográfico do fluoreto- ^{18}F livre por cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCD-SG)

A figura 20 mostra o perfil em radio-CCD do $\text{NaF-}^{18}\text{F}$. As linhas identificadas no cromatograma limitam o ponto de aplicação e a frente do solvente, ficando 15 mm e 115 mm do início da fita, respectivamente.

Figura 20 - Perfil cromatográfico da impureza fluoreto- ^{18}F ($^{18}\text{F}^-$) no sistema CCD empregado para análise de PSMA-1007- ^{18}F



Fonte: Autor

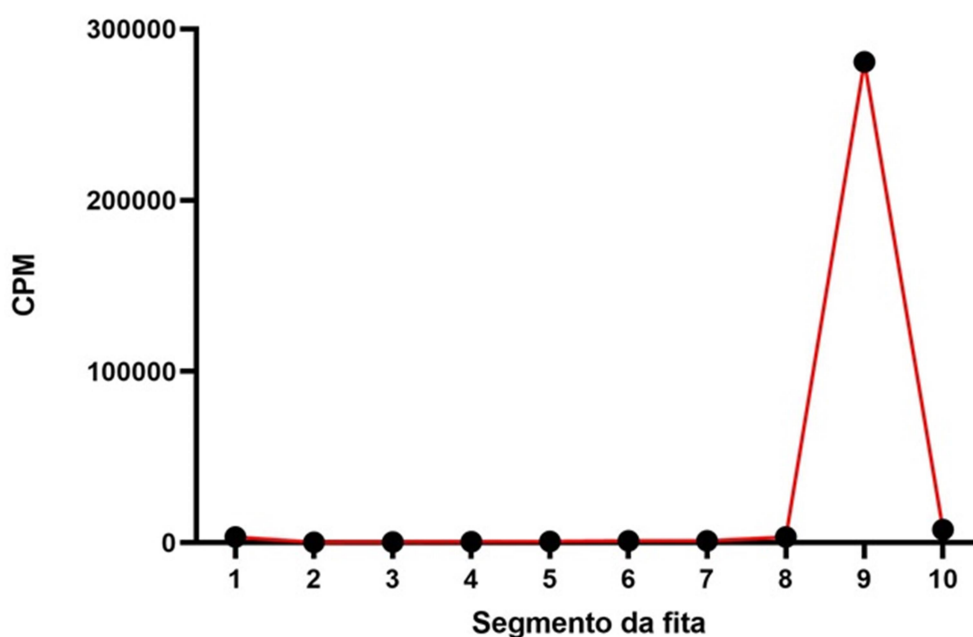
É possível identificar o fator de retenção do fluoreto- ^{18}F ($^{18}\text{F}^-$), visto que a maior concentração das contagens do material radioativo se encontra retida no início da fita, mais especificamente, no ponto de aplicação da amostra, não interagindo com a fase móvel. Sendo assim, é possível afirmar que a impureza fluoreto- ^{18}F ($^{18}\text{F}^-$) possui um R_f de 0,0 - 0,1, que sustenta o critério visto na

monografia do PSMA-1007-¹⁸F de Rf = 0 (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021c).

7.2.3.2 Análise de pureza radioquímica por cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCD-SG) e cromatografia instantânea em camada delgada (iCCD-SG)

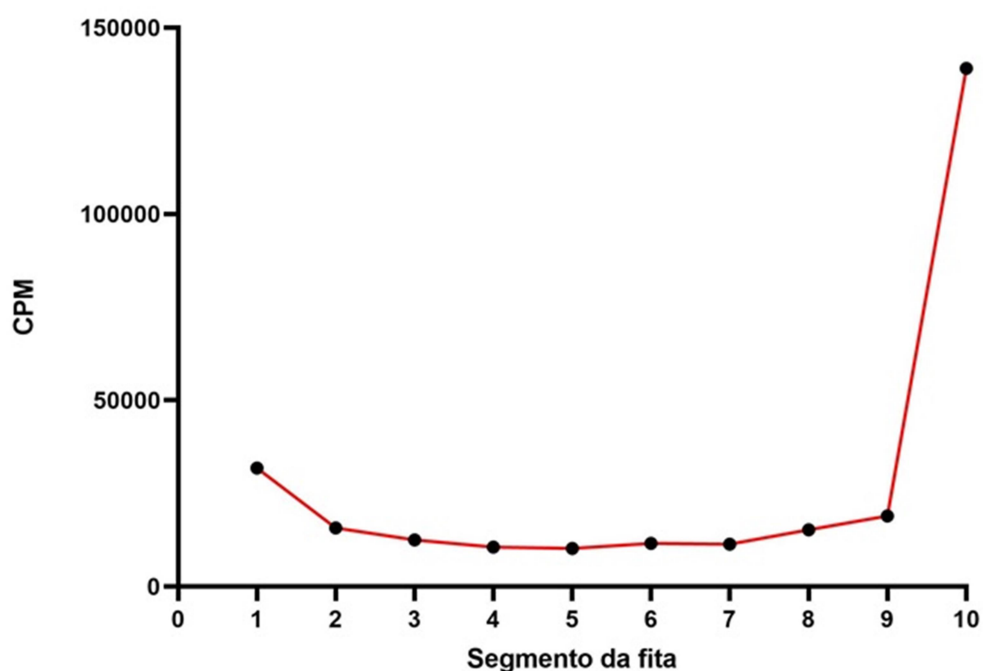
Com o perfil da impureza registrado, foi realizado um estudo comparativo com dois sistemas cromatográficos diferentes, empregando CCD-SG e iCCD-SG, para determinar a melhor condição de trabalho para a avaliação da pureza radioquímica do radiofármaco (figuras 21 e 22).

Figura 21 - Perfil cromatográfico representativo do PSMA-1007-¹⁸F em CCD-SG, empregando acetonitrila:água na proporção 60:40 (V/V) como solvente



Fonte: Autor

Figura 22 - Perfil cromatográfico representativo do PSMA-1007-¹⁸F em iCCD-SG, empregando acetonitrila:água na proporção 60:40 (V/V) como solvente



Segmento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CPM	31796	15752	12562	10642	10230	11582	11410	15217	18932	139074

Fonte: Autor

A diferença entre as duas corridas se baseia na fase estacionária estudada, sendo o material usado na corrida de CCD a sílica gel em fina camada sobre uma base de alumínio, enquanto que na iCCD a sílica gel está impregnada em fibra de vidro que oferece um aumento nas propriedades migratórias do solvente, diminuindo o tempo de corrida sem afetar a separação das impurezas radioquímicas (DECRISTOFORO *et al.*, 2007). No ensaio comparativo, o tempo de corrida para CCD-SG e iCCD-SG foi de 35 minutos e 15 minutos, respectivamente. Esse menor tempo de análise faz com que as fitas de fibra de vidro sejam frequentemente usadas na rotina de controle de qualidade de radiofármacos, mesmo sendo mais cara em relação às placas de CCD-SG.

É possível analisar nas figuras 21 e 22 que, para o mesmo produto, o poder de separação do CCD é superior ao do iCCD, visto que o CCD apresenta uma clara separação entre o radiofármaco de sua impureza

(fluoreto- ^{18}F), sem haver arraste de material na fita ou retenção no ponto de aplicação da amostra, ao contrário do observado no sistema iCCD. Mesmo apresentando um tempo de corrida consideravelmente menor, o iCCD não forneceu a confiabilidade de separação esperada para este tipo de análise, resultando em uma %PR de 88,53%. Enquanto que o CCD ofereceu uma ótima separação e boa resolução do pico, com valor de %PR de 98,85%.

Considerando o princípio de separação da cromatografia de camada delgada, que se baseia na adsorção dos componentes presentes na amostra pela fase estacionária, a interação do PSMA-1007- ^{18}F pelo solvente é maior do que o fluoreto- ^{18}F , visto que ambas as fitas possuem o mesmo material adsorvente (previamente ativado) e apresentam maior contagem proveniente do radiofármaco entre os segmentos 9 e 10. Pelo fato da sílica gel (SiO_2) ser consideravelmente polar, os solutos mais polares interagem mais fortemente com a fase estacionária, se movendo mais lentamente pela fita, enquanto que solutos menos polares se movem mais rapidamente por interagir mais com a fase móvel, ficando mais próximo da frente do solvente como o PSMA-1007- ^{18}F . Ao aumentar a polaridade da fase móvel, os solutos polares podem ser arrastados para mais longe da origem, diminuindo a separação (SANTIAGO; STROBEL, 2013). A proporção de acetoneitrila:água 60:40 (V/V) mostrou-se adequada para separar o radiofármaco da principal impureza.

O CCD-SG foi escolhido para ser usado nos ensaios de %PR para as demais produções de PSMA-1007- ^{18}F por apresentar melhor resolução das espécies envolvidas.

Em contrapartida, o fator de retenção visto tanto na monografia (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021c) quanto na literatura (FESAS et al., 2019) do PSMA-1007- ^{18}F é de cerca de 0,7 e 0,8, respectivamente, enquanto que no presente trabalho o R_f encontrado foi entre 0,9 – 1,0. A temperatura de ativação das fitas, condições de preparo e armazenamento da mistura de solventes e até o fabricante da fase estacionária são fatores que devem ser levados em consideração ao se analisar o R_f encontrado. Além disso, a monografia da Farmacopeia Europeia não estabelece tamanho da fita e

preconiza a corrida de pelo menos 2/3 da mesma (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021c).

7.2.3.3 Identidade do produto e análise da pureza radioquímica do PSMA-1007-¹⁸F por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

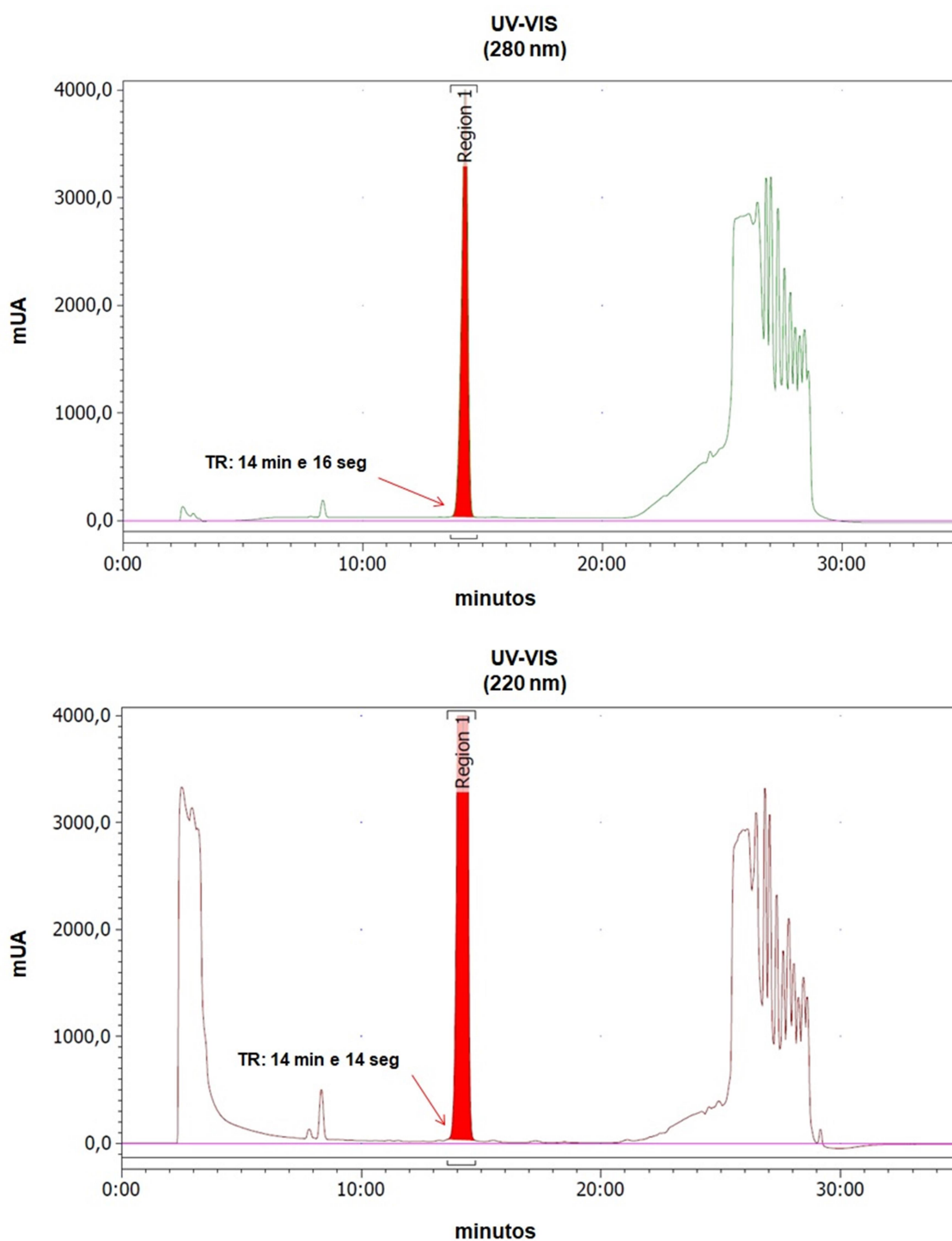
A CLAE utiliza equipamentos que empregam pequenas colunas recheadas com materiais que atuam como fase estacionária, através da qual uma fase móvel é eluída, sob alta pressão, realizando separações e análises quantitativas de compostos em poucos minutos, com uma alta resolução e sensibilidade (COLLINS *et al.*, 2006).

Para a análise de pureza radioquímica por CLAE, consultou-se na literatura disponível algumas metodologias, visto que a monografia do PSMA-1007-¹⁸F não estava disponível no momento deste estudo (CARDINALE *et al.*, 2017b; NAKA *et al.*, 2020; SOEDA *et al.*, 2019). Alguns métodos utilizam um fluxo de até 4mL/min e, considerando que a coluna cromatográfica disponível não suportaria fluxos muito superiores a 1 mL/min, foi selecionado o método descrito no item 6.2.3.2 deste trabalho.

Com a publicação da monografia do radiofármaco, foi feita a comparação entre o método descrito na monografia do PSMA-1007-¹⁸F da Farmacopeia Europeia (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021c) e o método descrito na literatura (CARDINALE *et al.*, 2017a) a fim de analisar o desempenho de ambos na detecção do PSMA-1007-¹⁸F e das impurezas. Os métodos da literatura e da monografia foram intitulados como método 1 e método 2, respectivamente.

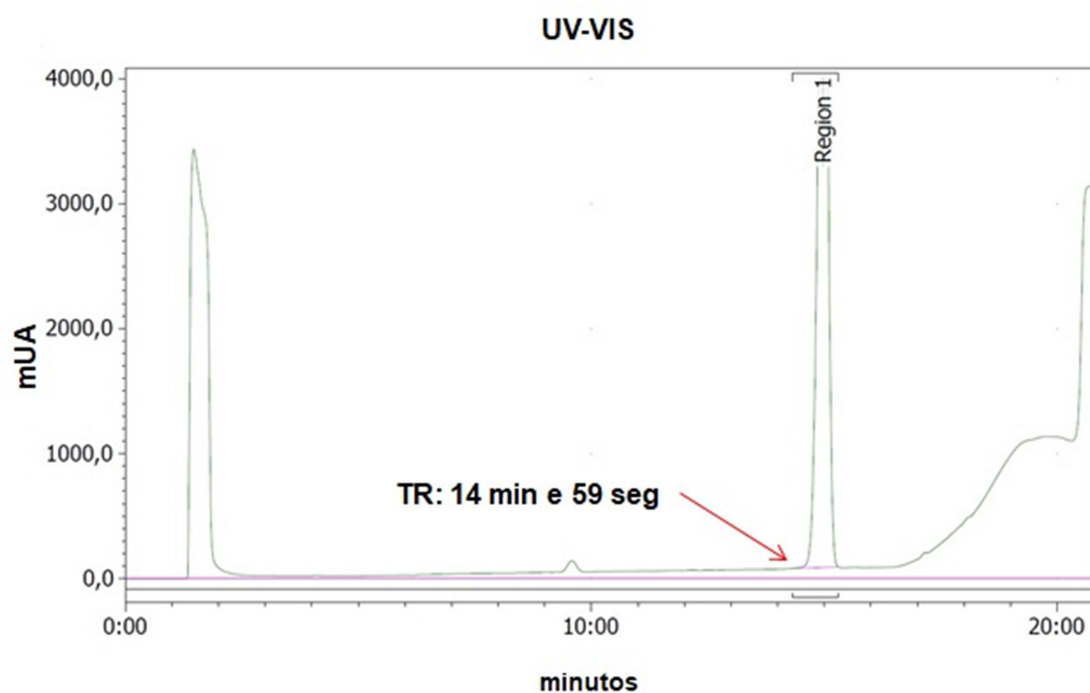
Desta forma, para a realização da análise de pureza radioquímica do produto, foi necessário primeiro a identificação do mesmo em CLAE. Assim, foram realizadas corridas com o padrão de PSMA-1007-F nas mesmas condições de análise de pureza radioquímica previstos na literatura e na monografia da Farmacopeia Europeia, a fim de determinar o RT do pico característico do radiofármaco. Nas figuras 23 e 24, estão os cromatogramas de UV-VIS do PSMA-1007-F nos dois métodos.

Figura 23 - Perfil cromatográfico em CLAE do PSMA-1007-F pelo método 1 proposto em literatura, com concentração 0,5 mg/mL em DMSO. Corrida realizada em coluna de fase reversa C18 (Waters, 250 mm x 4,6 mm, 5 μ m) com fase móvel acetonitrila:0,1% de ácido trifluoroacético, fluxo de 1 mL/min a 26 °C com volume de injeção de 50 μ L. Apresentando perfil UV-VIS nos comprimentos de onda 280 nm e 220 nm



Fonte: Autor

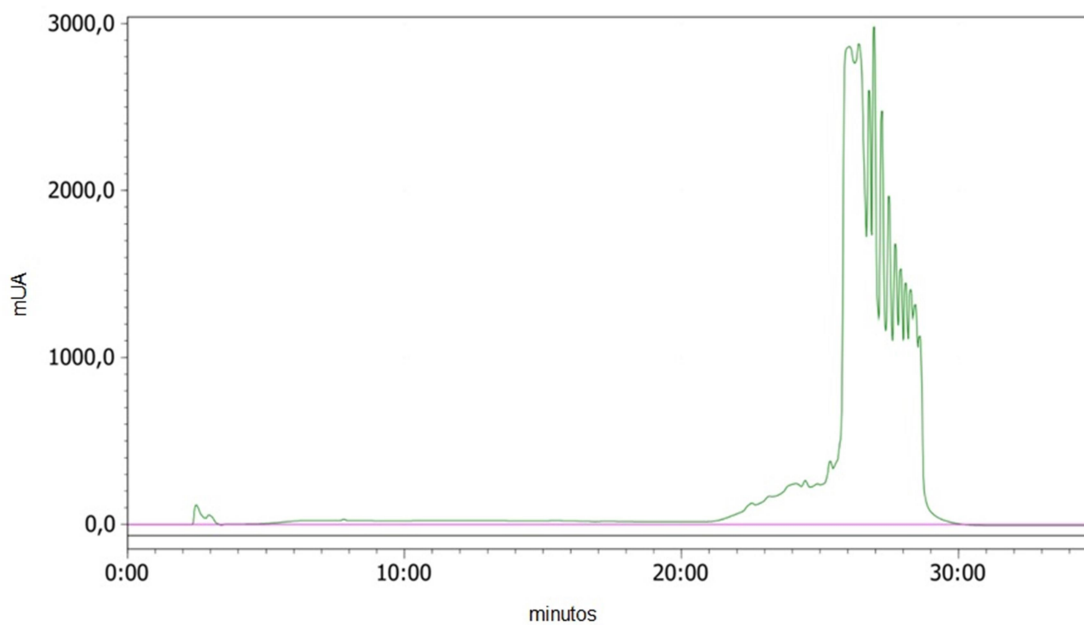
Figura 24 - Perfil cromatográfico em CLAE do PSMA-1007-F pelo método 2 proposto na monografia, com concentração 0,5 mg/mL em DMSO. Corrida realizada em coluna de fase reversa C18 (Shimadzu, 150 mm x 4,6 mm, 5 μ m) com fase móvel tampão fosfato (pH 2,5):acetonitrila, fluxo de 1,3 mL/min a 30 °C com volume de injeção de 20 μ L. Apresentando perfil UV-VIS no comprimento de onda 225 nm



Fonte: Autor

O conjunto de picos observados no espectro UV-VIS, na amostra de PSMA-1007-F do método 1 entre os tempos de 20 a 30 minutos de corrida, correspondem ao DMSO, solvente usado para a diluição do PSMA-1007-F, confirmado por meio da corrida de CLAE sobre as mesmas condições na qual foi aplicado somente o solvente (figura 25).

Figura 25 - Perfil cromatográfico em CLAE do DMSO. Corrida realizada em coluna de fase reversa C18 (Waters, 250 mm x 4,6 mm, 5 μ m) com fase móvel acetonitrila:0,1% de ácido trifluoroacético, fluxo de 1 mL/min a 26 °C com volume de injeção de 50 μ L. Apresentando perfil UV-VIS no comprimento de onda 280 nm



Fonte: Autor

A Farmacopeia Europeia descreve o CLAE em detector UV (225 nm) para identificação de PSMA-1007 (RT = 11 minutos) e substâncias relacionadas, como defluoro-trimetilamonio-PSMA-1007 e defluorohidroxi-PSMA-1007, com retenção relativa com relação ao PSMA-1007 de 0,5 minutos e 0,6 minutos, respectivamente.

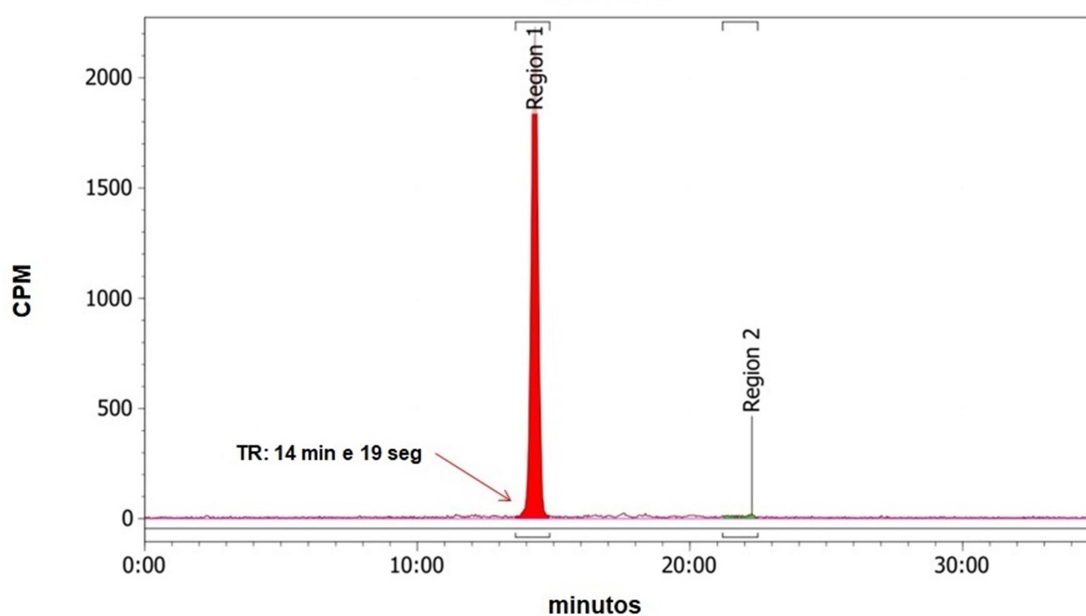
Considerando os cromatogramas de ambos os métodos e as especificações farmacopeicas, não foram observadas as impurezas descritas, e sim outras impurezas desconhecidas no espectro UV-VIS no RT de 1,5 minutos e no cromatograma radioativos nos TR de 15,52 minutos e 16,51 minutos no método 2 e uma impureza no TR de 21,26 minutos no cromatograma radioativo e no RT de 3 minutos no espectro UV-VIS no método 1.

Os picos encontrados destacados nas figuras 23 e 24 foram utilizados para a identificação do produto radioativo nos ensaios de pureza radioquímica,

confirmando o pico de maior proporção nos espectros radioativos nas produções de PSMA-1007- ^{18}F como sendo do radiofármaco.

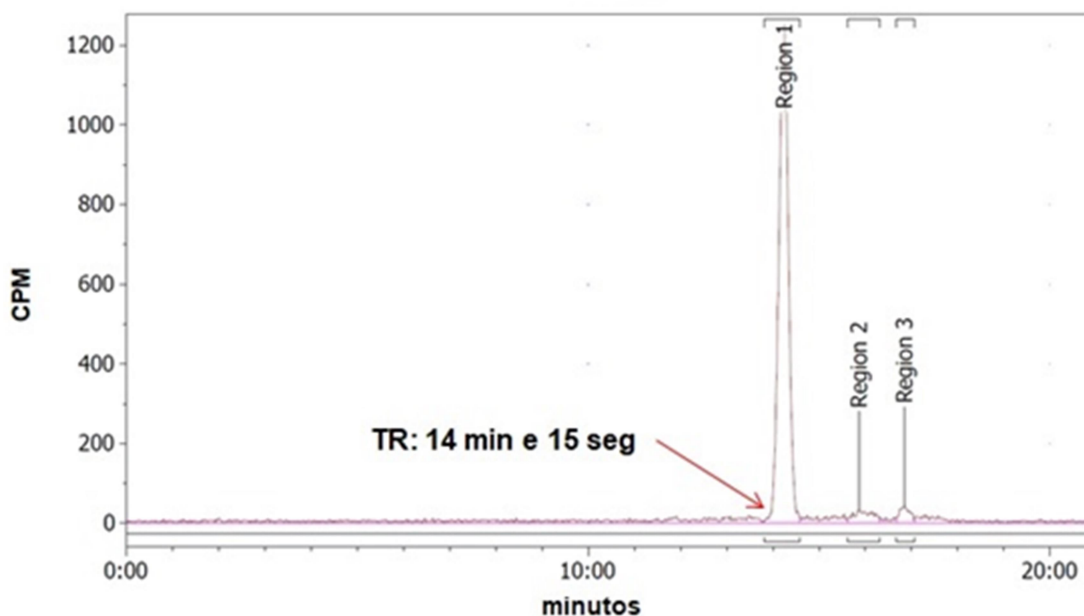
As figuras 26 e 27 mostram o perfil radioativo de amostras de PSMA-1007- ^{18}F em CLAE, onde os picos em maior proporção foram identificados como o produto radiomarcado.

Figura 26 - Perfil cromatográfico em CLAE do PSMA-1007- ^{18}F pelo método 1 proposto em literatura. Corrida realizada em coluna de fase reversa C18 (Waters, 250 mm x 4,6 mm, 5 μm) com fase móvel acetonitrila:0,1% de ácido trifluoroacético, fluxo de 1 mL/min a 26 °C com volume de injeção de 50 μL



Fonte: Autor

Figura 27 - Perfil cromatográfico em CLAE do PSMA-1007-¹⁸F pelo método 2 proposto na monografia. Corrida realizada em coluna de fase reversa C18 (Shimadzu, 150 mm x 4,6 mm, 5µm) com fase móvel tampão fosfato (pH 2,5):acetonitrila, fluxo de 1,3 mL/min a 30 °C com volume de injeção de 20 µL



Fonte: Autor

CARDINALE et al. (2017a) adotaram o método para a identificação do produto PSMA-1007-¹⁸F, no qual a comparação do tempo de retenção entre o pico do padrão de referência e o RT do produto no espectro radioativo é realizada com um limite de tolerância de $\pm 0,5$ minutos de diferença. A monografia do radiofármaco determina a comparação do RT dos picos do padrão (CLAE UV-VIS) e PSMA-1007-¹⁸F, devendo haver similaridade entre os RT (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021c).

Alguns parâmetros divergem entre os métodos avaliados: solvente utilizado, tamanho da coluna, gradiente, fluxo aplicado e volume injetado. Apesar do tempo de análise também ser diferente (35 minutos para o método 1 e 21 minutos para o método 2), o tempo de retenção (RT) do produto PSMA-1007-¹⁸F foi praticamente o mesmo, com valores de 14 min e 19 seg para o método 1 e 14 min e 15 seg para o método 2 (figuras 26 e 27).

Com uma diferença entre os dois picos no método 1 de 0,03 minutos para UV-VIS 280 nm e 0,05 minutos para UV-VIS 220 nm e 0,44 minutos para o método 2, é possível confirmar que se trata do produto PSMA-1007-¹⁸F.

Os pequenos picos radioativos observados no espectro de CLAE do método 1 no tempo de 21 minutos podem ser equivalentes aos relatados por SHAMNI et al. (2019), com impurezas descritas nos tempos de retenção entre 20 e 23 minutos, utilizando as mesmas condições de gradiente e solventes aplicados neste trabalho. Através de algumas modificações no processo de síntese, Shamni conseguiu melhorar a %PR do produto de $87 \pm 8\%$ para $94 \pm 2\%$, diminuindo as impurezas consideravelmente, aumentando a porcentagem de etanol na etapa de purificação. A hipótese é de que essas impurezas sejam resultado de degradação do produto final devido ao elevado tempo de radiomarcagem. Considerando que a produção do PSMA-1007-¹⁸F é feita de maneira automatizada, é de se esperar que o método seja otimizado, com a retenção do máximo de impurezas durante o processo, sejam elas químicas ou radioativas. Com um tempo médio de 1 hora \pm 30 minutos do final da síntese até o início do controle de qualidade, esta hipótese se torna válida para o presente trabalho.

7.2.3.4 Cálculo da porcentagem de pureza radioquímica do PSMA-1007-¹⁸F

As impurezas não identificadas presentes nos espectros de CLAE não impediram que o radiofármaco atendesse ao critério de aceitação farmacopeico para o ensaio de pureza radioquímica, conforme cálculos apresentados na tabela 14.

Tabela 14 - Porcentagem da pureza radioquímica das produções de PSMA-1007-¹⁸F (n=7)

Número de ensaios (n)	Proporção da radioatividade do pico do PSMA-1007- ¹⁸ F em CLAE	média da % flúor-18 livre em CCD-SG (n=3)	%PR	Critério de aceitação (Literatura)*	Critério de aceitação (Monografia)**
1	0,9803	2,7	95,38	≥ 95%	≥91%
2	0,9798	1,25	96,76		
3	0,9776	1,91	95,89		
4	0,9578	2,75	93,02		
5	0,9820	1,77	96,46		
6	0,9804	2,56	95,53		
7	0,9845	1,62	96,86		

Fonte: autor. *(CARDINALE *et al.*, 2017a) / **(EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021c).

A literatura estipula uma porcentagem de PR com mínimo de 95%, pois foi baseada em monografias de radiofármacos marcados com flúor-18, como o FLT-¹⁸F (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021a). Agora, com a publicação da monografia oficial do PSMA-1007-¹⁸F na Farmacopeia Europeia, o limite aceitável é menos restritivo. Considerando os dois critérios de aceitação para o PSMA-1007-¹⁸F, os 7 ensaios atenderam a % mínima de pureza de 91% e 6 dos 7 ensaios atenderam o mínimo de 95%.

O uso da coluna de troca iônica não só permite a recuperação do fluoreto na síntese como também exclui impurezas de íons metálicos e aumenta a reatividade do flúor-18 (JACOBSON; CHEN, 2010). A coluna PS-H⁺, que é um cartucho de troca catiônica, possui uma superfície negativa que retêm o analito positivamente carregado, como moléculas carregadas de TBA⁺ e outras espécies remanescentes. Já o cartucho de extração em fase sólida (do inglês *solid phase extraction* - SPE) C18 tem como função a concentração do analito, retendo-o até sua posterior eluição pelo etanol 30%. Este último cartucho é de extrema importância, pois se mal condicionado, o equilíbrio entre o analito e o sorvente da coluna não é efetivo, não o retendo corretamente no momento da retirada das impurezas orgânicas e acaba por retirar parte do produto (JARDIM, 2010). Todo esse processo de purificação é necessário para um rendimento maior de marcação e pureza radioquímica maior. Uma falha nesses pontos pode acarretar na diminuição de ambas as porcentagens, o que

a torna uma hipótese em potencial, visto que a única produção que alcançou a %PR menor (93,02%) foi a mesma que obteve um rendimento de marcação abaixo do esperado (25,2%).

7.2.4 Pureza química (PQ)

7.2.4.1 Solventes residuais

Foi realizada por cromatografia gasosa (CG) a quantificação de etanol e DMSO em amostras de PSMA-1007-¹⁸F, classificados como solventes residuais do processo de síntese do radiofármaco. As corridas ocorreram em triplicata, onde os picos foram identificados e expressos em partes por milhão (ppm).

A primeira dificuldade na realização deste ensaio foi a não identificação do DMSO no cromatograma. O DMSO é um solvente aprótico apolar que apresenta certas desvantagens, pois possui um ponto de ebulição muito elevado (189 °C) e, como consequência, se torna difícil de se remover depois de qualquer reação ou análise (SOLOMONS; FRYHLE, 2012). Como a temperatura máxima suportada pelo detector é de 300 °C, foi estipulado corridas com uma rampa de aquecimento em até 250 °C sob fluxo constante a uma pressão de 134 Kpa.

No RT esperado de 6,59 minutos para o DMSO foram encontrados muitos picos em pequenas proporções—interferindo na sua quantificação. A solução foi adicionar DMSO na amostra de PSMA-1007-¹⁸F a fim de determinar seu pico característico pelo método de adição, definindo-o com precisão no cromatograma.

Como esperado, o tempo de retenção após o procedimento sofreu modificação, ficando em 6,64 minutos, onde foi necessária a seleção manual do pico do DMSO devido à grande quantidade de picos de impurezas desconhecidas presentes ao redor do pico de interesse. No entanto, foi obtido com sucesso o pico de interesse com alta confiabilidade do RT do DMSO na presença do radiofármaco. A Farmacopeia Europeia classifica o DMSO como solvente de classe 3 por ser menos tóxico e apresentar menor risco para a

saúde humana. Assim, considera-se uma quantidade aceitável de 50 mg por dia ou menos, correspondendo a 5000 ppm ou 0,5 % (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021c).

Com relação à análise de etanol, não ofereceu dificuldade na identificação no cromatograma, ficando no RT esperado de 2,37 minutos. O limite de etanol estipulado pela Farmacopeia Europeia para o FLT-¹⁸F é de 10% V/V (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021a), ou seja, 10.000 ppm, o mesmo da monografia de PSMA-1007-¹⁸F (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021c) e em alguns artigos encontrados na literatura (CARDINALE *et al.*, 2017^a; DI IORIO *et al.*, 2021).

Os valores de etanol e DMSO obtidos em algumas produções de PSMA-1007-¹⁸F se encontram na tabela 15.

Tabela 15 - Concentrações de etanol e DMSO encontradas nas produções de PSMA-1007-¹⁸F e seus respectivos limites de aceitação

Produção (n)	Etanol (ppm)	DMSO (ppm)	Critério de aceitação
1	362.740	396	Etanol: 100.000 ppm (10%) e 2,5 g/administração*
2	255.473	681	
3	765.956	368	
5	266.536	754	
6	72.097	164	
8	218.042	34	DMSO: 5.000 ppm (0,5%) ou 50 mg/dia**
9	418.332	106	

Fonte: autor. *(EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021c) / ** (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021d)

Considerando o critério de aceitação de etanol da monografia do PSMA-1007-¹⁸F, apenas a produção 6 atendeu ao critério de aceitação de 10% (tabela 15). A investigação para a causa deste desvio começou com a análise dos volumes residuais dos frascos de reação usados na produção do radiofármaco. Todos os volumes dos frascos, incluindo do precursor e solução tampão, foram quantificados e ficaram dentro dos limites estipulados pelo fabricante, descartando a hipótese de uso adicional de etanol para a síntese. Em seguida, foi avaliada a programação fornecida pelo fabricante do kit (ABX, Alemanha),

não tendo sido observada discrepância no processo de produção, não havendo necessidade de modificações do documento. Com pesquisa realizada junto ao fabricante do kit, que informou não haver relato de caso semelhante, foi considerada como causa potencial do desvio, a ocorrência de falhas mecânicas do módulo de síntese, podendo ter acarretado em problemas nas etapas de secagem e purificação, uma vez que todas as sínteses com teor elevado de etanol foram realizadas em um mesmo módulo.

Vale ressaltar que a síntese do PSMA-1007-¹⁸F utiliza etanol em várias etapas, sendo que 3 das 6 soluções que constituem o kit de marcação contêm (bolsa de água com 5,5% de etanol) ou são soluções de etanol (etanol 30% e 100%), com o produto sendo eluído da coluna C18 com 4 mL de etanol 30%, o que corresponde a uma concentração de cerca de 63.000 ppm (6,3%) no produto acabado.

Entretanto, é de se considerar que a monografia do PSMA-1007-¹⁸F da Farmacopeia Europeia estabelece não somente como critério de aceitação a concentração máxima de etanol de 10 % V/V, mas também de 2,5 g por dose administrada. Considerando-se a densidade do etanol de 0,790 g/mL e o volume do lote do radiofármaco de 19 mL, foi possível calcular a massa de etanol presente no volume total do lote em cada síntese, e o volume máximo de cada lote que poderia ser administrado para não ultrapassar a massa de 2,5 g por dose (tabela 16). (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021c).

Tabela 16 - Concentrações de etanol nos lotes de PSMA-1007-18F e Volume máximo a ser administrado por dose (V) que não ultrapassa o limite de 2,5 g/dose

Produção (n)	Etanol (ppm)	Massa de etanol no lote (g)	Volume máximo a ser administrado (mL)
1	362.740	5,44	8,72
2	255.473	3,84	12,39
3	765.956	11,50	4,13
5	266.536	4,00	11,87
6	72.097	1,08	>19,0
8	218.042	3,27	14,52
9	418.332	6,28	7,57

O teor de DMSO detectado nas amostras de PSMA-1007-¹⁸F ficou dentro do critério de aceitação (tabela 15), não oferecendo risco toxicológico. O critério de aceitação para DMSO foi obtido do capítulo geral de solventes da Farmacopeia Europeia (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021d), sendo de no máximo 0,5% (5.000 ppm). Neste mesmo capítulo geral, o critério de aceitação para etanol também é de 0,5%. Entretanto, na monografia do produto o critério é menos restritivo (10%), provavelmente por considerar o processo produtivo que envolve purificação com solução de etanol. A quantidade residual de etanol e DMSO foram determinadas por RAHBAR *et al.* (2018a; 2018b), apresentando concentrações de 29,6 – 31,6 mg/mL (29.600 – 31.600 ppm) para etanol e de 0,25 - 0,68 mg/mL (250 – 680 ppm) para DMSO. Neste caso, Rahbar não considerou o teor de etanol previsto na Farmacopeia Europeia (2,5 g/administração).

7.2.4.2 Determinação do tetrabutílamônio - TBA

Através da metodologia escolhida de CCD-SG, foi feita a comparação entre o fator de retenção (Rf) do produto PSMA-1007-¹⁸F com o Rf de soluções referência de TBA. A visualização do Rf foi feita a partir da coloração da mancha correspondente do TBA com vapor de iodo, apresentando uma coloração amarronzada característica logo após o contato com o vapor. O

critério de aceitação adotado foi o grau de intensidade da mancha do padrão de referência de TBA nas fitas, sendo que a mancha correspondente à amostra do PSMA-1007-¹⁸F não deve ser mais intensa que a do padrão de referência.

Como esperado, as manchas dos padrões de TBA em todas as concentrações apresentaram coloração marrom avermelhado, enquanto que o produto apresentou manchas marrom alaranjado. De acordo com CARDINALE *et al.* (2017a), a mancha do padrão de TBA deve apresentar Rf entre 0,2 e 0,3, enquanto que para a amostra do produto PSMA-1007-¹⁸F, se aparecer alguma mancha no mesmo Rf, deve estar em menor intensidade.

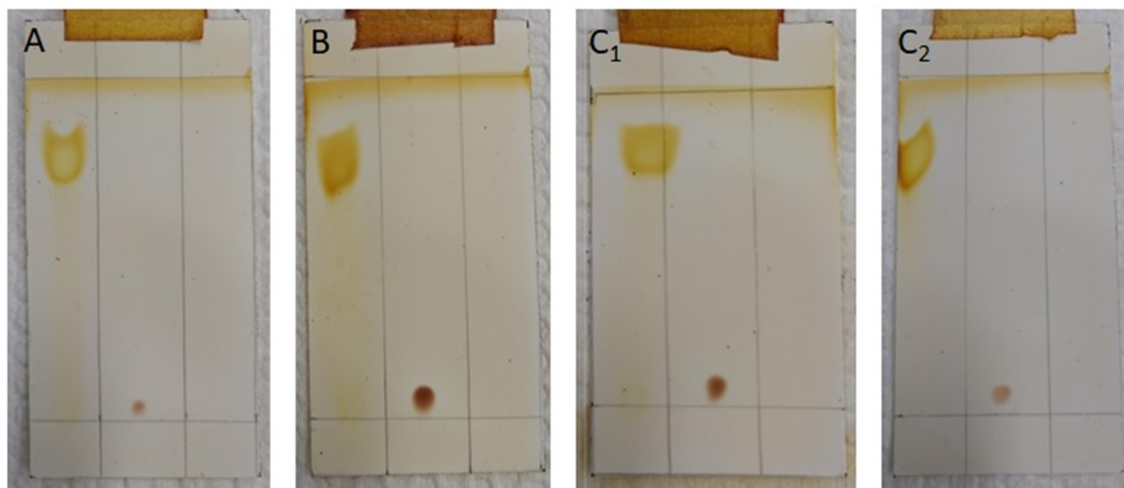
Os resultados encontrados foram semelhantes, com todas as manchas do padrão de TBA no Rf de 0,1, enquanto que nenhuma mancha neste Rf foi encontrada nas amostras de PSMA-1007-¹⁸F. Isso indica que, se há a presença de TBA no produto final, este não é detectado pelo método e está dentro dos padrões estabelecidos pelas concentrações 0,013 mg/mL, 0,1 mg/mL e 0,26 mg/mL, sendo este último o usado como referência para o PSMA-1007-¹⁸F (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021e).

Com relação às concentrações usadas, a que melhor ofereceu visualização da mancha do padrão de TBA foi a de 0,26 mg/mL, concentração usada como referência na Farmacopeia Europeia para o TBA (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021c). Em comparação às demais concentrações estudadas, esta é a que possui maior quantidade de TBA, fazendo-a corar com mais intensidade. Mesmo com limite de aceitação maior e menos restrito, ainda assim permanece aceitável nos padrões de toxicidade, com valor DL₅₀ de 10 mg/Kg (I.V.) quase 4 vezes menor que o do kryptofix (DL₅₀ (I.V.) entre 32–35 mg/kg) (JIANG *et al.*, 2020; MEYER *et al.*, 1995).

A figura 28 mostra as corridas feitas com as fitas de 8,0 X 4,0 cm, comparando as intensidades de cada padrão.

Figura 28 - Comparação entre a intensidade das manchas do padrão de TBA nas fitas de 8,0 X 4,0 cm, volume aplicado de 2µL. Da esquerda para direita em cada fita: PSMA-1007-¹⁸F; padrão de referência de TBA; padrão negativo. (A) Concentração de TBA de 0,013 mg/mL diluído em água; (B) Concentração de

TBA de 0,26 mg/mL diluído em água; (C₁) Concentração de TBA de 0,1 mg/mL diluído em água; (C₂) Concentração de TBA de 0,1 mg/mL diluído em água/etanol



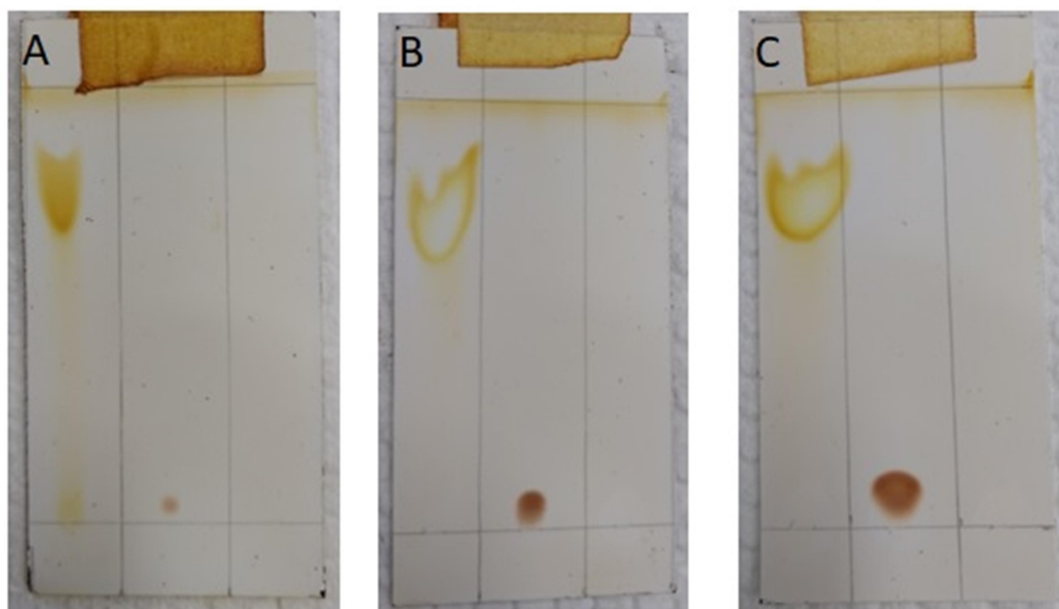
Fonte: Autor

A influência do solvente usado para a diluição do padrão é menos visível, mas comparável. Considerando que a placa de sílica gel é fortemente polar e a presença de etanol na fase móvel afeta mais no fator de retenção do que na própria revelação, a intensidade das manchas não deveriam mudar. Mesmo assim, as manchas identificadas para o padrão diluído em solução água/etanol foram ligeiramente menos intensas que as manchas vistas com o padrão diluído em água (COLLINS *et al.*, 2006). Na figura 28 é possível ver que o fator de retenção do padrão para ambos os solventes permanece o mesmo, provando que a solução de água/etanol usada por Cardinale *et al.* (2017a) também pode ser usada na identificação do TBA. De fato, o preparo do padrão de TBA em mistura etanol:água, na mesma proporção do produto acabado, representa a melhor alternativa para eliminar a interferência do etanol presente no produto acabado na determinação do TBA por meio deste ensaio de CCD.

Diferente do solvente, o volume aplicado para a detecção do TBA influencia diretamente na boa visualização da mancha. Entre os três volumes avaliados, o volume de 2 μ L foi o que apresentou melhor desempenho, tanto na visualização da mancha das amostras quanto na corrida. A figura 29 compara os três volumes lado a lado. As corridas com 1 μ L apresentaram uma coloração do produto radiomarcado bem intensa, mas em relação ao padrão de

referência, a mancha ficou muito pequena, quase imperceptível. Já nas amostras de 5 μL as manchas ficaram grandes demais, interferindo na identificação do Rf e ultrapassando os limites para cada fita. Este volume é normalmente usado para SPOT TEST, não recomendado para CCD-SG por utilizar volume extra desnecessário.

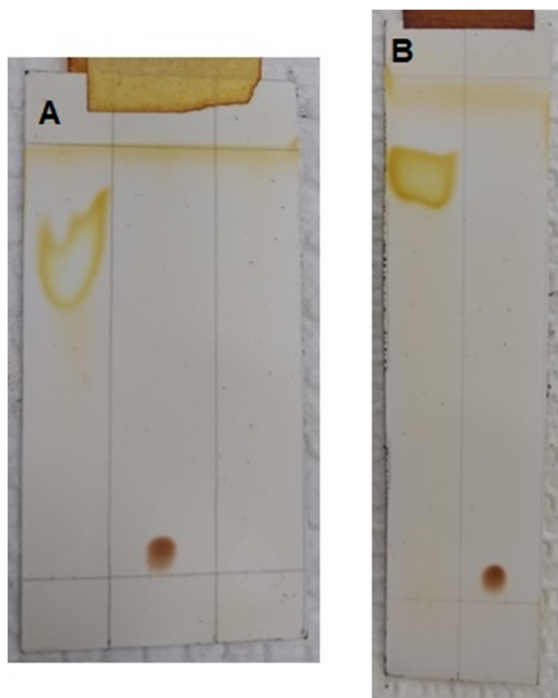
Figura 29 - Comparação entre o volume de aplicação de TBA nas fitas de 4,0 x 8,0cm com solução padrão de TBA com concentração de 0,26 mg/mL. Da esquerda para direita em cada fita: PSMA-1007- ^{18}F ; padrão de referência de TBA; padrão negativo. (A) Volume de aplicação de 1 μL diluído em água; (B) Volume de aplicação de 2 μL diluído em água; (C) Volume de aplicação de 5 μL diluído em água



Fonte: Autor

Considerando o tamanho das fitas analisadas, ambas tiveram boa performance na separação do TBA do produto PSMA-1007- ^{18}F , para identificação e avaliação quantitativa (figura 30). O método se mostrou adequado para este ensaio, com resultados aceitáveis em tempo relativamente curto. Para as fitas de 8,0 cm x 4,0 cm o tempo de corrida foi de 15 minutos, enquanto que para as fitas de 12,5 cm x 3,0 cm foi de 45 minutos. Entre essas opções, a fita de menor tamanho foi a mais indicada para uma análise rápida e eficiente.

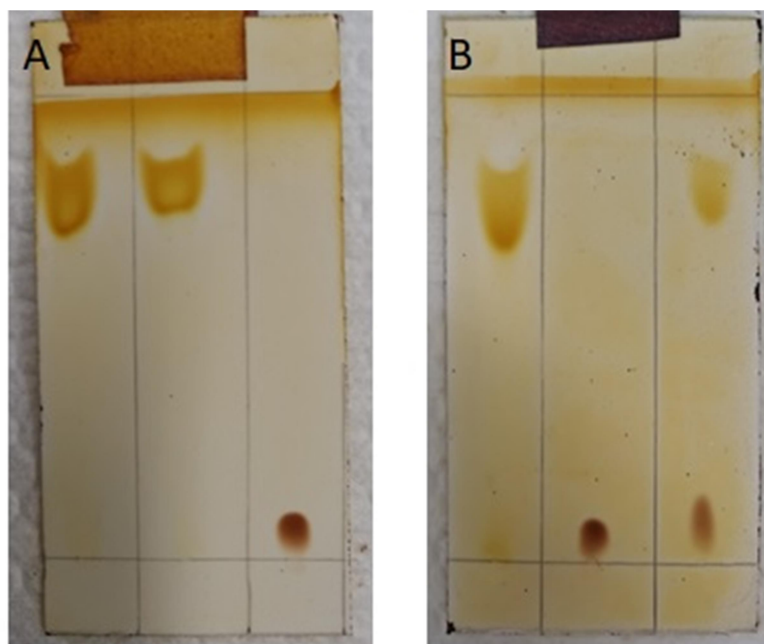
Figura 30 - Comparação entre as fitas de 8,0 cm x 4,0 cm e 12,5 x 3,0 cm com volume aplicado de 2 μ L e solução padrão de TBA com concentração de 0,26 mg/mL diluído em água. (A) Da esquerda para direita: PSMA-1007- 18 F; padrão de referência de TBA, padrão negativo. (B) Da esquerda para direita: PSMA-1007- 18 F; padrão de referência de TBA



Fonte: Autor

Outro ponto que pode ser avaliado neste ensaio é a coloração do próprio produto pelo vapor de iodo nas fitas. Em todas as fitas o produto final foi corado, em alguns casos, de forma mais intensa que o próprio padrão de TBA. Isso é devido à presença do ascorbato de sódio no produto final, que cora na presença de vapor de iodo. A comprovação foi realizada com as corridas somente com o ascorbato, que possui o mesmo R_f e o mesmo grau de coloração que o produto PSMA-1007- 18 F (figura 31, A).

Figura 31 - Fitas de 8,0 x 4,0 cm com volume de aplicação de 2 μ L de concentração de TBA de 0,26 mg/mL diluído em água. (A) Comparação entre os Rf do ascorbato de sódio, PSMA-1007-¹⁸F e o padrão de TBA (da esquerda para direita); (B) Capacidade de separação com ascorbato de sódio e padrão de TBA, e seus respectivos Rf (da esquerda para direita: ascorbato de sódio; padrão de TBA; solução de ascorbato de sódio e TBA 1:1 V/V)



Fonte: Autor

Por esse motivo, o SPOT TEST não é indicado na determinação do TBA em formulações onde há presença de estabilizantes. Falsos positivos e falsos negativos são comuns em SPOT TEST, confirmando a necessidade de um método mais confiável e de baixo custo como o CCD. Como visto na figura 31, B, o CCD consegue determinar a presença de TBA e fazer uma análise semi-quantitativa do mesmo, isolando-o mesmo em preparações com grandes quantidades de TBA (BLEVINS *et al.*, 2019). É possível avaliar a capacidade de separação do método quando combinado o ascorbato de sódio e o padrão de referência de TBA, onde cada composto não interfere no Rf do outro, separando-os sem dificuldade.

7.2.5 Aparência

A monografia indica a aparência da solução de PSMA-1007-¹⁸F como límpida, incolor ou levemente amarelada (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021c). Essa descrição também aparece na literatura para diferentes autores (CARDINALE *et al.*, 2017^a; RAHBAR *et al.*, 2018a; WURZER *et al.*, 2020), indicando ausência de partículas como requisito de medicamento injetável. Todas as produções obtiveram a mesma aparência, mesmo depois de 10 dias após a síntese, ficando com a aparência amarelada conforme o passar dos dias devido ao ascorbato de sódio. O ascorbato de sódio é um sal derivado do ácido ascórbico, amplamente usado em alimentos e fármacos como antioxidante e estabilizante. Soluções de ácido ascórbico são rapidamente oxidadas no ar e em meio alcalino, adquirindo uma coloração amarelada, devendo ficar protegida do ar e da luz (NCBI, [20--]). Como nenhuma das soluções de PSMA-1007-¹⁸F ficaram com a aparência fora do especificado, todas foram aprovadas e utilizadas para os ensaios descritos neste trabalho.

7.2.6 pH

Em todos os lotes produzidos, o pH final da solução foi de $7 \pm 0,5$, considerado aceitável uma vez que atende ao critério do ensaio da monografia oficial, de 4,5 a 8,5. (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021c) e assemelha-se ao pH descrito na literatura (CARDINALE *et al.*, 2017a).

7.2.7 Microbiológico

Após a produção dos lotes de PSMA-1007-¹⁸F e do fracionamento, amostras do radiofármaco foram encaminhadas para a realização do controle de qualidade microbiológico, incluindo os ensaios de esterilidade e endotoxinas bacterianas. Com exceção de uma das produções, para qual os ensaios microbiológicos não foram realizados, todas foram aprovadas no controle de esterilidade, indicando ausência de crescimento microbiano.

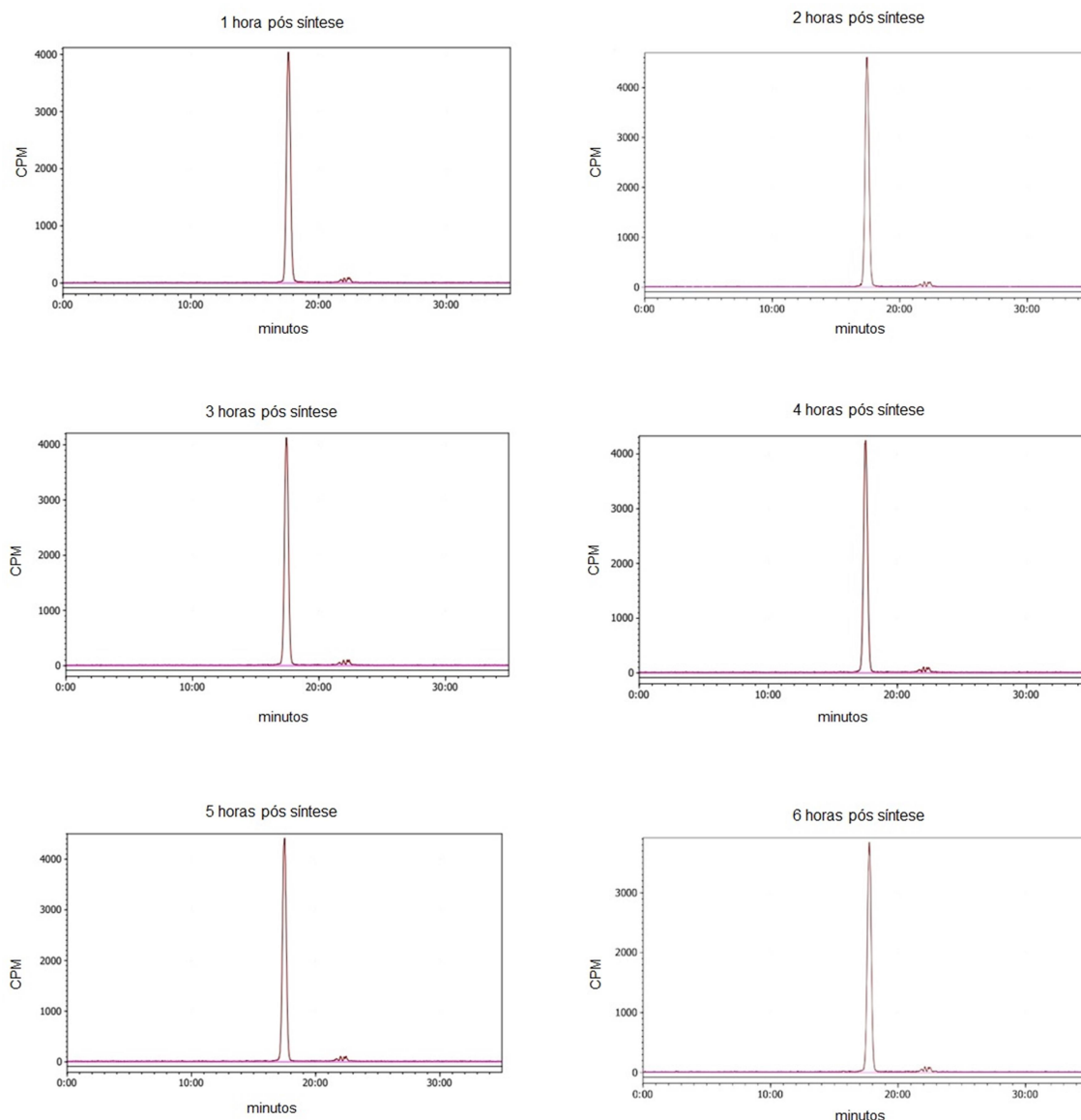
Em relação ao ensaio de endotoxinas bacterianas, todas as produções obtiveram resultados menores do que 12,5 UE/mL, atendendo ao critério de aceitação.

7.3 Estudo de Estabilidade do PSMA-1007-¹⁸F

O estudo de estabilidade do produto PSMA-1007-¹⁸F frente à radiólise foi realizado mediante avaliação da pureza radioquímica por CCD-SG e por CLAE à temperatura ambiente por até 6 horas, empregando amostras com concentração radioativa de 37 MBq/mL (1 mCi/mL). Como critério de aceitação, foi estabelecido pureza radioquímica mínima de 91% em todos os tempos analisados, conforme descrito na monografia oficial (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021c).

A figura 32 apresenta os perfis cromatográficos de CLAE, mostrando a estabilidade do radiofármaco durante o período de 6 horas, não sendo observados produtos de degradação.

Figura 32 - Perfis cromatográficos de CLAE do PSMA-1007-¹⁸F das amostras do estudo de estabilidade de 6 horas após a síntese.



Fonte: Autor

Os resultados da porcentagem do fluoreto-¹⁸F encontrados em CCD-SG e a porcentagem de PSMA-1007-¹⁸F em CLAE do estudo de estabilidade se encontram na tabela 17, a partir dos quais se calculou a %PR nos diferentes tempos. Na figura 33, é possível observar que os valores se mantêm de maneira linear, não tendo uma diminuição considerável de sua %PR. Isso indica estabilidade do produto radiomarcado, não degradando o peptídeo e não havendo dissociação do radionuclídeo através do tempo, atendendo ao critério

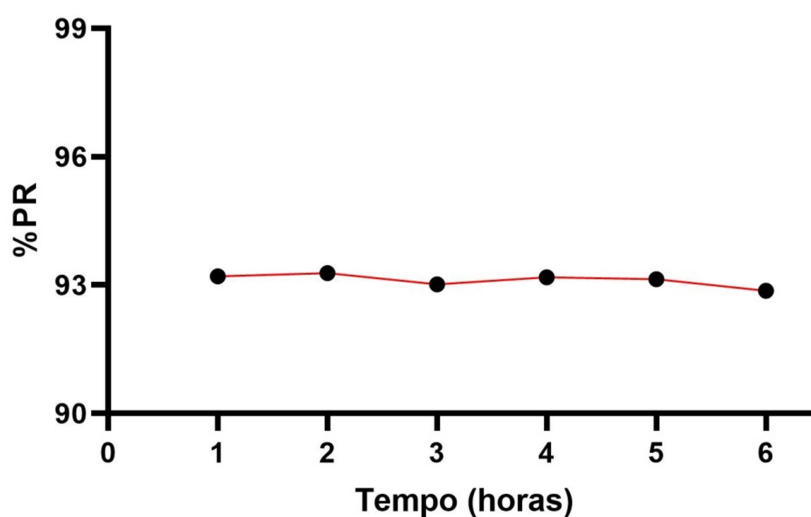
de aceitação estabelecido na monografia oficial (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021c).

Tabela 17 - Estabilidade do produto PSMA-1007-¹⁸F avaliada por CCD-SG e CLAE (%PR) durante o período de 6 horas após a síntese em temperatura ambiente

Método de análise	Porcentagem da espécie radioquímica					
	1 hora	2 horas	3 horas	4 horas	5 horas	6 horas
% média do fluoreto- ¹⁸ F em CCD-SG (n=3)	2,71%	2,77%	2,75%	2,72%	2,68%	3,12%
Proporção da radioatividade do pico do PSMA-1007- ¹⁸ F em CLAE	0,9581	0,9593	0,9565	0,9574	0,9571	0,9586
% Pureza radioquímica	93,21%	93,28%	93,02%	93,18%	93,14%	92,87%

Fonte: Autor

Figura 33 - Estabilidade do produto PSMA-1007-¹⁸F em %PR durante o período de 6 horas após a síntese em temperatura ambiente



Fonte: Autor

A presença do agente estabilizante ascorbato de sódio provavelmente concedeu a estabilidade necessária para o radiofármaco nos tempos

estudados, sustentando sua aplicabilidade para doses tardias em até 6 horas após sua produção. O emprego do ascorbato de sódio como estabilizante é conhecido na literatura e este estudo pode refletir sua ação protetora para formulações farmacêuticas (SHERAZ *et al.*, 2015).

7.4 Determinação do Coeficiente de Partição (Log P) Experimental

Os valores do coeficiente de partição são classificados de acordo com o valor de Log P, calculado a partir da divisão entre o log da fase orgânica com o log da fase aquosa. Se o Log P apresenta um valor positivo, indica que a substância estudada apresenta solubilidade em solventes apolares. Quando a substância apresenta valor negativo de Log P, significa que possui afinidade pela fase aquosa, ou seja, sua solubilidade é maior em solventes polares (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988).

O log de P experimental do PSMA-1007-¹⁸F foi de $-2,68 \pm 0,09$ (n=3), indicando um caráter hidrofílico do radiofármaco. Este valor negativo representa afinidade pela fase aquosa, provavelmente atribuída à presença dos aminoácidos hidrofílicos em sua estrutura, podendo levar a um rápido clareamento sanguíneo *in vivo* (CARDINALE *et al.*, 2020).

Ao comparar o Log P experimental a outros compostos da mesma família de inibidores de PSMA, o valor encontrado para o PSMA-1007-¹⁸F apresenta o menor Log P experimental, ou seja, o valor mais negativo. LEE *et al.* (2020), ao desenvolver um novo ligante de PSMA marcado com flúor-18, comparou a lipofilicidade de nove compostos diferentes, no qual um deles apresentou um valor de coeficiente de partição prático de -2,25, bem próximo ao valor de Log P do DCPyL-¹⁸F de -2,23.

Em contrapartida, ao comparar o valor do Log P do PSMA-1007-¹⁸F encontrado na literatura, o valor experimental é significativamente menor. Enquanto que o valor encontrado foi de -2,68, o valor encontrado por outros autores foi de -1,6 (ROBU *et al.*, 2018). Em estudos *in vivo*, foi demonstrado um caráter menos hidrofílico pelo PSMA-1007-¹⁸F, o que corrobora o valor encontrado na literatura de -1,6 (WITKOWSKA-PATENA *et al.*, 2019; GIESEL *et al.*, 2018b).

Apesar da diferença entre os valores, ambos apresentam valores negativos, indicando hidrofiliicidade. A comprovação de seu caráter hidrofílico só será fundamentada através de ensaios pré-clínicos, pois é possível que o PSMA-1007-¹⁸F tenha comportamentos diferentes *in vivo* devido aos grupos funcionais presentes em sua composição. O estudo do radiofármaco em animais relatado nos próximos tópicos fundamentará esta hipótese do presente ensaio.

7.5 Ensaio Pré-Clínicos

7.5.1 Ensaios *in vitro*

7.5.1.1 Ensaio de competição

O estudo *in vitro* de competição envolve ensaios que caracterizam as propriedades de reconhecimento do ligante pelo local de ligação, determinando sua especificidade farmacológica. Os estudos de competição podem substituir os estudos de ligação de saturação nos casos em que o platô da curva de saturação não é viável ou por razões econômicas, onde os radioligantes são muito caros e acabam inviabilizando o ensaio. Por este motivo, o presente estudo foi realizado pelo método de ligação de competição homóloga, baseado na afinidade que o radioligante e seu competidor não marcado possuem pelo receptor (HEIN *et al.*, 2005).

A concentração usada do agente competidor PSMA-1007-F para definir a ligação não específica foi alta o suficiente para ocupar os receptores de interesse das células LNCap, cerca de 1000 vezes a quantidade do PSMA-11-⁶⁸Ga, de acordo com a literatura (HEIN *et al.*, 2005).

O ensaio de competição demonstrou um bloqueio efetivo do radiofármaco PSMA-11-⁶⁸Ga pelo PSMA-1007-F nas células *in vitro*, mesmo com baixa atividade de marcação de 27,68 MBq/mL (748 µCi/mL). Analisando os dados com e sem a presença do agente competidor, houve uma diminuição nas contagens do produto PSMA-11-⁶⁸Ga ligado de 31,88%, que comprova a afinidade e especificidade do PSMA-1007-F pelas células PSMA+.

Analisando as propriedades estruturais dos dois radiofármacos, a presença de anéis aromáticos nos ligantes do PSMA-1007 oferece um melhor direcionamento para os inibidores de PSMA, o que não é visto na composição do PSMA-11. Tal fato foi observado por BENEŠOVÁ *et al.* (2016) ao estudarem modificações em ligantes de inibidores de PSMA, para os quais a ausência de porções aromáticas na estrutura do peptídeo resulta na redução significativa da potência de inibição de PSMA e em sua Internalização em células LNCaP.

7.5.1.2 Ensaio de internalização

O ensaio de Internalização foi realizado com o PSMA-1007-¹⁸F e após o processamento das células, os resultados foram expressos em porcentagem. Para a avaliação dos resultados, foi feito um levantamento dos dados existentes na literatura, de porcentagens de ligação superficial e de internalização, para o produto PSMA-1007-¹⁸F.

A captação celular específica do PSMA-1007-¹⁸F encontrada foi de 0,261% da atividade aplicada/ 10^5 células para internalização e 0,318% atividade aplicada/ 10^5 células para ligação na superfície, bem próximo dos valores encontrados na literatura para este radiofármaco de 0,240% e 0,580 % da atividade aplicada/ 10^5 células de internalização e ligação superficial, respectivamente (CARDINALE *et al.*, 2020). Vale salientar de que esses valores não podem ser usados como referência direta para este ensaio, pois o método utilizado neste trabalho não é idêntico ao descrito por esses autores. CARDINALE *et al.* (2017b) usaram um único método em trabalhos publicados e ainda sim foram relatados resultados bem diferentes, demonstrando variação na internalização pelo peptídeo ($5,01 \pm 2,70\%$ e $2,14 \pm 0,64\%$ da atividade aplicada/ 10^5 células para internalização e para ligação na superfície, respectivamente).

Em comparação com outros inibidores da mesma família à base de ureia marcados com flúor-18, o PSMA-1007-¹⁸F apresenta porcentagem de internalização menor, semelhante à porcentagem de internalização observadas para o DCPyl-¹⁸F, conforme demonstrado em outros estudos (ROBU *et al.*, 2018; WURZER *et al.*, 2020).

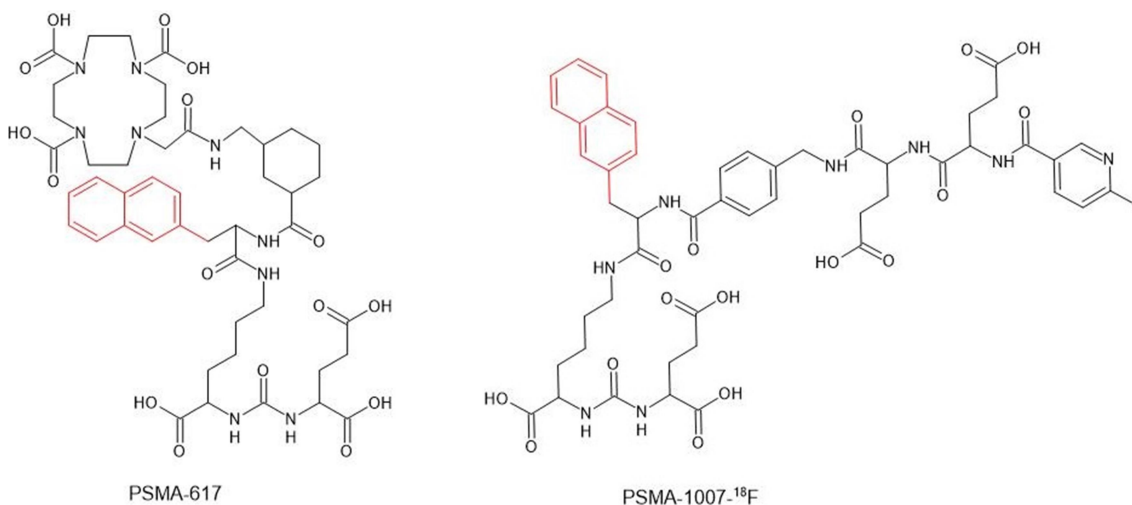
A porcentagem de internalização (atividade internalizada/atividade de ligação total) encontrada para o PSMA-1007-¹⁸F foi de $44,98 \pm 3,37\%$. Na literatura, a porcentagem de internalização descrita para este radiofármaco foi de $67\% \pm 13\%$ (CARDINALE *et al.*, 2020) e $68,9 \pm 4,8\%$, (CARDINALE *et al.*, 2017b), enquanto que para o PSMA-617-¹⁷⁷Lu foram encontrados valores desde 6-7% (MÜLLER *et al.*, 2019) até $40,1 \pm 4,0\%$ (WANG *et al.*, 2018).

Levando em consideração todos os dados levantados, é possível afirmar de que o produto PSMA-1007-¹⁸F demonstrou ligação específica ao receptor PSMA. Comparado com seu peptídeo precursor PSMA-617, possui porcentagem de internalização mais elevada e, conseqüentemente, maior interação pelas células PSMA+. A hipótese que explica esse comportamento está na presença do agente quelante e dos grupos funcionais dos ligantes, que influenciam diretamente na afinidade do peptídeo com o receptor PSMA (OKARVI, 2019).

A molécula de PSMA consiste em dois subsítios presentes dentro da porção enzimática do receptor que carrega características lipofílicas. Este sítio é o alvo clássico dos inibidores de PSMA à base de ureia, sendo que os grupos carboxílicos interagem com esse sítio ativo (EDER *et al.*, 2014). Assim, para uma captação e internalização eficiente do radiotraçador, a presença de um grupo funcional que fortaleça essa ligação é essencial.

No caso do PSMA-1007 e do PSMA-617, ambos possuem o grupo β -naftil que aumenta a interação com o receptor do PSMA e, assim, acaba melhorando a captação e internalização. Este grupo funcional pode ser visto na figura 34 (BENEŠOVÁ *et al.*, 2015).

Figura 34 - Comparação entre as estruturas do PSMA-1007-¹⁸F e do PSMA-617, destacando o grupo β-naftil presente em ambos



Fonte: Autor

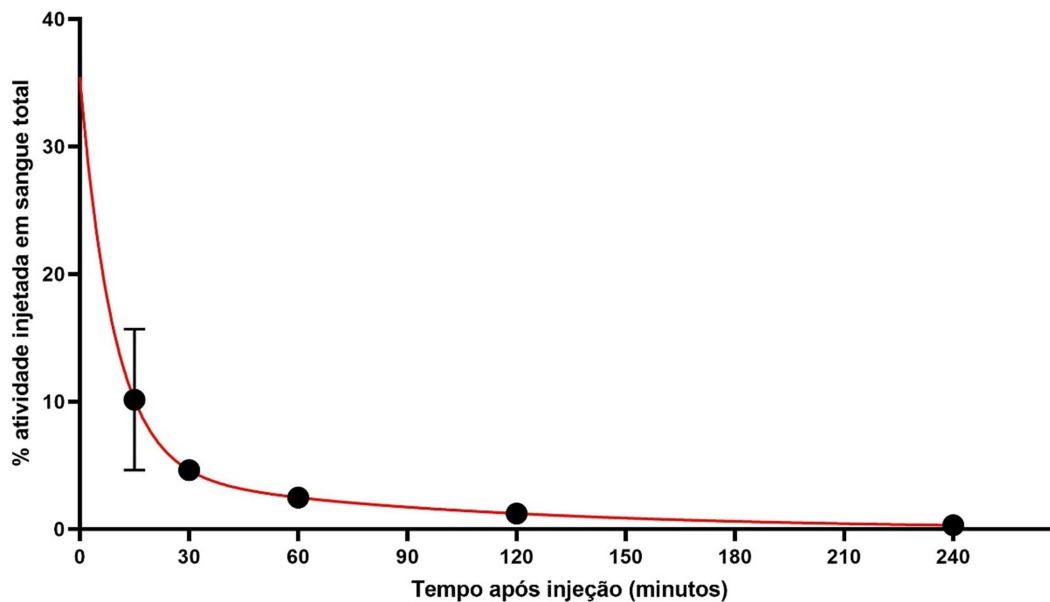
7.5.2 Ensaios *in vivo*

7.5.2.1 Estudos farmacocinéticos em camundongos BALB/c sadios

Para realizar a caracterização do radiofármaco *in vivo*, alguns parâmetros da farmacocinética foram mensurados, como a depuração (ou clareamento sanguíneo), que mede a capacidade do corpo de eliminá-lo; volume de distribuição (Vd), que mede o volume aparente do radiofármaco no organismo; e o tempo de meia-vida biológico, que mede o tempo que leva para um composto diminuir pela metade a sua concentração inicial no fluido ou tecido analisado. A estimativa desses valores envolve a determinação da concentração no sangue ou no plasma do radiofármaco através do tempo após sua administração (FAN; DE LANNOY, 2014).

Por meio das contagens por minuto de amostras de sangue em animais sadios, foi possível mensurar os parâmetros farmacocinéticos do PSMA-1007-¹⁸F supracitados e obter a curva de clareamento sanguíneo, que simula os processos de distribuição e eliminação do radiofármaco (figura 35).

Figura 35 - Curva de clareamento sanguíneo do PSMA-1007-¹⁸F em camundongos machos saudáveis (n=4)



Fonte: Autor

A curva de clareamento sanguíneo da figura 35 foi decomposta em um modelo bicompartimental, para determinação das componentes de distribuição (α) e de eliminação (β) do PSMA-1007-¹⁸F (tabela 18) (STORPIRTIS *et al.*, 2011). Ao interpretá-la, é possível identificar um clareamento sanguíneo praticamente completo em 120 minutos. Em estudos clínicos com o PSMA-1007-¹⁸F, é recomendado que imagens PET/CT sejam realizadas nos tempo de 2 horas pós-injeção, quando a concentração do radiofármaco na corrente sanguínea é baixa, melhorando a definição de lesões (RAHBAR *et al.*, 2018a; 2018b; GIESEL *et al.*, 2018a).

O tempo de meia de distribuição ($T_{1/2} \alpha$) encontrado foi de 7,83 minutos e o tempo de meia vida de eliminação ($T_{1/2} \beta$) de 44,01 minutos. A fase de distribuição e de depuração do PSMA-1007-¹⁸F resultaram no valor de clareamento sanguíneo de 0,483 mL/min que provavelmente se dá pela afinidade do radiofármaco com as proteínas plasmáticas do sangue (IOPPOLO *et al.*, 2020; ROBU *et al.*, 2018). Fazendo um paralelo com os estudos realizados pelo grupo de pesquisa do Centro de Radiofarmácia com PSMA-617-¹⁷⁷Lu, o radiofármaco apresenta parâmetros farmacocinéticos semelhantes

com valor alto de clareamento sanguíneo e volume de distribuição (tabela 18). Isso sustenta a ideia de ambos atuarem como agentes teranósticos por possuírem propriedades semelhantes *in vivo* (GIESEL *et al.*, 2016).

Em contrapartida, comparado com o PSMA-11-⁶⁸Ga, o PSMA-1007-¹⁸F possui farmacocinética mais lenta (tabela 18), conforme demonstrado clinicamente por RAHBAR *et al.* (2018a) que recomendam aquisição de imagem PET/CT tardia devido à farmacocinética lenta do PSMA-1007-¹⁸F em comparação ao PSMA-11-⁶⁸Ga.

Tabela 18 - Comparação entre os parâmetros farmacocinéticos de radiofármacos baseados em inibidores de PSMA em camundongos BALB/c machos sadios

Parâmetro farmacocinético	PSMA-1007- ¹⁸ F	PSMA-617- ¹⁷⁷ Lu com carregador*	PSMA-HBED-CC- ⁶⁸ Ga**
α	0,089 min ⁻¹	0,31 min ⁻¹	~2,915 min ⁻¹
β	0,016 min ⁻¹	0,039 min ⁻¹	0,02857 min ⁻¹
$T_{1/2} \alpha$	7,83 min	2,21 min	~0,2378 min
$T_{1/2} \beta$	44,01 min	17,74 min	24,26 min
CL ¹	0,483 mL/min	0,46 mL/min	0,061 mL/min
Vd ²	30,67 mL	11,79 mL	2,14 mL

¹: Clareamento sanguíneo; ²: Volume de distribuição; *: (WIECZOREK VILLAS BOAS, 2020); **: (VIVALDINI, 2020).

Fonte: Autor

7.5.2.2 Estudos de biodistribuição em camundongos BALB/c sadios

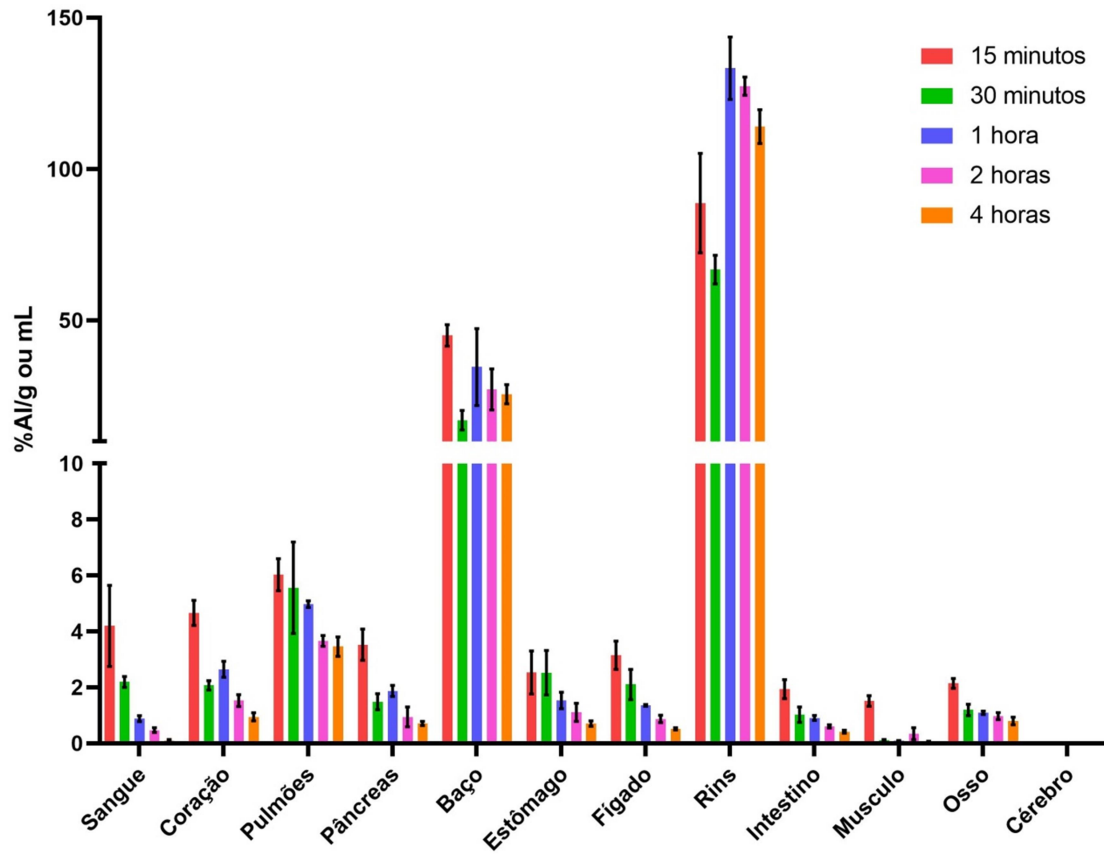
Os resultados do estudo de biodistribuição do PSMA-1007-¹⁸F em camundongos BALB/c sadios são apresentados nas tabelas 19 e 20. Os valores das médias de CPM registradas de cada órgão foram convertidos em porcentagem de atividade injetada (%AI) e porcentagem de atividade injetada por grama do órgão/tecido ou em mL de sangue (%AI/g ou mL) por meio do software Microsoft Excel 2010. A representação gráfica dos resultados foi realizada no software GraphPad Prism 8.0.2 (figura 36 e 37).

Tabela 19 - Biodistribuição do PSMA-1007-¹⁸F (5,55 MBq; administração intravenosa) em camundongos BALB/c machos saudáveis, expressa em %AI/g ou mL (n=4)

Órgão/tecido	%AI/g ou mL ± Desvio Padrão				
	15 minutos	30 minutos	1 hora	2 horas	4 horas
Sangue	4,20 ± 2,05	2,2 ± 0,39	0,88 ± 0,22	0,47 ± 0,17	0,1 ± 0,08
Coração	4,66 ± 0,8	2,07 ± 0,33	2,65 ± 0,57	1,53 ± 0,42	0,94 ± 0,29
Pulmão	6,03 ± 1	5,56 ± 2,84	4,97 ± 0,24	3,66 ± 0,39	3,46 ± 0,69
Pâncreas	3,52 ± 1,12	1,49 ± 0,57	1,88 ± 0,39	0,95 ± 0,71	0,71 ± 0,13
Baço	45,06 ± 7,07	17,02 ± 6,42	34,59 ± 21,96	27,19 ± 13,48	25,6 ± 6,29
Estômago	2,54 ± 1,53	2,53 ± 1,37	1,54 ± 0,51	1,18 ± 0,65	0,71 ± 0,19
Fígado	3,15 ± 0,87	2,11 ± 1,08	1,36 ± 0,06	0,87 ± 0,26	0,52 ± 0,08
Rins	88,76 ± 32,83	66,8 ± 9,47	133,33 ± 20,64	127,43 ± 6,01	114,02 ± 9,71
Intestino	1,94 ± 0,67	1,03 ± 0,55	0,91 ± 0,18	0,60 ± 0,12	0,42 ± 0,11
Músculo	1,52 ± 0,32	0,11 ± 0,04	0,09 ± 0,01	0,35 ± 0,43	0,07 ± 0,02
Ossos	2,12 ± 0,31	1,19 ± 0,41	1,09 ± 0,12	0,98 ± 0,26	0,8 ± 0,27
Cérebro	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00

Fonte: Autor

Figura 36 - Biodistribuição do PSMA-1007-¹⁸F (5,55 MBq, administração intravenosa) em camundongos BALB/c machos saudáveis expressa em %AI/g ou mL (n=4)



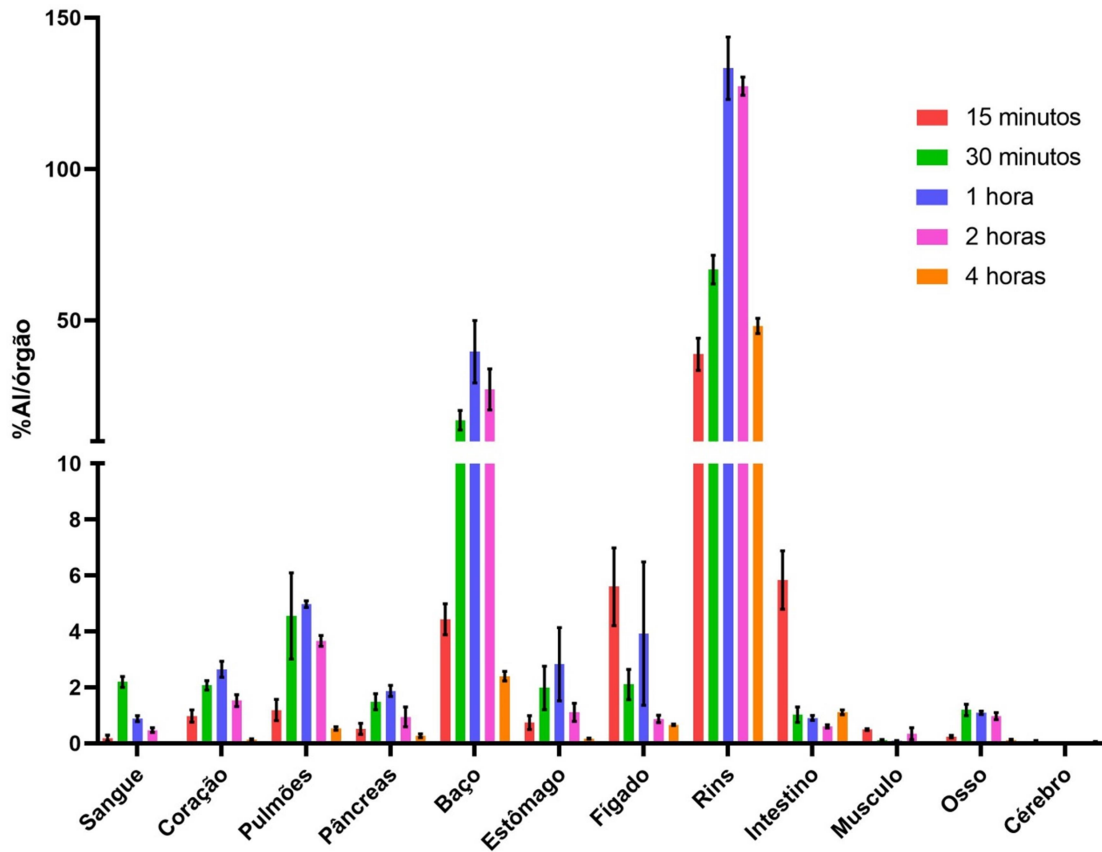
Fonte: Autor

Tabela 20 - Biodistribuição do PSMA-1007-¹⁸F (5,55 MBq; administração intravenosa) em camundongos BALB/c machos sadios, expressa em %AI/órgão (n=4)

Órgão/tecido	%AI/órgão ± Desvio Padrão				
	15 minutos	30 minutos	1 hora	2 horas	4 horas
Sangue	0,18 ± 0,22	2,20 ± 0,39	0,88 ± 0,22	0,47 ± 0,17	0,02 ± 0,01
Coração	0,98 ± 0,43	2,07 ± 0,33	2,65 ± 0,57	1,53 ± 0,42	0,14 ± 0,05
Pulmão	1,19 ± 0,76	4,55 ± 3,08	4,97 ± 0,24	3,66 ± 0,39	0,53 ± 0,12
Pâncreas	0,52 ± 0,40	1,49 ± 0,57	1,88 ± 0,39	0,95 ± 0,71	0,27 ± 0,13
Baço	4,436 ± 1,10	17,02 ± 6,42	39,66 ± 20,60	27,19 ± 13,48	2,40 ± 0,34
Estômago	0,74 ± 0,49	1,98 ± 1,56	2,83 ± 2,62	1,11 ± 0,65	0,17 ± 0,03
Fígado	5,6 ± 2,78	2,11 ± 1,08	3,92 ± 5,12	0,87 ± 0,26	0,66 ± 0,06
Rins	38,82 ± 10,62	66,80 ± 9,47	133,33 ± 20,64	127,42 ± 6,01	48,20 ± 5,03
Intestino	5,84 ± 2,09	1,03 ± 0,55	0,91 ± 0,18	0,60 ± 0,12	1,11 ± 0,18
Músculo	0,49 ± 0,07	0,11 ± 0,04	0,10 ± 0,01	0,35 ± 0,43	0,02 ± 0,00
Osso	0,24 ± 0,09	1,19 ± 0,41	1,09 ± 0,12	0,98 ± 0,26	0,12 ± 0,04
Cérebro	0,08 ± 0,05	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,05 ± 0,02

Fonte: Autor

Figura 37 - Biodistribuição do PSMA-1007-¹⁸F (5,55 MBq, administração intravenosa) em camundongos BALB/c machos sadios expressa em %AI/órgão (n=4)



Fonte: Autor

A maioria dos órgãos analisados apresentou baixa captação do radiofármaco em todos os tempos analisados, com exceção do baço e dos rins. A captação elevada do PSMA-1007-¹⁸F nesses órgãos é corroborada em trabalhos publicados (ROBU *et al.*, 2018). Outros radiofármacos inibidores de PSMA também apresentam captação elevada nesses órgãos, como o PSMA-617-¹⁷⁷Lu (UMBRICHT *et al.*, 2017) e PSMA-11-⁶⁸Ga/¹⁸F (PIRON *et al.*, 2020), pois são órgãos que expressam PSMA e conseqüentemente apresentam captação maior de radiofármacos inibidores dessa glicoproteína. Um ponto que deve ser ressaltado é que o PSMA-1007-¹⁸F apresenta uma eliminação primária hepatobiliar, ou seja, pouco do radiofármaco é excretado pelo trato urinário, característica dos inibidores de PSMA. Essa característica apresenta uma vantagem sobre os demais radiofármacos, por fornecer uma visão mais

definida das lesões locais na próstata em exames PET, dando mais confiança no diagnóstico clínico de câncer de próstata ou mesmo de metástases locais (RAHBAR *et al.*, 2018a).

A partir do tempo de uma hora, o PSMA-1007-¹⁸F apresenta o decaimento radioativo biológico, demonstrando o comportamento de eliminação, sustentando os resultados encontrados no estudo de farmacocinética de que o produto exibiria uma distribuição retardada (P=0,04 para 1h e 2h e P=0,240 para 2h e 4h). ROBU *et al.* (2018) encontraram as mesmas características de farmacocinética mais lenta e com captação alta no baço, rins e glândulas adrenais 2 horas após a injeção.

7.5.2.3 Estudos de biodistribuição em camundongos SCID com modelo tumoral LNCaP

Segundo FAGUNDES e TAHA (2004), o camundongo é o animal de está mais associado a modelos de doença que o rato. O camundongo SCID apresenta um gene mutante autossômico, situado no cromossomo 16, tendo ausência de imunidade das células B e T assemelhando-se à síndrome de imunodeficiência combinada severa (do inglês *Severe Combined Immunodeficient* - SCID) em crianças humanas. Suas células esplênicas não respondem a estímulos de mitose para células T ou B e, por essa razão, não rejeitam transplantes e provavelmente tumores xenográficos. Esses animais, portanto, tornam-se ótimos candidatos a modelo para câncer de próstata, evitando a rejeição das células cancerígenas e assegurando o desenvolvimento dos tumores (SILVA, 2017).

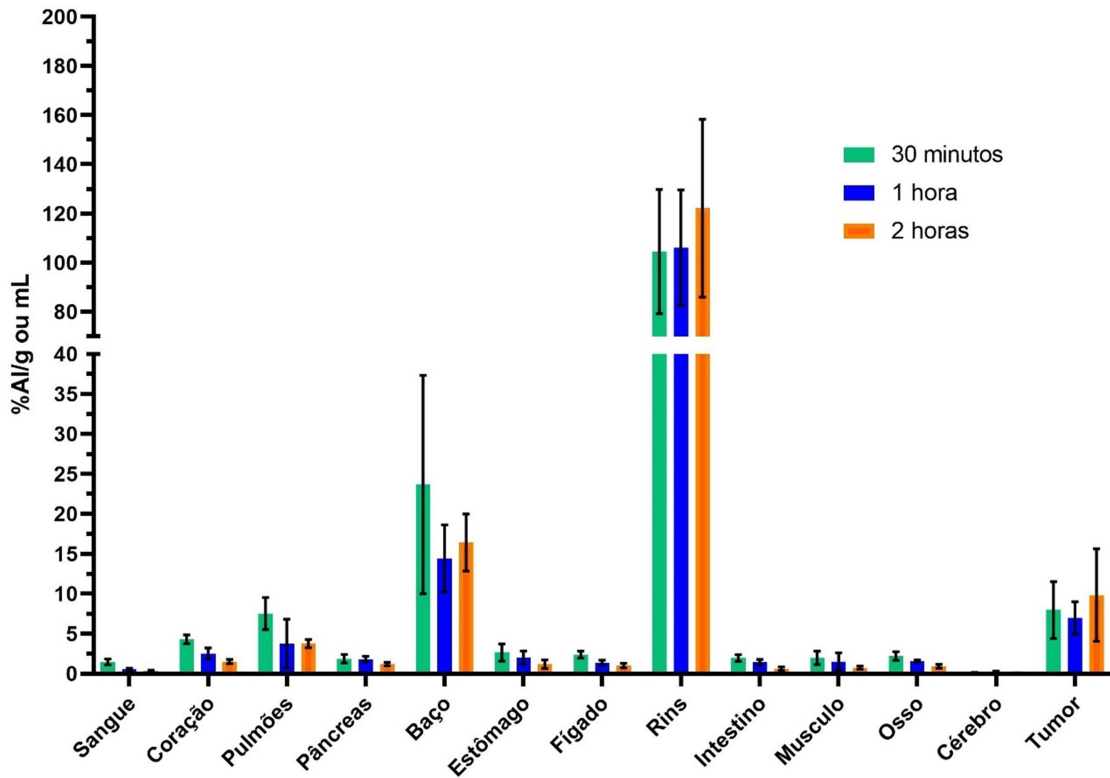
Assim, o presente ensaio contou com a utilização de animais SCID machos para estudo do comportamento do radiofármaco *in vivo* na presença de modelo tumoral LNCaP PSMA+. Os resultados da biodistribuição do PSMA-1007-¹⁸F são apresentados nas tabelas 21 e 22 e nas figuras 38 e 39. Observa-se que a captação do radiofármaco é mais pronunciada principalmente no tumor e nos órgãos que expressam os receptores de PSMA, de forma semelhante ao observado em animais sadios sem tumor.

Tabela 21 - Biodistribuição do PSMA-1007-¹⁸F (5,55 MBq; administração intravenosa) em camundongos SCID machos com tumor de próstata de células LNCaP expresso em %AI/g ou mL (n=5)

Órgão/tecido	%AI/g ou mL ± Desvio Padrão		
	30 minutos	1 hora	2 horas
Sangue	1,47 ± 0,38	0,54 ± 0,16	0,36 ± 0,09
Coração	4,31 ± 0,54	2,52 ± 0,71	1,51 ± 0,27
Pulmão	7,53 ± 2,00	3,77 ± 3,05	3,78 ± 0,52
Pâncreas	1,88 ± 0,54	1,82 ± 0,36	1,21 ± 0,23
Baço	28,75 ± 15,09	14,42 ± 4,20	16,42 ± 3,57
Estômago	2,66 ± 1,07	2,01 ± 0,84	1,20 ± 0,52
Fígado	2,39 ± 0,44	1,40 ± 0,30	1,02 ± 0,3
Rins	104,53 ± 25,24	106,08 ± 23,47	122,14 ± 36,15
Intestino	1,96 ± 0,41	1,42 ± 0,37	0,63 ± 0,21
Músculo	1,97 ± 0,85	1,53 ± 1,08	0,76 ± 0,19
Osso	2,21 ± 0,56	1,58 ± 0,15	0,92 ± 0,24
Cérebro	0,14 ± 0,03	0,18 ± 0,15	0,08 ± 0,03
Tumor	7,97 ± 3,56	6,99 ± 2,03	9,85 ± 5,78

Fonte: Autor

Figura 38 - Biodistribuição do PSMA-1007-18F (5,55 MBq; administração intravenosa) em camundongos SCID machos com tumor de próstata de células LNCaP expresso em %AI/g ou mL e seu desvio padrão (n=5)



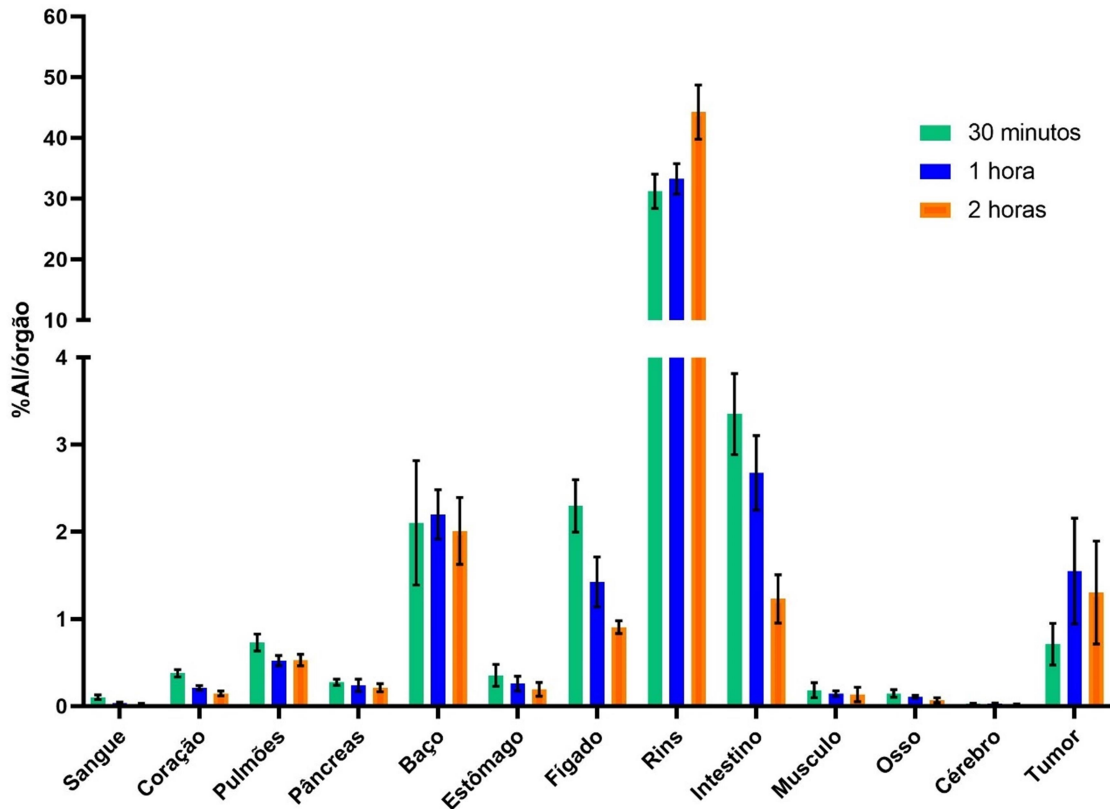
Fonte: Autor

Tabela 22 - Biodistribuição do PSMA-1007-¹⁸F (5,55 MBq; administração intravenosa) em camundongos SCID machos com tumor de próstata de células LNCaP expresso em %AI/órgão (n=5).

Órgão/tecido	%AI/órgão ± Desvio Padrão		
	30 minutos	1 hora	2 horas
Sangue	0,08 ± 0,05	0,03 ± 0,02	0,02 ± 0,01
Coração	0,30 ± 0,17	0,21 ± 0,03	0,16 ± 0,14
Pulmão	0,58 ± 0,34	0,42 ± 0,24	0,42 ± 0,24
Pâncreas	0,17 ± 0,15	0,32 ± 0,19	0,17 ± 0,10
Baço	1,68 ± 1,13	2,20 ± 0,28	1,61 ± 0,96
Estômago	0,28 ± 0,19	0,26 ± 0,09	0,12 ± 0,12
Fígado	1,71 ± 1,02	1,42 ± 0,29	0,91 ± 0,45
Rins	28,51 ± 6,55	33,28 ± 2,50	39,07 ± 12,27
Intestino	3,35 ± 0,47	2,68 ± 0,43	1,37 ± 0,40
Músculo	0,26 ± 0,18	0,14 ± 0,03	0,37 ± 0,08
Osso	0,15 ± 0,04	0,10 ± 0,03	0,07 ± 0,03
Cérebro	0,10 ± 0,16	0,04 ± 0,03	0,02 ± 0,01
Tumor	1,02 ± 0,71	2,72 ± 2,68	1,15 ± 0,62

Fonte: Autor

Figura 39 - Biodistribuição do PSMA-1007-¹⁸F (5,55 MBq; administração intravenosa) em camundongos SCID machos com tumor de próstata de células LNCaP expresso em %AI/órgão e seu desvio padrão (n=5)



Fonte: Autor

Observou-se uma captação renal alta e persistente nos tempos avaliados, à semelhança do que foi observado nos animais saudáveis. Corroboram para a alta captação renal a fração de eliminação urinária do produto, mas, principalmente, a expressão de PSMA no tecido renal.

Esse mesmo comportamento de captação persistente é visto no tumor, com %AI/g variando de $6,99 \pm 2,03$ em 30 minutos para $9,85 \pm 5,78$ dentro de uma hora ($P=0,08$). A porcentagem de captação encontrada no tumor se assemelha à encontrada por ROBU *et al.* (2018) de $7,1 \pm 1,5$ %AI/g em 1 hora pós-injeção, que também relata uma captação do PSMA-1007-¹⁸F pelos órgãos PSMA+. Robu enfatiza o fato de que a internalização do radiotraçador é um fator chave para a eficiência de captação e retenção pelo tumor, no qual as

características de direcionamento ao PSMA presentes no PSMA-1007-¹⁸F contribuiu para o acúmulo no tumor.

WURZER *et al.* (2020) estudaram um novo derivado PSMA-específico, marcado com flúor-18 e gálio-68 nomeados como radio-híbrido-PSMA (rhPSMAs) e compararam seu desempenho *in vivo* com o PSMA-1007-¹⁸F. Os resultados encontrados por eles se assemelham aos encontrados neste estudo, com alto grau de captação pelos rins, baço, tumor e glândulas adrenais.

A captação nos pulmões, comparado com os demais órgãos não-alvo e que não apresentam receptores de PSMA, também foi expressiva, igualmente observada no estudo com animais saudáveis e registrada na literatura, pode estar relacionada à vascularização deste órgão (IOPPOLO *et al.*, 2020).

Um fato nos dois ensaios *in vivo* foi a captação baixa no cérebro, visto que o PSMA não ultrapassa a barreira hematoencefálica (NOMURA *et al.*, 2014).

Outra maneira de se atestar a especificidade do PSMA-1007-¹⁸F pelos receptores de PSMA pode ser observada pela relação entre o tumor e músculo e tumor sangue apresentada na tabela 23.

Tabela 23 - Razão entre a captação tumor/músculo e tumor/sangue no tempos estudados na biodistribuição de PSMA-1007-¹⁸F em camundongos SCID com modelo tumoral LNCaP. Valores calculados a partir da média dos %AI/g ou mL de cada material biológico e seu desvio padrão (n=5).

Razão	Tempo pós-administração do PSMA-1007- ¹⁸ F		
	30 minutos	1 hora	2 horas
Tumor/sangue	6,52 ± 3,59	14,18 ± 3,19	36,54 ± 9,47
Tumor/músculo	3,96 ± 0,17	4,78 ± 1,52	15,86 ± 1,0

Fonte: Autor

Observa-se que, em ambos os casos, a razão tumor/sangue (P=0,02) e tumor/músculo (P= 0,0001) aumentam significativamente no decorrer do

tempo. As razões encontradas neste ensaio são superiores aos encontrados por CARDINALE *et al.* (2017b), que obtiveram razão tumor/sangue de 7,0 no tempo de 2 horas, enquanto que a razão tumor/músculo se assemelha à razão encontrada neste trabalho com um valor de 12,3 para o mesmo tempo. Os resultados sustentam a especificidade alta apresentada pelo radiofármaco PSMA-1007-¹⁸F (TREGLIA *et al.*, 2019; IOPPOLO *et al.*, 2020).

7.5.2.3.1 Estudo de competição in vivo

O estudo de competição *in vivo* foi realizado com o agente competidor PSMA I&T, com o objetivo de comparar o desempenho e especificidade do radiofármaco PSMA-1007-¹⁸F em camundongos com modelo tumoral LNCaP no tempo de 1 hora pós-injeção.

A tabela 24 apresenta os resultados dos dois grupos de animais (com e sem competidor), 1 hora pós-injeção. É possível observar a evidente diminuição na porcentagem de atividade nos órgãos PSMA+ além do tumor, que é o alvo principal do PSMA-1007-¹⁸F neste estudo.

Tabela 24 - Média da %AI/g ou mL dos grupos de animais com modelo tumoral LNCaP de 1 hora pós-injeção do PSMA-1007-¹⁸F com e sem o agente bloqueador PSMA I&T (n=5)

Órgão/tecido	%AI/g ou mL ± Desvio Padrão	
	1h sem bloqueio	1h com bloqueio
Sangue	0,54 ± 0,16	0,68 ± 0,48
Coração	2,52 ± 0,71	2,13 ± 0,48
Pulmão	3,77 ± 3,05	2,55 ± 0,63
Pâncreas	1,82 ± 0,36	0,99 ± 0,56
Baço	14,42 ± 4,20	1,06 ± 0,44
Estômago	2,01 ± 0,84	1,20 ± 0,20
Fígado	1,40 ± 0,30	1,28 ± 0,31
Rins	106,08 ± 23,47	7,96 ± 1,94
Intestino	1,42 ± 0,37	1,44 ± 0,29
Músculo	1,53 ± 1,08	1,03 ± 0,35
Osso	1,58 ± 0,15	1,87 ± 0,86
Cérebro	0,18 ± 0,15	0,32 ± 0,52
Tumor	6,99 ± 2,03	2,60 ± 0,57

Fonte: Autor

Os valores relacionados aos órgãos PSMA+ foram analisados pela ferramenta estatística do GraphPad Prism, e os rins apresentaram diminuição drástica de captação em presença do competidor, com um valor de $P=0,0005$, sendo significativa a diminuição da captação. O mesmo foi observado para o baço e o tumor, com valores de $P=0,006$ e $0,009$, respectivamente.

A tabela 25 mostra a diminuição significativa da razão tumor/sangue no tempo de 1 hora pós-injeção com a presença do agente bloqueador, corroborando a especificidade do radiofármaco PSMA-1007-¹⁸F.

Tabela 25 - Razão entre a captação tumor/músculo e tumor/sangue no tempos de 1 hora pós-injeção na biodistribuição de PSMA-1007-¹⁸F com modelo tumoral LNCaP com e sem a presença do agente bloqueador PSMA I&T. Valores calculados a partir da média dos %AI/g ou mL de cada material biológico (n=5).

Razão	Tempo pós-administração do PSMA-1007- ¹⁸ F		
	1 hora sem bloqueio	1 hora com bloqueio	Valor P
Tumor/sangue	14,18 ± 3,19	3,87 ± 0,32	0,04
Tumor/músculo	4,78 ± 1,52	2,79 ± 0,73	0,06

Fonte: Autor

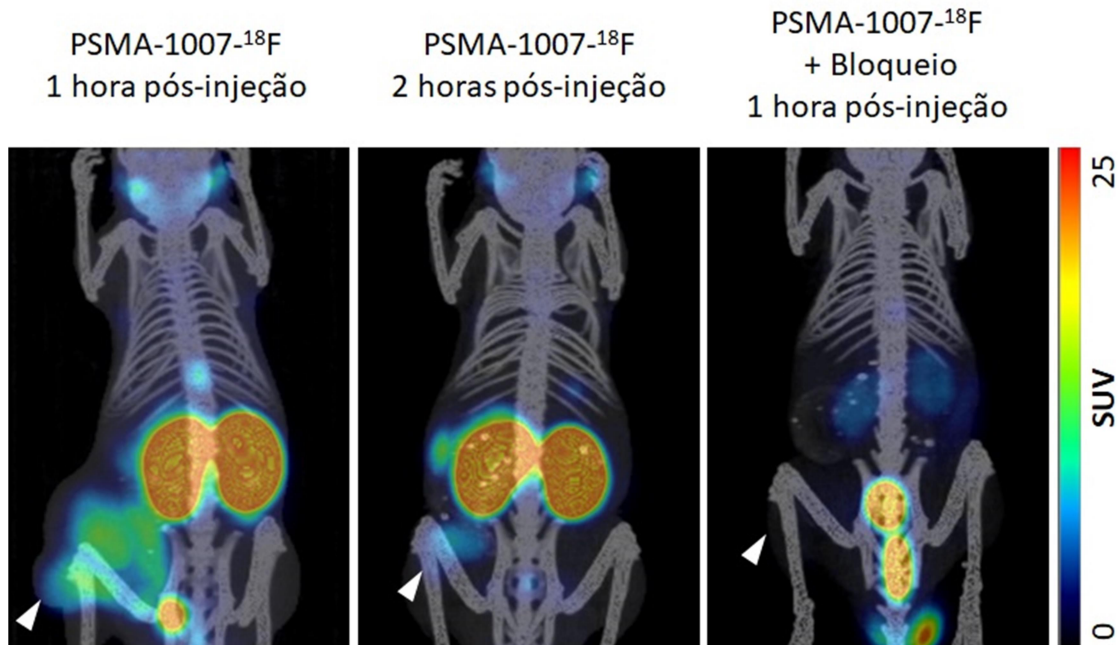
Para a razão tumor/músculo também houve uma diminuição, mas não tão significativa, com um valor P de 0,06, bem próximo do limite de <0,05 com grau de confiança de 95% (tabela 25).

7.5.2.3.2 Imagem de corpo inteiro de camundongos SDIC com modelo tumoral LNCaP em Micro PET

Para evidenciar e ilustrar a especificidade do radiofármaco, foram adquiridas imagens PET/CT de animais com modelo tumoral, após 1 e 2 horas de administração do PSMA-1007-¹⁸F, e em animal com bloqueio prévio de PSMA-I&T.

A figura 40 mostra a biodistribuição do PSMA-1007-¹⁸F nos três animais em seus respectivos tempos de análise, nas quais as setas brancas indicam o posicionamento do tumor no flanco esquerdo dos camundongos. As áreas em destaques representam os órgãos na presença do radiofármaco.

Figura 40 - Imagens de micro PET/CT do valor padronizado de captação (SUV) do PSMA-1007-¹⁸F em camungondos SDIC com modelo tumoral LNCaP 1 hora, 2 horas e 1 hora com agente bloqueador PSMA I&T pós-injeção



Fonte: Autor

Corroborando os valores de %AI/g ou mL do estudo invasivo, os órgãos PSMA+ apresentam SUV mais elevados, particularmente os rins e tumor. As glândulas salivares, que não foi possível de mensurar no ensaio de biodistribuição invasivo, foram visualizadas no estudo de imagem e apresentaram captação maior do que os órgãos não alvo. A tabela 26 apresenta os valores de SUV dos órgãos em destaque na imagem PET/CT acima.

Tabela 26 - Valores de SUV do músculo e de órgãos que expressam os receptores de PSMA em camungondos SDIC com modelo tumoral LNCaP 1 hora, 2 horas e 1 hora com agente bloqueador PSMA I&T pós-injeção do PSMA-1007-¹⁸F, obtidos a partir da imagem PET/CT

Órgão	Valor Padronizado de Captação SUV		
	1 h	2h	1h + Bloqueio
Tumor	6,67	3,85	1,37
Músculo	0,15	0,02	0,25
Glândula Salivar	3,97	3,65	1,70

Fonte: Autor

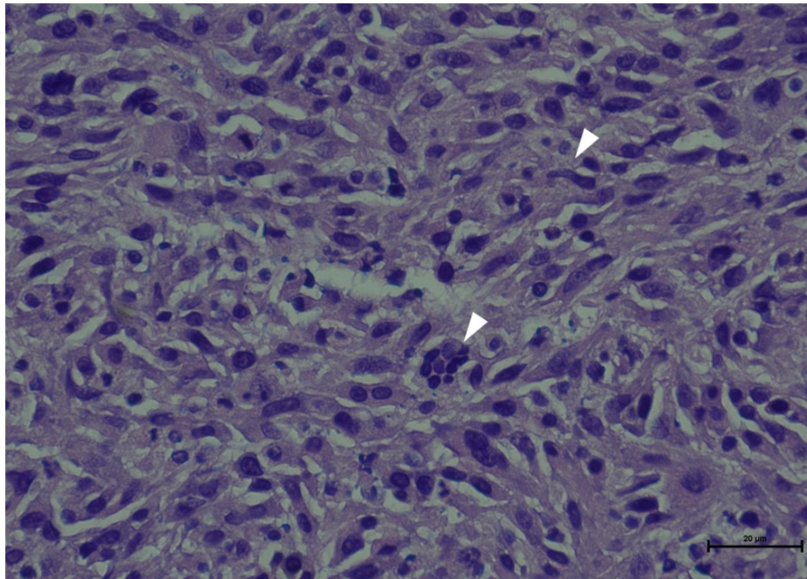
De acordo com a tabela 26, a captação no tumor continua presente, assim como na glândula salivar, que é um órgão que expressa receptores de PSMA, mesmo com 2 horas após a administração (SOEDA *et al.*, 2019). O alto nível de captação nos rins e em órgãos não alvo que expressam PSMA pode ser protegido pela ação de um agente protetor não radioativo como o PSMA I&T não marcado ou o 2-PMPA, comumente usado em testes de internalização *in vitro* por ser específico ao receptor de PSMA (HUANG *et al.*, 2021).

Outros autores também realizaram estudos de bloqueio *in vivo*, que apresentaram alta captação do radiofármaco nos rins e efetivo bloqueio do radiofármaco pelo agente bloqueador (CARDINALE *et al.*, 2017b; IOPPOLO *et al.*, 2020).

7.5.2.4 Histopatologia do tumor de próstata LNCaP

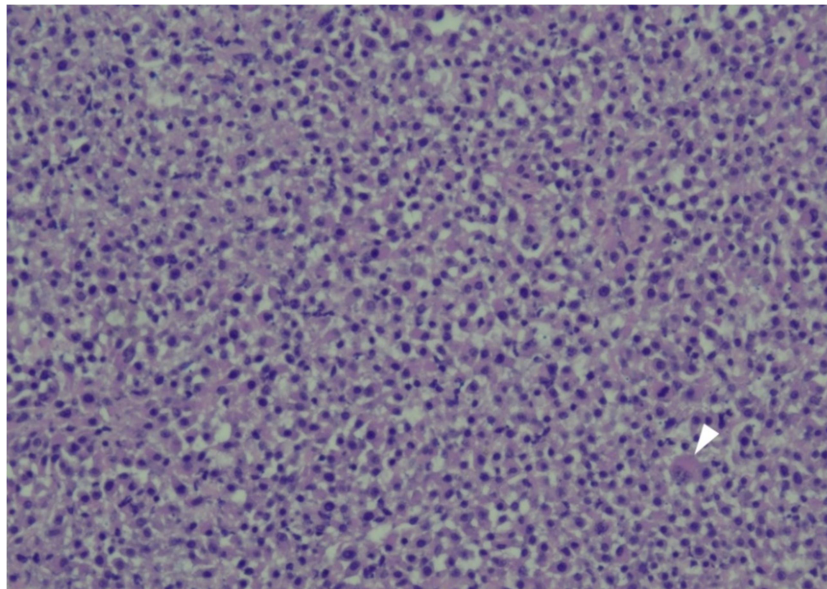
Foram selecionados tumores que não apresentaram necrose, de aparência lisa e não poroso. As imagens se encontram nas figuras 41 e 42, que apresentam pleomorfismo celular, ou seja, vários núcleos disformes com tamanhos e formas diferentes. A figura 41 apresenta um polinúcleo, característico de tecido tumoral, que cresce de maneira desordenada com milhares de núcleos. A figura 43 compara um tecido sadio com o tecido tumoral, onde é possível ver a diferença entre a quantidade de núcleos presentes no tecido, indicando a presença de tumor.

Figura 41 - Tumor de células LNCaP no aumento de 200x no microscópio. As setas brancas indicam características de tecido tumoral



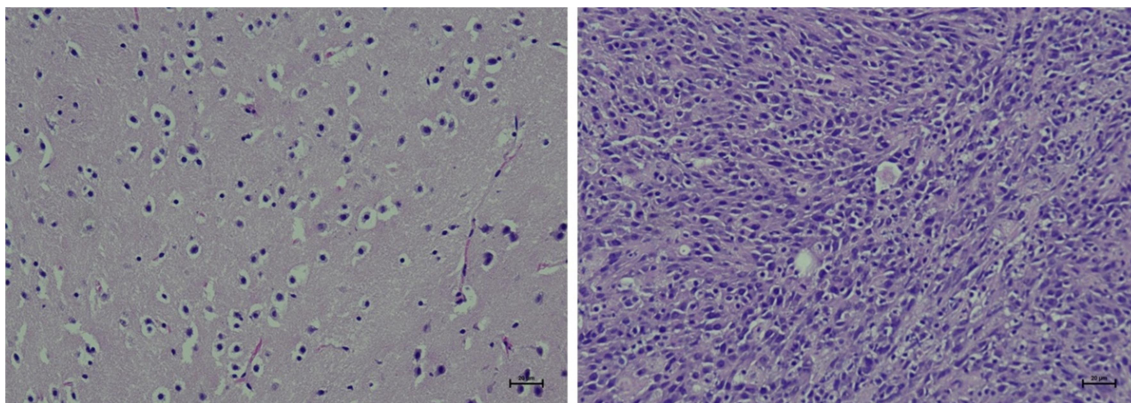
Fonte: Autor

Figura 42 - Tumor de células LNCaP no aumento de 100x no microscópio. As seta branca indica um vaso sanguíneo no meio dos núcleos tumorais



Fonte: Autor

Figura 43 - Comparação entre tecido tumoral de células LNCaP (direita) no aumento de 100x no microscópio com um tecido sadio (esquerda)



Fonte: Autor

A partir da análise feita com as lâminas de histopatologia foi possível concluir que os fragmentos celulares retirados do tecido possuem características tumorais, validando o resultado dos ensaios previamente descritos.

7.6 Validação da Metodologia Analítica para determinação da Pureza Radioquímica

7.6.1 Seletividade

O primeiro ensaio realizado foi o de seletividade, que avaliou o comportamento do produto PSMA-1007-¹⁸F na presença de possíveis impurezas vindas de sua produção. Inicialmente, o critério de aceitação imposto foi baseado na literatura do próprio PSMA-1007-¹⁸F (NAKA *et al.*, 2020), na qual o produto radiomarcado corre pela fita ficando retido nos segmentos 0,7 - 0,8, enquanto que a impureza fluoreto-¹⁸F livre fica retido na origem da fita cromatográfica, semelhante a descrição em sua monografia (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2021c). Na rotina prática, o Rf encontrado no mesmo sistema aplicado foi de 0,9 – 1,0, sendo este definido como critério final de aceitação.

No ensaio de seletividade, não houve mudança no Rf do radiofármaco em nenhuma das triplicatas realizadas, tanto para o produto quanto para o

fluoreto- ^{18}F , e o critério de aceitação de pureza radioquímica de $\geq 95\%$ para o produto foi atendido (tabela 27).

Tabela 27 - Fator de retenção das soluções testes do ensaio de seletividade do PSMA-1007- ^{18}F e seu critério de aceitação

Amostra	Rf encontrado	Critério de aceitação	%PR	Critério da %PR
PSMA-1007-^{18}F				
Solução teste 1	0,9 – 1,0		98,84	
Solução teste 3	0,9 – 1,0	Rf = 0,9 – 1,0	97,61	$\geq 95\%$
Solução teste 4	0,9 – 1,0		98,61	
Solução teste 6	0,9 – 1,0		98,60	
Fluoreto (^{18}F)				
Solução teste 2	0,1	Rf = 0,0 - 0,1		
Solução teste 5	0,1		N.A.	N.A.
Solução teste 7	0,1			

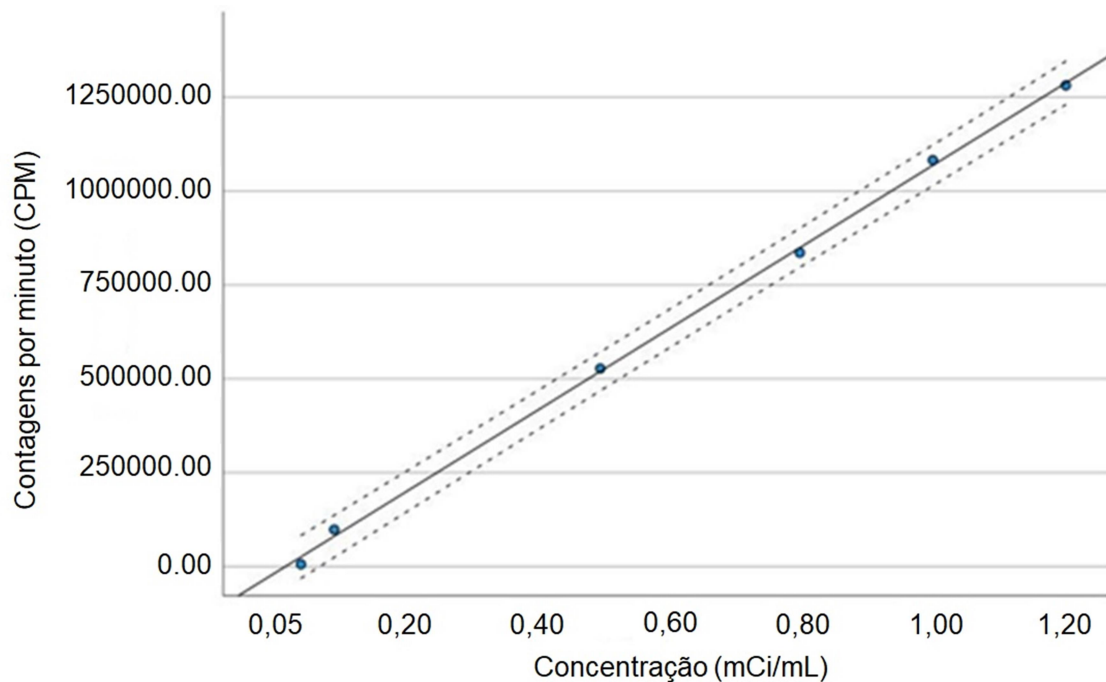
Fonte: Autor

Como visto na tabela 27, a adição das matérias primas químicas e radioativas não promoveram alteração do Rf do produto, assim como o produto PSMA-1007- ^{18}F também não influenciou o Rf do fluoreto- ^{18}F , caracterizando o método aplicado como seletivo.

7.6.2 Linearidade

O ensaio de linearidade foi realizado medindo as atividades do flúor-18 presentes na amostra de PSMA-1007- ^{18}F . A figura 44 mostra os resultados das contagem por minuto (CPM) em relação à concentração do PSMA-1007- ^{18}F em mCi/mL, sendo elas as variáveis dependente e independente, respectivamente. A linha cheia representa o comportamento ideal do ensaio para a regressão linear aplicada e os pontos representam os valores medidos. As tabelas 28 e 29 apresentam os resultados do tratamento estatístico realizado, incluindo sua adequação ao tratamento escolhido e a avaliação da dispersão de resíduos (figura 45).

Figura 44 - Avaliação da associação linear entre as variáveis do ensaio de linearidade. As linhas tracejadas representam os limites de confiança de 95%



Fonte: Autor

A figura 44 mostra o comportamento dos dados, sendo possível analisar a tendência linear entre as variáveis. A linearidade foi demonstrada pela correlação direta entre as duas variáveis estudadas, com significância menor que 0,05, mostrando que, de fato, essa correlação é diferente de 0.

A tabela 28 mostra os dados estatísticos resultantes da regressão linear simples vista na figura 44, com um coeficiente de correlação (R) de 1 e um R^2 de 0,999, indicando uma adequação quase perfeita ao modelo proposto. A equação da reta resultante dessa regressão é $y=(1,05 \times 10^6)x - 1,29 \times 10^4$. Com isso, é possível confirmar que o ensaio atende um dos pré-requisitos da regressão linear.

Tabela 28 - Resultados da adequação dos dados ao modelo estatístico escolhido no ensaio de linearidade do PSMA-1007-¹⁸F

R	R quadrado	R quadrado ajustado	Erro padrão da estimativa	Durbin-Watson
1,000 ^a	0,999	0,999	17095,306	2,636

Fonte: Autor

A análise da ANOVA, ou análise da variância, apresentou significância estatística menor que 0,001, descartando a hipótese nula que caracteriza que a variável dependente não influencia na variável independente. Sendo assim, de fato a hipótese alternativa é melhor e é a mais adequada ao modelo proposto.

A tabela 29 mostra os dados da análise dos resíduos resultantes da regressão linear, sendo os limites de aceitação indicados como 'erro do valor previsto', definidos como 3 desvios padrão para máximo e mínimo. Os valores intitulados como 'erro do resíduo' mostra os valores dos resíduos mínimo e máximo encontrados, ficando dentro dos limites estabelecidos, não possuindo *outliers*, ou seja, não apresentam valores discrepantes, cumprindo mais um critério de regressão linear ideal.

Tabela 29 - Análise estatística dos resíduos resultantes da regressão linear do ensaio de linearidade do PSMA-1007-¹⁸F

	Mínimo	Máximo	N
Valor previsto	25794,39	1288209,38	6
Resíduo encontrado	-19599,49	17860,20	6
Erro do valor previsto	-1,18	1,25	6
Erro do resíduo encontrado	-1,15	1,05	6

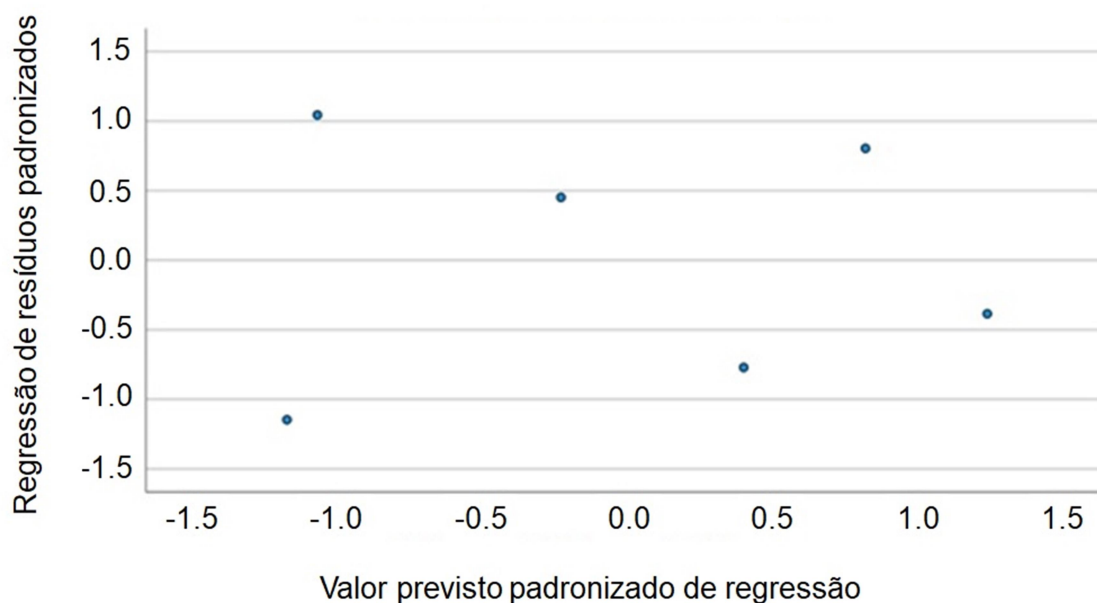
Fonte: Autor

O teste de normalidade dos resíduos foi realizado pelo teste de Shapiro-Wilk, onde obteve o valor de 6 com nível de significância estatística de 0,553, valor superior a 0,05, que significa que os resíduos seguem uma distribuição normal (DE SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

Por fim, foi realizado o teste de homocedasticidade dos resíduos, que avalia se o comportamento dos resíduos em torno do valor médio é homogêneo (CARMO; MARTINS, 2014). Como pré-requisito de uma regressão

linear e cumprindo as normas da RDC N°166 de 2017 (ANVISA, 2017), a figura 45 mostra a dispersão dos resíduos resultantes, que apresentam comportamento aleatório em torno do eixo x, não apresentando um formato cônico ou alguma tendência.

Figura 45 - Avaliação da dispersão de resíduos do ensaio de linearidade. Valores dos eixos normalizados.



Fonte: Autor

Conforme visto na tabela 28, o valor de Durbin-Watson, que analisa se os resíduos são independentes, apresenta um valor de 2,636, ficando dentro de seus limites de 0 e 4 (HUBERT; ROUSSEEUW, 2011). Com isso, podemos afirmar que esse ensaio foi aprovado e que o sistema cromatográfico proposto é viável, cumprindo as exigências de validação da ANVISA.

7.6.3 Precisão

Com o objetivo de determinar a repetibilidade e precisão do método cromatográfico em definir a pureza radioquímica do PSMA-1007-¹⁸F, o ensaio de precisão contou com dois analistas que realizaram a repetibilidade e a precisão intermediária de modo independente no mesmo laboratório, contando com sextuplicadas da mesma amostra do radiofármaco.

A sextuplicata dos ensaios de precisão intermediária e repetibilidade se encontram na tabela 30, na qual foram comparados os resultados da %PR através do desvio padrão relativo.

Tabela 30 - Pureza radioquímica encontrada no ensaio de precisão do PSMA-1007-¹⁸F, seu desvio padrão e desvio padrão relativo.

Porcentagem de Pureza Radioquímica (%PR)		
	Repetibilidade	Precisão Intermediária
Média	98,42	98,74
Desvio Padrão	0,214	0,217
Desvio Padrão Relativo	0,217	0,220
Desvio Padrão Relativo entre os resultados	0,148	
Variância	0,022	

Fonte: Autor

O grau de concordância entre os resultados individuais pode ser visto por meio do desvio padrão relativo, tendo como critério de aceitação de %PR de $\geq 95\%$ (tabela 30). Assim, os valores médios de 98,42% e 98,74% da repetibilidade e precisão intermediária, respectivamente, se tornam verdadeiros e aceitáveis, com valores de dispersão mínimos e confiáveis pelo desvios padrão. O desvio padrão relativo refere-se ao grau de concordância mútua entre as medidas individuais, caracterizando sua reprodutibilidade. Com variância de 0,022, é possível afirmar que a precisão do método é alta, alcançando entre os analistas uma boa reprodução do processo sem decair a qualidade e eficácia, visto que o Rf de todas as análises ficou entre 0,9 e 1,0, característico do produto.

7.6.4 Robustez

O ensaio de robustez foi realizado como um experimento fatorial fracionário, ou seja, através de experimentos onde os fatores analisados se encontram em pequenas frações, verificando se eles influenciam no resultado

final, neste caso, a pureza radioquímica do PSMA-1007-¹⁸F. Desta forma, os parâmetros foram analisados de forma independente, não podendo ser detectadas as interações dos parâmetros entre si através deste teste (KARAGEORGOU; SAMANIDOU, 2014).

Assim, para cada ensaio foi realizada uma triplicata de corridas variando os parâmetros pré-determinados de concentração radioativa, volume de aplicação da amostra de PSMA-1007-¹⁸F e a proporção dos solventes da fase móvel utilizando o Teste de Youden, onde os resultados estão apresentados na tabela 31. Estes valores foram usados no cálculo de distribuição de T de Student a partir da diferença entre os valores %PR de alto nível e baixo nível para cada parâmetro individualmente (tabela 32). O Rf encontrado nas corridas ficou entre 0,9 e 1,0.

Tabela 31 - Resultado da porcentagem de pureza radioquímica (%PR) para o ensaio de robustez do PSMA-1007-¹⁸F

Parâmetros	Número de experimentos			
	1	2	3	4
Concentração da amostra (A/a)	A	A	a	a
Volume da amostra (B/c)	B	b	B	b
Composição da fase móvel (v/v) (C/c)	C	c	c	C
Média da %PR	96,83% ± 0,18	98,12% ± 0,26	97,17% ± 0,16	96,67% ± 0,11

Fonte: Autor

Tabela 32 - Resultado da distribuição de T de Student para o ensaio de robustez do PSMA-1007-¹⁸F

Parâmetro	Diferença entre as médias da %PR de alto e baixo nível em módulo		
		T _{cal}	T _{tab}
Concentração Radioativa	0,555	0,620	±3,182
Volume de aplicação	-0,395	-0,441	
Fase móvel	-0,895	-2,266	

Fonte: Autor

O teste de Youden consegue fornecer valores que caracterizam a influência daquele fator de interesse sobre o estudo como um todo. Assim, o efeito de cada parâmetro é considerado como importante e influente no método cromatográfico quando o valor calculado for superior ao critério estabelecido. Partindo da hipótese alternativa e dos fatores analisados (n=4), estabeleceu-se um valor de T_{tab} para 95% bicaudal de 3,182, onde os valores calculados a partir das porcentagens de PR não devem ultrapassar os limites de ±3,182.

O primeiro parâmetro analisado foi a concentração radioativa. Como via de regra para este estudo, a concentração na condição padrão foi de 37 MBq/mL (1 mCi/mL), onde a condição variável adotada foi de 18,5 MBq/mL (0,5 mCi/mL), metade do valor inicial. A probabilidade estatística esperada para este fator, considerando o ensaio de linearidade que analisou o comportamento cromatográfico de 50% da concentração padrão, é de que estaria dentro do intervalo de confiança e que seriam estatisticamente iguais. O T_{cal} de 0,620 demonstra baixo impacto sobre a capacidade do método CCD em identificar a pureza radioquímica do PSMA-1007-¹⁸F, não influenciando diretamente no método de separação e não afetando o ensaio. O mesmo pode ser visto no volume da amostra aplicado, tendo um valor T_{cal} mais baixo de -0,441.

Em compensação, o valor T_{cal} para a fase móvel se aproximou da extremidade de 3,182 com um valor de T_{cal} de -2,266. É compreensível este valor estar tão próximo do limite do intervalo de confiança por ter maior influência sobre o método quando comparado com os demais fatores, visto que a cromatografia se baseia no equilíbrio do analito entre a fase móvel e a fase

estacionária do sistema (COLLINS *et al*, 2006). Mesmo a fase móvel alternativa (valor de baixo nível) apresentando uma porcentagem de solvente orgânico menor, influenciando na polaridade da mistura da fase móvel e, conseqüentemente, no equilíbrio do sistema e na adsorção do produto radiomarcado, não interferiu na eficácia de separação do PSMA-1007-¹⁸F do fluoreto-¹⁸F, assim como não interferiu no fator de retenção do mesmo, ficando entre 0,9 e 1,0 em todas as corridas.

O método proposto se provou robusto, capaz de resistir a pequenas mudanças na sua condição padrão, visto que o ensaio de pureza radioquímica na rotina de controle de qualidade de qualquer radiofármaco é feito por diferentes analistas em diferentes laboratórios, submetendo-se às deliberadas variações no processo.

7.6.5 Intervalo

O ensaio de intervalo é relativo, pois é normalmente derivado de resultados dos ensaios de precisão, linearidade e exatidão (quando aplicável), a fim de estabelecer a melhor faixa de trabalho considerando as quantidades do analito dentro ou nas extremidades da faixa determinada pelo procedimento analítico (EMA, 1995).

O ensaio de linearidade foi executado para a faixa de 5 a 120% da concentração radioativa de 1 mCi/mL e demonstrou linearidade. Porém, ao se trabalhar próximo do limite inferior avaliado (5 %) para determinação da pureza radioquímica, não haveria garantia da detecção da impureza, caso ela se apresentasse, por exemplo, no limite do critério de aceitação do ensaio. Sendo assim, recomenda-se o range de 90 a 110 % para faixa de concentração radioativa, ou seja, um range de 0,9 a 1,1 mCi/mL.

8 CONCLUSÃO

Com os resultados observados na literatura dos avanços na detecção de pequenas lesões de câncer de próstata e na sua recorrência bioquímica por meio de estudos PET/CT com PSMA-1007-¹⁸F, o presente trabalho teve como objetivo avaliar e validar os parâmetros de síntese e as metodologias do controle de qualidade, contribuindo para a implementação futura da produção rotineira deste radiofármaco no Centro de Radiofarmácia do IPEN/CNEN-SP.

A adequabilidade do método de síntese automatizada do radiofármaco foi comprovada, resultando em rendimento de marcação alto e reprodutibilidade do processo produtivo. A estabilidade do radiofármaco sustenta a sua produção em escala alta, podendo ser distribuído para centros médicos sem perder sua eficácia.

Em julho de 2021 foi publicada a monografia oficial do PSMA-1007-¹⁸F na Farmacopeia Europeia, e os métodos analíticos aplicados para o controle de qualidade foram avaliados nesta dissertação, comparados aos métodos descritos na literatura que antes eram referência para critérios de aceitação. Os resultados iniciais alcançados sustentam a viabilidade de aplicação do radiofármaco, que atendeu aos critérios mais rígidos inicialmente propostos de pureza radioquímica.

Contribuiu também para a validação do método analítico de CCD, empregado na determinação da pureza radioquímica do radiofármaco PSMA-1007-¹⁸F, sendo este um requisito para obtenção da certificação em Boas Práticas de Fabricação de um novo radiofármaco. Os resultados aqui apresentados oferecem mais recursos para registro do produto no Brasil, possibilitando sua comercialização e seu uso no diagnóstico do câncer de próstata, umas das doenças mais letais no país e no mundo.

Por fim, o trabalho avaliou a especificidade do radiofármaco em estudos pré-clínicos necessários para demonstrar a eficácia do produto para aplicação clínica. O trabalho demonstrou alta captação do PSMA-1007-¹⁸F pelo tumor

prostático, coincidindo com os resultados clínicos internacionais, podendo ser utilizados como base para futuros estudos clínicos com o radiofármaco.

9 BIBLIOGRAFIA

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC** **Nº** **166.** 2017. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401> Acesso em: 07 set. 2021.

ATKINS, P.; JONES, L.; LAVERMAN, L. Princípios de Química: Questionando a Vida Moderna e o Meio Ambiente. **Bookman Editora**. Porto Alegre. 5 ed. 2012.

BALIEIRO, L. M. **Estudo para implantação do processo de produção do radiofármaco FES-18F em sistema automatizado: abordagem de validação de processo e de método analítico**. 2020. p.56. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

BANERJEE, S. R.; PULLAMBHATLA, M.; BYUN, Y.; NIMMAGADDA, S. *et al.* 68Ga-labeled inhibitors of prostate-specific membrane antigen (PSMA) for imaging prostate cancer. **Journal of medicinal chemistry**, v. 53, n. 14, p. 5333-5341, 2010.

BARBOSA, F. d. G.; QUEIROZ, M. A.; NUNES, R. F.; MARIN, J. F. G. *et al.* Clinical perspectives of PSMA PET/MRI for prostate cancer. **Clinics**, v. 73, 2018. Suplemento 1.

BARNETT, R. Prostate cancer. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 908, 2018.

BEDNAROVA, S.; LINDENBERG, M. L.; VINSENSIA, M.; ZUIANI, C. *et al.* Positron emission tomography (PET) in primary prostate cancer staging and risk assessment. **Translational andrology and urology**, v. 6, n. 3, p. 413, 2017.

BENEŠOVÁ, M.; BAUDER-WÜST, U.; SCHÄFER, M.; KLIKA, K. D. *et al.* Linker Modification Strategies To Control the Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA)-Targeting and Pharmacokinetic Properties of DOTA-Conjugated PSMA Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 5, p. 1761-1775, 2016.

BENEŠOVÁ, M.; SCHÄFER, M.; BAUDER-WÜST, U.; AFSHAR-OROMIEH, A. *et al.* Preclinical Evaluation of a Tailor-Made DOTA-Conjugated PSMA Inhibitor with Optimized Linker Moiety for Imaging and Endoradiotherapy of Prostate Cancer. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 56, n. 6, p. 914-920, 2015.

BLEVINS, D. W.; RIGNEY, G. H.; FANG, M. Y.; AKULA, M. R. *et al.* Novel methods for the quantification of toxic, residual phase transfer catalyst in fluorine-18 labeled radiotracers. **Nuclear medicine and biology**, v. 74, p. 41-48, 2019.

BOFF, S. R. **A fibra muscular e fatores que interferem no seu fenótipo**. n. 2, v.15, p. 111 - 116, Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/actafisiologica/article/view/102923>. Acesso em: 31 ago. 2021.

BOIS, F.; NOIROT, C.; DIETEMANN, S.; MAINTA, I. C. *et al.* [68Ga] Ga-PSMA-11 in prostate cancer: a comprehensive review. **American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 10, n. 6, p. 349, 2020.

BONFILIO, R.; CAZEDEY, E. C. L.; ARAÚJO, M. B. d.; NUNES SALGADO, H. R. Analytical validation of quantitative high-performance liquid chromatographic methods in pharmaceutical analysis: a practical approach. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 42, n. 1, p. 87-100, 2012.

BORLEY, N.; FENELEY, M. R. Prostate cancer: diagnosis and staging. **Asian J Androl**, v. 11, n. 1, p. 74-80, 2009.

BOUVET, V.; WUEST, M.; JANS, H.-S.; JANZEN, N. *et al.* Automated synthesis of [18 F] DCFPyL via direct radiofluorination and validation in preclinical prostate cancer models. **EJNMMI research**, v. 6, n. 1, p. 1-15, 2016.

CALAIS, J.; CZERNIN, J.; CAO, M.; KISHAN, A. U. *et al.* 68Ga-PSMA-11 PET/CT mapping of prostate cancer biochemical recurrence after radical prostatectomy in 270 patients with a PSA level of less than 1.0 ng/mL: impact on salvage radiotherapy planning. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 59, n. 2, p. 230-237, 2018.

CARDINALE, J.; MARTIN, R.; REMDE, Y.; SCHÄFER, M. *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, 2017a.

CARDINALE, J.; ROSCHER, M.; SCHÄFER, M.; GEERLINGS, M. *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.

CARDINALE, J.; SCHÄFER, M.; BENEŠOVÁ, M.; BAUDER-WÜST, U. *et al.* Preclinical evaluation of 18F-PSMA-1007, a new prostate-specific membrane antigen ligand for prostate cancer imaging. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 58, n. 3, p. 425-431, 2017b.

CARMO, C. R. S.; MARTINS, V. F. Determinantes de Custos com Medicamentos: Um estudo de caso baseado nas características físicas dos pacientes de um hospital público de Minas Gerais. **Contabilometria**, v. 1, n. 1, 2014.

CAZZATO, R. L.; GARNON, J.; SHAYGI, B.; KOCH, G. *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.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. **Editora Unicamp**, 2006.

COMISSÃO EUROPEIA. Decisão da Comissão, de 12 de Agosto de 2002, que dá execução ao disposto na Directiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**, 2002. Disponível em: <<https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/ed928116-a955-4a84-b10a-cf7a82bad858/language-pt/format-PDF>>. Acesso em 08 set. 2021.

CYTAWA, W.; SEITZ, A. K.; KIRCHER, S.; FUKUSHIMA, K. *et al.* 68 Ga-PSMA I&T PET/CT for primary staging of prostate cancer. **European journal of nuclear medicine and molecular imaging**, v. 47, n. 1, p. 168-177, 2020.

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

DECRISTOFORO, C.; ZOLLE, I.; RAKIÁS, F.; IMRE, J. *et al.* Quality Control Methods of 99mTc Pharmaceuticals. *In*: ZOLLE, I. (Ed.). **Technetium-99m Pharmaceuticals: Preparation and Quality Control in Nuclear Medicine**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 123-150.

DI IORIO, V.; BOSCHI, S.; SARNELLI, A.; CUNI, C. *et al.* [18F]F-PSMA-1007 Radiolabelling without an On-Site Cyclotron: A Quality Issue. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 7, p. 599, 2021.

DIETLEIN, M.; KOBE, C.; KUHNERT, G.; STOCKTER, S. *et al.* Comparison of [(18F)DCFPyL and [(68)Ga]Ga-PSMA-HBED-CC for PSMA-PET Imaging in Patients with Relapsed Prostate Cancer. **Mol Imaging Biol**, v. 17, n. 4, p. 575-584, 2015.

DURKAN, K.; LAMBRECHT, F. Y.; UNAK, P. Radiolabeling of bombesin-like peptide with 99mTc: 99mTc-litorin and biodistribution in rats. **Bioconjugate chemistry**, v. 18, n. 5, p. 1516-1520, 2007.

EDER, M.; NEELS, O.; MÜLLER, M.; BAUDER-WÜST, U. *et al.* Novel Preclinical and Radiopharmaceutical Aspects of [68Ga]Ga-PSMA-HBED-CC: A New PET Tracer for Imaging of Prostate Cancer. **Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 7, p. 779-796, 2014.

EDER, M.; SCHÄFER, M.; BAUDER-WÜST, U.; HULL, W.-E. *et al.* 68Ga-Complex Lipophilicity and the Targeting Property of a Urea-Based PSMA Inhibitor for PET Imaging. **Bioconjugate Chemistry**, v. 23, n. 4, p. 688-697, 2012.

EIBER, M.; FENDLER, W. P.; ROWE, S. P.; CALAIS, J. *et al.* Prostate-specific membrane antigen ligands for imaging and therapy. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 58, n. Supplement 2, p. 67S-76S, 2017.

EMA – EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **ICH Topic Q2 (R1) validation of analytical procedures: text and methodology**. Amsterdã, Holanda. 1995. Disponível em < Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (europa.eu)>. Acesso em: 5 jul. 2021.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. **ALOVUDINE (18F) INJECTION**. 10 ed. Council of Europe, 2021a, p. 1181 - 11183.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. **GALLIUM (68Ga) PSMA-11 INJECTION**. 10 ed. Council of Europe 2021b, p. 5397-5398.

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

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. **SOLVENTS WITH LOW TOXIC POTENCIAL**. 10 ed. Council of Europe, 2021d, p. 642.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. **TETRABUTYLAMMONIUM IN RADIOPHARMACEUTICAL PREPARATIONS**. 10 ed. Council of Europe, 2021e, p. 5661.

FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cir Bras**, V. 19, n. 1, p. 59-65, 2004.

FAN, J.; DE LANNOY, I. A. Pharmacokinetics. **Biochem Pharmacol**, V. 87, n. 1, p. 93-120, 2014.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. **FLUDESOXIGLICOSE (18 F), SOLUÇÃO INJETÁVEL**. 2019, 6 ed v. 2, p. RF001-00. Disponível em <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/arquivos/7997json-file-1>> Acesso em 26 ago, 2021.

FDA - U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **FDA Approves First PSMA-Targeted PET Imaging Drug for Men with Prostate Cancer**. Maryland, Estados Unidos da América, 2020. Disponível em: <<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-psma-targeted-pet-imaging-drug-men-prostate-cancer>>. Acesso em: 5 jul. 2021.

FENDLER, W. P.; CALAIS, J.; EIBER, M.; FLAVELL, R. R. *et al*. Assessment of 68Ga-PSMA-11 PET accuracy in localizing recurrent prostate cancer: a prospective single-arm clinical trial. **JAMA oncology**, V. 5, n. 6, p. 856-863, 2019.

FERREIRA, G.; IRAVANI, A.; HOFMAN, M. S.; HICKS, R. J. Intra-individual comparison of 68Ga-PSMA-11 and 18F-DCFPyL normal-organ biodistribution. **Cancer Imaging**, v. 19, n. 1, p. 23, 2019.

FESAS, A.; POURKHESSALIAN, M. R.; VRACHIMIS, A. Automated Production of [18F] PSMA-1007 Using 7.5 MeV Cyclotron: A Feasible Alternative for Remote Sites. **Environmental Radiochemical Analysis VI**, v. 354, p. 71, 2019.

FOLEY, R.; REDMAN, S.; GRAHAM, R.; LOUGHBOROUGH, W. *et al.* Fluorine-18 labelled prostate-specific membrane antigen (PSMA)-1007 positron-emission tomography-computed tomography: normal patterns, pearls, and pitfalls. **Clinical Radiology**, v. 75, n. 12, p. 903-913, 2020.

FUKUMORI, N. T. O.; BARBOZA, M. F. d. Síntese de FDG-18F e Produção de Na-18F. *In*: RAMOS, C. D.; JUNIOR, J. S. (Ed). **PET e PET/CT em Oncologia**. São Paulo, São Paulo: Atheneu, 2011, p. 75 - 83.

GIESEL, F. L.; CARDINALE, J.; SCHÄFER, M.; NEELS, O. *et al.* 18 F-Labelled PSMA-1007 shows similarity in structure, biodistribution and tumour uptake to the theragnostic compound PSMA-617. **European journal of nuclear medicine and molecular imaging**, v. 43, n. 10, p. 1929-1930, 2016.

GIESEL, F. L.; HADASCHIK, B.; CARDINALE, J.; RADTKE, J. *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**, v. 44, n. 4, p. 678-688, 2017.

GIESEL, F. L.; KNORR, K.; SPOHN, F.; WILL, 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.

GIESEL, F. L.; WILL, L.; KESCH, C.; FREITAG, M. *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, 2018a.

GIESEL, F. L.; WILL, L.; LAWAL, I.; LENGANA, T. *et al.* Intraindividual comparison of 18F-PSMA-1007 and 18F-DCFPyL PET/CT in the prospective evaluation of patients with newly diagnosed prostate carcinoma: a pilot study. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 59, n. 7, p. 1076-1080, 2018b.

HAEDICKE, K.; KOSSATZ, S.; REINER, T.; GRIMM, J. Molecular Imaging and Molecular Imaging Technologies. *In*: Lewis J., Keshari K. (Ed.) **Imaging and Metabolism**. Springer, Cham, 2018. p. 3-27.

HEIN, P.; MICHEL, M. C.; LEINWEBER, K.; WIELAND, T. *et al.* Receptor and Binding Studies. *In*: DHEIN, S.; MOHR, F. W., *et al* (Ed.). **Practical Methods in Cardiovascular Research**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2005. p. 723-783.

HUANG, Y.; LI, H.; YE, S.; TANG, G. *et al.* Synthesis and preclinical evaluation of an Al(18)F radiofluorinated bivalent PSMA ligand. **Eur J Med Chem**, v. 221, p. 113502, 2021.

HUBERT, M.; ROUSSEUW, P. Durbin–Watson Test. *In*: LOVRIC, M. (Ed.). **International encyclopedia of statistical science**. Springer, 1 ed, 2011. p. 408 - 409.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Câncer de Próstata**. 2021. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-prostata>> Acesso em: 16 jan 2021.

INMETRO. **DOQ-CGCRE-008 - Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Disponível em: < http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_05.pdf> Acesso em 17 set. 2021.

IOPPOLO, J. A.; NEZICH, R. A.; RICHARDSON, K. L.; MORANDEAU, L. *et al.* Direct in vivo comparison of [18F] PSMA-1007 with [68Ga] Ga-PSMA-11 and [18F] AIF-PSMA-11 in mice bearing PSMA-expressing xenografts. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 161, p. 109164, 2020.

JACOBSON, O.; CHEN, X. PET designated flouride-18 production and chemistry. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 10, n. 11, p. 1048-1059, 2010.

JADVAR, H. Is there use for FDG-PET in prostate cancer?. **Elsevier**. v. 46, n. 6, p. 502-506, 2016.

JARDIM, I. Extração em fase sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010.

JIANG, X.; LI, Y.; WANG, X.; SHEN, T. *et al.* Quick Automatic Synthesis of Solvent-Free 16 α -[18F] Fluoroestradiol: Comparison of Kryptofix 222 and Tetrabutylammonium Bicarbonate. **Frontiers in Oncology**, v. 10, p. 1834, 2020.

JOSEPHS, D.; SPICER, J.; O'DOHERTY, M. Molecular Imaging in clinical trials. **Targeted oncology**, v. 4, n. 3, p. 151-168, 2009.

KARAGEORGOU, E.; SAMANIDOU, V. Youden test application in robustness assays during method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1353, p. 131-139, 2014.

KESCH, C.; KRATOCHWIL, C.; MIER, W.; KOPKA, K. *et al.* 68Ga or 18F for prostate cancer imaging? **Journal of Nuclear Medicine**, v. 58, n. 5, p. 687-688, 2017a.

KESCH, C.; VINSENSIA, M.; RADTKE, J. P.; SCHLEMMER, H. P. *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.

KHREISH, F.; EBERT, N.; RIES, M.; MAUS, S. *et al.* 225 Ac-PSMA-617/177 Lu-PSMA-617 tandem therapy of metastatic castration-resistant prostate cancer: pilot experience. **European journal of nuclear medicine and molecular imaging**, v. 47, n. 3, p. 721-728, 2020.

KILIAN, K.; CHABECKI, B.; KIEC, J.; KUNKA, A. *et al.* Synthesis, quality control and determination of metallic impurities in F-fludeoxyglucose production process. **Reports of Practical Oncology and Radiotherapy**, v. 19, n. 1, 2014.

KLAUNIG, J. E. Chapter 8 - Carcinogenesis. *In*: POPE, C. N. e LIU, J. (Ed.). **An Introduction to Interdisciplinary Toxicology**: Academic Press, 2020. p. 97-110.

KÖHLER, M.; DEGERING, D.; ZESSIN, J.; FÜCHTNER, F. *et al.* Radionuclide impurities in [18F] F- and [18F] FDG for positron emission tomography. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 81, p. 268-271, 2013.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica**. Rio de Janeiro, 1988.

KRATOCHWIL, C.; HABERKORN, U.; GIESEL, F. L. 225Ac-PSMA-617 for therapy of prostate cancer. **Elsevier**, v. 20, n. 2, p. 133-140, 2020.

KUNTZSCH, M.; LAMPARTER, D.; BRÜGGENER, N.; MÜLLER, M. *et al.* Development and successful validation of simple and fast TLC spot tests for determination of Kryptofix® 2.2. 2 and tetrabutylammonium in 18F-labeled radiopharmaceuticals. **Pharmaceuticals**, v. 7, n. 5, p. 621-633, 2014.

KURASH, M. M.; GILL, R.; KHAIRULIN, M.; HARBOSH, H. *et al.* 68Ga-labeled PSMA-11 (68Ga-isoPROtrace-11) synthesized with ready to use kit: normal biodistribution and uptake characteristics of tumour lesions. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 3109, 2020.

KUTEN, J.; FAHOUM, I.; SAVIN, Z.; SHAMNI, O. *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.

LEE, B. S.; CHU, S. Y.; JUNG, W. J.; JEONG, H. J. *et al.* 18F-labeled 1,2,3-triazole-linked Glu-urea-Lys-based PSMA ligands have good pharmacokinetic properties for positron emission tomography imaging of prostate cancer. **The Prostate**, v. 80, n. 16, p. 1383-1393, 2020.

LOEB, S.; CATALONA, W. J. The Prostate Health Index: a new test for the detection of prostate cancer. **Therapeutic Advances in Urology**, v. 6, n. 2, p. 74-77, 2014.

LOVELAND, W. D.; MORRISSEY, D. J.; SEABORG, G. T. Nuclear Medicine. *In*: **Modern Nuclear Chemistry**: Wiley Online Library, 2017. v. 20061, p. 93-112.

LÜTJE, S.; HESKAMP, S.; CORNELISSEN, A. S.; POEPEL, T. D. *et al.* PSMA ligands for radionuclide imaging and therapy of prostate cancer: clinical status. **Theranostics**, v. 5, n. 12, p. 1388, 2015.

MALASPINA, S.; ANTTINEN, M.; TAIMEN, P.; JAMBOR, I. *et al.* Prospective comparison of 18 F-PSMA-1007 PET/CT, whole-body MRI and CT in primary nodal staging of unfavourable intermediate-and high-risk prostate cancer. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 48, p. 2951-2959, 2021.

MARENGO, M.; LODI, F.; MAGI, S.; CICORIA, G. *et al.* Assessment of radionuclidic impurities in 2-[18F] fluoro-2-deoxy-D-glucose ([18F] FDG) routine production. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 66, n. 3, p. 295-302, 2008.

MAYO CLINIC. **Prostate cancer**. Minnesota, jun. 2021. Disponível em: <<https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/prostate-cancer/symptoms-causes/syc-20353087>>. Acesso em: 05 jul. 2021.

MENA, E.; LINDENBERG, M. L.; TURKBEY, I. B.; SHIH, J. H. *et al.* 18F-DCFPyL PET/CT imaging in patients with biochemically recurrent prostate cancer after primary local therapy. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 61, n. 6, p. 881-889, 2020.

MEYER, G.-J.; WATERS, S.; COENEN, H.; LUXEN, A. *et al.* PET radiopharmaceuticals in Europe: current use and data relevant for the formulation of summaries of product characteristics (SPCs). **European journal of nuclear medicine**, v. 22, n. 12, p. 1420-1432, 1995.

MILLER, J; MILLER, J. C. Statistics and chemometrics for analytical chemistry. **Pearson education**, v. 5, n.1, p. 39, 2018.

MÜLLER, C.; SINGH, A.; UMBRICH, C. A.; KULKARNI, H. R. *et al.* Preclinical investigations and first-in-human application of (152)Tb-PSMA-617 for PET/CT imaging of prostate cancer. **EJNMMI Research**, v. 9, n. 1, p. 68, 2019.

NAKA, S.; WATABE, T.; KURIMOTO, K.; UEMURA, M. *et al.* Automated [18 F] PSMA-1007 production by a single use cassette-type synthesizer for clinical examination. **EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 1-17, 2020.

NCBI - NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Compound Summary for CID 23667548, Sodium ascorbate**. PubChem, [20--]. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-ascorbate>>. Acesso em: 28 set. 2021.

NIKHIL, M.; NIRANJAN, J. S.; JAMES, B.; SAMANTHA, K. *et al.* PSMA Theranostics in Advanced Prostate Cancer: An Evolving Option. **BJU international**, v. 126, n. 5, p. 525-535, 2020.

NOMURA, N.; PASTORINO, S.; JIANG, P.; LAMBERT, G. *et al.* Prostate specific membrane antigen (PSMA) expression in primary gliomas and breast cancer brain metastases. **Cancer Cell Int**, v. 14, n. 1, p. 26, 2014.

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, R.; SANTOS, D.; FERREIRA, D.; COELHO, P. *et al.* Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 151-165, 2006.

PIRON, S.; VERHOEVEN, J.; DESCAMPS, B.; KERSEMANS, K. *et al.* Intra-individual dynamic comparison of 18F-PSMA-11 and 68Ga-PSMA-11 in LNCaP xenograft bearing mice. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 21068, 2020.

PUJATTI, P., B. **Marcadores Moleculares Derivados da Bombesina Para Diagnóstico de Tumores por SPECT e PET**. 2012. p. 125. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

RAHBAR, K.; AFSHAR-OROMIEH, A.; BÖGEMANN, M.; WAGNER, S. *et al.* 18 F-PSMA-1007 PET/CT at 60 and 120 minutes in patients with prostate cancer: biodistribution, tumour detection and activity kinetics. **European journal of nuclear medicine and molecular imaging**, v. 45, n. 8, p. 1329-1334, 2018a.

RAHBAR, K.; AFSHAR-OROMIEH, A.; SEIFERT, R.; WAGNER, S. *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, n. 12, p. 2055-2061, 2018b.

RAJPOOT, K.; TEKADE, R. K.; SHARMA, M. C.; TEKADE, M. Chapter 2 - Pharmacokinetics and biopharmaceutics: "a leader or attendant". *In*: TEKADE, R. K. (Ed.). **Biopharmaceutics and Pharmacokinetics Considerations**: Academic Press, 2021. v. 1, p. 17-27.

RAUSCHER, I.; KRÖNKE, M.; KÖNIG, M.; GAFITA, A. *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.

RAWLA, P. Epidemiology of prostate cancer. **World journal of oncology**, v. 10, n. 2, p. 63, 2019.

REID, G. L. Residual solvents. *In*: RILEY, C. M.; ROSANSKE, T. W.; REID, G. L. (Ed.) **Specification of Drug Substances and Products**: Elsevier, 2020. 2 ed, p. 345-365.

ROBU, S.; SCHMIDT, A.; EIBER, M.; SCHOTTELIUS, M. *et al.* Synthesis and preclinical evaluation of novel 18 F-labeled Glu-urea-Glu-based PSMA inhibitors for prostate cancer imaging: a comparison with 18 F-DCFPyl and 18 F-PSMA-1007. **EJNMMI research**, v. 8, n. 1, p. 30, 2018.

RUANGMA, A.; KIJPAYOON, S.; NGOKPOL, S. PSMA for PET imaging of prostate cancer. **The Bangkok Medical Journal**, v. 14, n. 2, p. 95-95, 2018.

SAHA, G. B. **Fundamentals of nuclear pharmacy**. Springer, 6 ed, 2010.

SANTIAGO, M.; STROBEL, S. Thin layer chromatography. **Methods Enzymol**, v. 533, p. 303-324, 2013.

SBOC – SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA CLÍNICA. Próstata: Doença Avançada. *In: Diretrizes de tratamentos oncológicos recomendados pela Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica*, 2021a. Disponível em: <<https://www.s boc.org.br/images/15.-Diretrizes-SBOC-2021---Prstata-avanado-FINAL.pdf>> Acesso em 7 set. 2021.

SBOC – SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA CLÍNICA. Próstata: Doença Localizada. *In: Diretrizes de tratamentos oncológicos recomendados pela Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica*, 2021b. Disponível em: <<https://www.s boc.org.br/images/22.-Diretrizes-SBOC-2021---Prstata-localizado-FINAL.pdf>> Acesso em 7 set. 2021.

SBPC – SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA. Posicionamento Oficial da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) e da Sociedade Brasileira de Urologia (SBU) sobre Rastreamento de Câncer de Próstata. 2018. Disponível em: <<http://www.s bpc.org.br/noticias-e-comunicacao/posicionamento-da-sbpcml-e-sbu-sobre-rastreamento-de-cancer-de-prostata/>>. Acesso em 21 fev 2021.

SCHMIDKONZ, C.; CORDES, M.; BECK, M.; GOETZ, T. I. *et al.* SPECT/CT with the PSMA ligand ^{99m}Tc-MIP-1404 for whole-body primary staging of patients with prostate cancer. **Clinical nuclear medicine**, v. 43, n. 4, p. 225-231, 2018.

SCHOTTELIUS, M.; WIRTZ, M.; EIBER, M.; MAURER, T. *et al.* [¹¹¹In] PSMA-I&T: expanding the spectrum of PSMA-I&T applications towards SPECT and radioguided surgery. **EJNMMI research**, v. 5, n. 1, p. 1-5, 2015.

SCHWENCK, J.; REMPP, H.; REISCHL, G.; KRUCK, S. *et al.* Comparison of (⁶⁸Ga)-labelled PSMA-11 and (¹¹C)-choline in the detection of prostate cancer metastases by PET/CT. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, v. 44, n. 1, p. 92-101, 2017.

SHAMNI, O.; NEBELING, B.; GRIEVINK, H.; MISHANI, E. Fine-tuning of the automated [¹⁸F] PSMA-1007 radiosynthesis. **Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals**, v. 62, n. 6, p. 252-258, 2019.

SHERAZ, M.; KHAN, M. F.; AHMED, S.; KAZI, S. H. *et al.* Stability and stabilization of ascorbic acid. **Househ. Pers. Care Today**, v. 10, p. 22-25, 2015.

SILVA, J. d. J. **Radiomarcção de inibidor de PSMA com ¹⁷⁷Lu e avaliação biológica do potencial para aplicação no tratamento do câncer de próstata**. 2017. p. 64. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

SIMAL, C. J. R. Imagem molecular. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 21. 3, p. 307 - 318, 2011.

SOEDA, F.; WATABE, T.; NAKA, S.; LIU, Y. *et al.* Impact of 18F-PSMA-1007 uptake in prostate cancer using different peptide concentrations: preclinical PET/CT study on mice. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 60, n. 11, p. 1594-1599, 2019.

SOLOMONS, T.; FRYHLE, C. **Química Orgânica**. 10 ed. v. 1. LTC, Rio de Janeiro, 2012. p. 440.

SPRUTE, K.; KRAMER, V.; KOERBER, S. A.; MENESES, M. *et al.* Diagnostic Accuracy of 18F-PSMA-1007 PET/CT Imaging for Lymph Node Staging of Prostate Carcinoma in Primary and Biochemical Recurrence. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 62, n. 2, p. 208-213, 2021.

STORPIRTIS, S.; GAI, M. N.; CAMPOS, D. R. d.; GONÇALVES, J. E. Farmacocinética básica e aplicada. *In: Farmacocinética básica e aplicada*, 2011. cap. 1, p. 3-4.

SU, H.-C.; ZHU, Y.; LING, G.-W.; HU, S.-L. *et al.* Evaluation of 99mTc-labeled PSMA-SPECT/CT imaging in prostate cancer patients who have undergone biochemical relapse. **Asian journal of andrology**, v. 19, n. 3, p. 267, 2017.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M. *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.

SUZUKI, Y.; YEUNG, A. C.; IKENO, F. Importância dos estudos pré-clínicos em animais de experimentação para a cardiologia intervencionista. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia [online]**, v. 91, n. 5, p. 348-360, 2008.

TATEISHI, U. Prostate-specific membrane antigen (PSMA)-ligand positron emission tomography and radioligand therapy (RLT) of prostate cancer. **Japanese journal of clinical oncology**, v. 50, n. 4, p. 349-356, 2020.

TILSEN, F.; REINERT, S.; SCHÄFER, J. F.; LA FOUGÈRE, C. *et al.* Value of 18F-PSMA-PET/MRI for Assessment of Recurring Ranula. **Diagnostics**, v. 11, n. 8, p. 1462, 2021.

TREGLIA, G.; ANNUNZIATA, S.; PIZZUTO, D. A.; GIOVANELLA, L. *et al.* Detection Rate of (18)F-Labeled PSMA PET/CT in Biochemical Recurrent Prostate Cancer: A Systematic Review and a Meta-Analysis. **Cancers**, v. 11, n. 5, p. 710, 2019.

UMBRICHT, C. A.; BENEŠOVÁ, M.; SCHMID, R. M.; TÜRLER, A. *et al.* 44Sc-PSMA-617 for radiotheragnostics in tandem with 177Lu-PSMA-617—preclinical investigations in comparison with 68Ga-PSMA-11 and 68Ga-PSMA-617. **EJNMMI Research**, v. 7, n. 1, p. 9, 2017.

USP – UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. **Fludeoxyglucose F 18 Injection**. Rockville, 2018, 21 ed, v. 1, p. 1794-1795.

VARGA, J. Chapter 12 - An Introduction to Nuclear Medicine. *In: KÓNYA, J. e NAGY, N. M. (Ed.). Nuclear and Radiochemistry (Second Edition)*: Elsevier, 2018. p. 369-397.

VENKATESH, M.; KANG, K. W. Medicine: Radionuclides Used in Nuclear Medicine. In: GREENSPAN, E. (Ed.). **Encyclopedia of Nuclear Energy**. Oxford: Elsevier, 2021. p. 236-260.

VIVALDINI, B. F. **Avaliação da especificidade biológica do radiofármaco PSMA-HBED-CC-68Ga em modelos tumorais in vitro e in vivo**. 2020. p. 80. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

WANG, Z.; TIAN, R.; NIU, G.; MA, Y. *et al.* Single Low-Dose Injection of Evans Blue Modified PSMA-617 Radioligand Therapy Eliminates Prostate-Specific Membrane Antigen Positive Tumors. **Bioconjugate Chemistry**, v. 29, n. 9, p. 3213-3221, 2018.

WATABE, T.; UEMURA, M.; SOEDA, F.; NAKA, S. *et al.* High detection rate in [18 F] PSMA-1007 PET: interim results focusing on biochemical recurrence in prostate cancer patients. **Annals of Nuclear Medicine**, v. 35, n. 4, p. 523-528, 2021.

WEINEISEN, M.; SCHOTTELIUS, M.; SIMECEK, J.; BAUM, R. P. *et al.* 68Ga-and 177Lu-labeled PSMA I&T: optimization of a PSMA-targeted theranostic concept and first proof-of-concept human studies. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 56, n. 8, p. 1169-1176, 2015.

WESTER, H.-J.; SCHOTTELIUS, M., PSMA-targeted radiopharmaceuticals for imaging and therapy. **Elsevier**. v. 49, n. 4, p. 302-312, 2019.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Estimated number of new cases from 2020 to 2040**. Global Cancer Observatory (GCO), 2020. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/>>. Acesso em: 03 jan. 2022.

WIECZOREK VILLAS BOAS, C. A. **Obtenção de kit de PSMA-617 para pronta marcação com lutécio-177 e sua avaliação na aplicabilidade no tratamento do câncer de próstata**. 2020. p. 150. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

WITKOWSKA-PATENA, E.; GIZEWSKA, A.; DZIUK, M.; MISKO, J. *et al.* Head-to-head comparison of 18F-prostate-specific membrane antigen-1007 and 18F-fluorocholine PET/CT in biochemically relapsed prostate cancer. **Clinical nuclear medicine**, v. 44, n. 12, p. e629-e633, 2019.

WITKOWSKA-PATENA, E.; GIŻEWSKA, A.; DZIUK, M.; MIŚKO, J. *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.

WONDERGEM, M.; VAN DER ZANT, F. M.; BROOS, W. A.; KNOL, R. J. Matched-pair comparison of 18F-DCFPyL PET/CT and 18F-PSMA-1007 PET/CT in 240 prostate cancer patients; inter-reader agreement and lesion detection rate of suspected lesions. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 62, n. 10, p. 1422-1429, 2021.

WURZER, A.; DI CARLO, D.; SCHMIDT, A.; BECK, R. et al. Radiohybrid Ligands: A Novel Tracer Concept Exemplified by ¹⁸F- or ⁶⁸Ga-Labeled rhPSMA Inhibitors. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 61, n. 5, p. 735-742, 2020.

ZECHMANN, C. M.; AFSHAR-OROMIEH, A.; ARMOR, T.; STUBBS, J. B. et al. Radiation dosimetry and first therapy results with a ¹²⁴I/¹³¹I-labeled small molecule (MIP-1095) targeting PSMA for prostate cancer therapy. **European journal of nuclear medicine and molecular imaging**, v. 41, n. 7, p. 1280-1292, 2014.

ZHOU, X.; LI, Y.; JIANG, X.; WANG, X. 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, n. 585213, 2021.

ZLATOPOLSKIY, B. D.; ENDEPOLS, H.; KRAPP, P.; GULIYEV, M. et al. Discovery of [¹⁸F] PSMA-7, a novel PET-probe for the detection of small PSMA positive lesions. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 60, n. 6, p. 817-823, 2018.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.
