

CENTRO ESTADUAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA PAULA SOUZA
FACULDADE DE TECNOLOGIA DE CAMPINAS
CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

RODRIGO GODOY

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA DE
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA
CONTROLE DE QUALIDADE DE RADIOFÁRMACO ^{18}F
PSMA-1007**

CAMPINAS/SP
2023

CENTRO ESTADUAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA PAULA SOUZA
FACULDADE DE TECNOLOGIA DE CAMPINAS
CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

RODRIGO GODOY

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA DE
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA
CONTROLE DE QUALIDADE DE RADIOFÁRMACO ¹⁸F-
PSMA-1007**

Trabalho de Graduação apresentado por Rodrigo Godoy, como pré-requisito para a conclusão do Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos, da Faculdade de Tecnologia de Campinas, elaborado sob a orientação da Prof.^a Dra. Fabiana Cristina Andrade Corbi

CAMPINAS/SP
2023

FICHA CATALOGRÁFICA
CEETEPS - FATEC Campinas - Biblioteca

G589v

GODOY, Rodrigo

Validação de metodologia analítica de cromatografia líquida de alta eficiência para controle de qualidade de radiofármaco 18F PSMA-1007. Rodrigo Godoy. Campinas, 2023.

52 p.; 30 cm.

Trabalho de Graduação do Curso de Processos Químicos
Faculdade de Tecnologia de Campinas.

Orientador: Profa. Dra. Fabiana Cristina Andrade Corbi.

1. Validação. 2. Radiofármaco. 3. Metodologia. I. Autor. II. Faculdade de Tecnologia de Campinas. III. Título.

CDD 544

Catálogo-na-fonte: Bibliotecária: Aparecida Stradiotto Mendes – CRB8/6553

TG PQ 23.1

Rodrigo Godoy

Validação de metodologia analítica de cromatografia líquida de alta eficiência para controle de qualidade de radiofármaco ^{18}F PSMA-1007

Trabalho de Graduação apresentado como exigência parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos, pelo CEETEPS / Faculdade de Tecnologia – Fatec Campinas.

Campinas, 23 de junho de 2023.

BANCA EXAMINADORA

da corbi

Profa. Fabiana Cristina Andrade Corbi
Fatec Campinas

AMS

Prof. Aurimar Moreira Reis
Fatec Campinas

Luciene

Profa. Luciene Maria Garbuio Castello Branco
Fatec Campinas

RESUMO

A validação da metodologia analítica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para o controle de qualidade do radiofármaco ¹⁸F-PSMA-1007 foi realizada utilizando um processo essencial, que envolve a determinação de parâmetros de desempenho, estudos de robustez e estabilidade, seletividade, linearidade, precisão, exatidão e limites de detecção e quantificação. A partir dos parâmetros utilizados, foi possível garantir a segurança e a eficácia dos radiofármacos que são utilizados em exames de imagem molecular de próstata, além da metodologia atender os requisitos obrigatórios da norma regulamentadora RDC 166. Os resultados demonstraram que o método empregado é eficaz para a determinação da impureza, mas não apresentou um grau de robustez confiável, o que não inviabiliza a utilização deste método, mas obriga o acompanhamento dos parâmetros definidos na robustez que não tiveram um desempenho satisfatório, como a variação da concentração do gradiente e a coluna de fabricantes diferentes. Para os demais parâmetros exigidos, o método demonstrou um alto grau de confiabilidade.

Palavras-chave: validação; radiofármaco; metodologia.

ABSTRACT

The validation of the analytical methodology of high performance liquid chromatography (HPLC) for the quality control of the radiopharmaceutical ^{18}F -PSMA-1007 was carried out using an essential process, which involves the excellence of performance standards, studies of robustness and stability, selectivity, linearity, precision, accuracy and limits of detection and quantification. From the parameters used, it was possible to guarantee the safety and efficacy of the radiopharmaceuticals that are used in molecular imaging tests of the prostate, the methodology meeting the mandatory requirements of the regulatory standard RDC 166. The results proved that the applied method is also effective for the impurity projected, but did not present a reliable degree of robustness, which does not make the use of this method unfeasible, but requires the monitoring of the parameters defined in the robustness that did not have a projected performance, such as the variation in the concentration of the gradient and the column of different manufacturers. For the other required parameters, the method demonstrated a high degree of reliability.

Keywords: validation; radiopharmaceutical; methodology.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Reação de substituição nucleofílica direta | 14 |
| Figura 2 - Parâmetros de validação..... | 15 |
| Figura 3 - Sistema representativo da cromatografia líquida de alta eficiência | 16 |
| Figura 4 - Condições para a avaliação da robustez do método..... | 23 |
| Figura 5 - Sistema gradiente HPLC..... | 27 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Gráfico 1 – Gráfico de regressão linear PSMA-Precursor. | 38 |
| Gráfico 2 – Gráfico de resíduos PSMA-Precursor. | 39 |
| Gráfico 3 – Gráfico de regressão linear PSMA-OH. | 40 |
| Gráfico 4 – Gráfico de resíduos PSMA-OH. | 40 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1 - Análises do [18F]-PSMA-1007 | 15 |
| Quadro 2 - Dados para cálculo LD e LQ para PSMA-Precursor..... | 36 |
| Quadro 3 - Dados para cálculo LD e LQ para PSMA-OH. | 36 |
| Quadro 4 - Parâmetro e critérios de aceitação seletividade. | 36 |
| Quadro 5 – Dados diluentes sem padrões. | 37 |
| Quadro 6 – Dados diluentes com padrão PSMA-Precursor..... | 37 |
| Quadro 7 – Dados diluentes com padrão PSMA-OH. | 37 |
| Quadro 8 – Parâmetro e critérios de aceitação seletividade..... | 37 |
| Quadro 9 – Dados linearidade PSMA-Precursor. | 38 |
| Quadro 10 – Dados linearidade PSMA-OH..... | 39 |
| Quadro 11 – Parâmetro e critérios de aceitação linearidade. | 40 |
| Quadro 12 – Dados repetibilidade PSMA-precursor. | 41 |
| Quadro 13 – Dados repetibilidade PSMA-OH..... | 41 |
| Quadro 14 – Parâmetros e critérios de aceitação de repetibilidade..... | 41 |
| Quadro 15 – Dados Precisão Intermediária PSMA-Precursor. | 42 |
| Quadro 16 – Dados Precisão Intermediária PSMA-OH. | 42 |
| Quadro 17 – Parâmetro e critérios de aceitação precisão intermediária. | 42 |
| Quadro 18 – Dados exatidão PSMA-Precursor. | 43 |
| Quadro 19 – Dados Precisão Intermediária. | 43 |
| Quadro 20 – Parâmetros e critérios de aceitação e exatidão..... | 43 |
| Quadro 21 – Dados robustez PSMA-Precursor área..... | 44 |
| Quadro 22 – Dados robustez PSMA-OH área. | 45 |
| Quadro 23 – Dados robustez PSMA-Precursor tempo de retenção. | 46 |
| Quadro 24 – Dados robustez PSMA-OH tempo de retenção..... | 47 |
| Quadro 25 – Parâmetros e critérios de aceitação robustez..... | 47 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Reagentes utilizados..... | 24 |
| Tabela 2 - Condição cromatográfica. | 26 |
| Tabela 3 - Variação do Gradiente..... | 27 |

LISTA DE ABREVIACÕES

| | |
|------------------------------|---|
| PET | Tomografia por emissão do psitron |
| CT | Tomografia computadorizada |
| [¹⁸ F]-PSMA-1007 | Radiofármaco antígeno de membrana específico da próstata |
| ¹⁸ F-FDG | Radiofármaco Fludesoxiglicose |
| PSMA | Antígeno de membrana específico da próstata |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|--------------------|---------------------------|
| ^{121}I | Iodo radioativo |
| ^{131}I | Iodo radioativo |
| ^{99}M | Molibdênio radioativo |
| ^{18}F | Flúor radioativo |
| β^+ | Póstron de carga positiva |
| C18 | Molécula com 18 carbonos |
| mL/mim | Mililitro por minuto |
| μL | Microlitro |
| nm | Nanômetro |
| $^{\circ}\text{C}$ | Graus Celso |

Sumário

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 10 |
| 1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO | 10 |
| 1.2 JUSTIFICATIVA | 11 |
| 1.3 OBJETIVO | 11 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 12 |
| 2.1 RADIOFÁRMACOS | 12 |
| 2.2 RADIOFÁRMACO PSMA | 12 |
| 2.3 FABRICAÇÃO 18F PSMA-1007 | 13 |
| 2.4 CONTROLE DE QUALIDADE | 14 |
| 2.4.1 Controle de qualidade de radiofármacos | 14 |
| 2.4.2 Controle de qualidade PSMA | 15 |
| 2.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA | 16 |
| 2.6 MÉTODOS DE SEPARAÇÃO | 17 |
| 2.7 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA | 18 |
| 2.8 NORMATIVA RDC 166 | 19 |
| 2.8.1 Seletividade/Especificidade | 19 |
| 2.8.2 Linearidade | 20 |
| 2.8.3 Precisão | 20 |
| 2.8.4 Exatidão | 21 |
| 2.8.5 Limite de Detecção e Quantificação | 22 |
| 2.8.6 Robustez | 22 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 24 |
| 3.1 EQUIPAMENTOS | 24 |
| 3.2 REAGENTES | 24 |
| 3.3 SOLUÇÕES | 25 |
| 3.3.1 Solução Água/Etanol (60:40) | 25 |
| 3.3.2 Solução A | 25 |
| 3.3.3 Solução diluente PSMA | 25 |
| 3.3.4 Solução fosfato de sódio 0,02M | 25 |
| 3.3.5 Solução padrão PSMA – standard 0,1 mg/ml | 25 |
| 3.3.6 Solução padrão PSMA – precursor 0,1 mg/ml | 25 |
| 3.3.7 Solução padrão PSMA – OH 0,1 mg/ml | 26 |
| 3.4 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS | 26 |
| 3.5 PREPARO DE PADRÕES E AMOSTRA | 27 |
| 3.5.1 Preparo de solução padrão de calibração | 27 |

| | |
|--|-----------|
| 3.5.2 Preparo de solução padrão de Linearidade..... | 28 |
| 3.5.3 Preparo de solução padrão de Exatidão | 29 |
| 3.5.4 Preparo de solução padrão de Robustez..... | 29 |
| 3.5.5 Preparo de solução padrão de Seletividade | 29 |
| 3.5.6 Preparo de solução padrão de Repetibilidade..... | 29 |
| 3.5.7 Preparo de solução padrão de Precisão intermediária..... | 29 |
| 5 RESULTADO E DISCUSSÃO | 30 |
| 5.1 LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO..... | 30 |
| 5.2 SELETIVIDADE..... | 30 |
| 5.3 LINEARIDADE | 30 |
| 5.4 PRECISÃO | 31 |
| 5.5 EXATIDÃO | 31 |
| 5.6 ROBUSTEZ..... | 31 |
| 6 CONCLUSÃO | 32 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 33 |
| APÊNDICE A - Dados e cálculos do limite de detecção e quantificação. | 36 |
| APÊNDICE B - Dados e cálculos de seletividade. | 37 |
| APÊNDICE C - Dados, cálculos e gráficos da Linearidade. | 38 |
| APÊNDICE D - Dados e cálculos de precisão (Repetibilidade)..... | 41 |
| APÊNDICE E - Dados e cálculos de precisão (Precisão intermediária). | 42 |
| APÊNDICE F - Dados e cálculos da exatidão..... | 43 |
| APÊNDICE G - Dados da Robustez..... | 44 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

Atualmente a medicina nuclear e a utilização de radionuclídeos para diagnóstico e tratamento oncológico são amplamente conhecidas, como por exemplo as imagens de tomografia por emissão do pósitron associado à tomografia computadorizada (PET/CT). Tendo sua origem em 1925, com Hermann Blumgart, em que realizou o primeiro procedimento médico utilizando materiais radioativos para diagnóstico pró-celular. No mesmo ano, Otto C. Yens desenvolveu o primeiro instrumento que possibilitava o diagnóstico, detectando indicadores radioativos (PATTON, 2003; ROBILOTTA, 2006; CRF-SP, 2019).

No ano de 1945 o Laboratório Nacional Oak Ridge, nos Estados Unidos, anunciou a disponibilidade de produção dos radionuclídeos à iniciativa privada, e assim, o Laboratório Nacional Brookhaven passou a produzir o iodo-121 (^{121}I), o primeiro radiofármaco utilizado para o estudo da tireoide. Após produção, observou-se que os produtos não seguiam requisitos para comprovação de sua esterilidade e apirogenicidade. Com o passar do tempo, parâmetros mais rígidos foram adotados, com a compra da produção de radionuclídeos do Laboratório Nacional Brookhaven pelo Laboratório Abbot transformou a produção de radionuclídeos supracitados para a produção de radiofármaco, sendo assim o primeiro produtor mundial. Só em 1950 iniciou a comercialização do primeiro radiofármaco o iodo-131 (^{131}I) (CRF-SP, 2019).

Em 1957, mais dois radionuclídeos foram desenvolvidos, como o molibdênio-99 (^{99}M) e o tecnécio-99 metaestável ($^{99\text{m}}\text{Tc}$). O $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ficou conhecido como o elemento 43 e ainda, até os dias de hoje, é o mais utilizado na medicina nuclear na marcação de liofilizados (CRF-SP, 2019).

No Brasil, o órgão CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) em conjunto com a Universidade de São Paulo (USP), criaram em 1957 o Instituto de Energia Atômica (IEA). Após três anos de sua criação, em 1959, iniciou-se a produção do radiofármaco ^{131}I , para diagnóstico e terapia de doenças da tireoide. Em 1963 o IEA, com as normas farmacêuticas consolidadas, começava sua rotina de produção de radionuclídeos e radiofármacos. Atualmente o instituto é conhecido como IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares) (CARVALHO, 2011; CRF-SP, 2019).

Até 2006 a Constituição Federal garantia ao poder público a exclusividade na exploração e produção de radioisótopos em território nacional, porém com o aumento da

demanda do uso de radiofármacos, foi aprovada a Emenda Constitucional nº 49 de 8 de fevereiro de 2006, que permitiu à indústria privada produzir e comercializar de radiofármacos e radioisótopos de meia vida curta (SANTOS-OLIVEIRA, 2008). Hoje há onze instalações autorizadas, sendo duas governamentais.

1.2 JUSTIFICATIVA

A critério de exigência na produção de medicamentos, pelo qual, passará por análise físico-química e microbiológica, deve cumprir as normas de validação descritas pela RDC166/17, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), quando comparada com norma anterior (RE 899/07) percebe-se avanços em suas atualizações. Outro requisito importante a ser levado em consideração são as Boas Práticas de Fabricação (BPF), pela qual assegura a qualidade de um produto farmacêutico, e assim, garantindo que os resultados analíticos sejam confiáveis, endossando a liberação de um fármaco com qualidade e eficácia.

1.3 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi a validação da metodologia de análise cromatografia líquida de alta eficiência do radiofármaco [^{18}F]-PSMA-1007, descrita na Farmacopeia Europeia, seguindo normas da RDC 166/17 e exigências do órgão Anvisa.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 RADIOFÁRMACOS

Radiofármacos são moléculas ligadas à um radioisótopo (exemplo: ^{18}F). Essas substâncias são utilizadas nos exames de diagnóstico e tratamento de tumores, não tendo ação farmacológica. A constituição radionuclídica de um radiofármaco irá definir se este será utilizado para um diagnóstico ou para um tratamento (OLIVEIRA, 2006).

Radioisótopos são elementos químicos com núcleo instável e para alcançar a estabilidade emitem radiação, que podem ser do tipo alfa (α), beta (β) e gama (γ). Os radioisótopos, também conhecido como radionuclídeos, são produzidos artificialmente em sua grande maioria, chegando a ter mais de 3000 radioisótopos conhecidos. A produção destes materiais pode ocorrer através de reatores e aceleradores, expondo um alvo a bombardeamento de nêutrons ou prótons (KAPLAN, 1978).

Radionuclídeos de meia-vida curta, como o ^{18}F -FDG e o ^{67}Ga -citrato de gálio, são emissores de radiação β^+ e tem a finalidade de gerar imagem em PET/CT, para diagnóstico de áreas de tumores. O ^{18}F -FDG detecta tumores na cabeça, pescoço, pulmões, linfomas e é através deste exame que é possível estudar o metabolismo do cérebro e do coração. O ^{67}Ga -citrato de gálio tem a finalidade de detectar tumores primários como linfomas, tumores nos pulmões e melanoma, assim como a localização de doença inflamatória aguda e infecções (OLIVEIRA, 2006).

Os radionuclídeos de meia-vida longa, como ^{131}I iodeto de sódio e ^{32}P -ortafostato de sódio, são empregados no tratamento do hipertireoidismo, carcinomas papilar e folicular da tireoide e tratamento paliativo para dores nas metástases ósseas, sendo que este último tratamento é possibilitado através do uso de ^{32}P -ortafostato de sódio (OLIVEIRA, 2006).

2.2 RADIOFÁRMACO PSMA

O diagnóstico do câncer de próstata e o seu manejo no tratamento estão em constante evolução. A busca por marcadores que possam identificar e localizar uma lesão é fundamental para o prognóstico do tratamento dos pacientes. O PSMA (Antígeno Específico da Membrana da Próstata) é uma glicoproteína de membrana que funciona como uma glutamato carboxipeptidase/folato hidrosale que está super-expressa no câncer de próstata. A propensão de metástases e a recidiva dos pacientes que foram submetidos à prostatectomia, uma vez que as

metástases apresentam as mesmas células de PSMA provenientes do tumor primário de próstata (ROWE, et al., 2016).

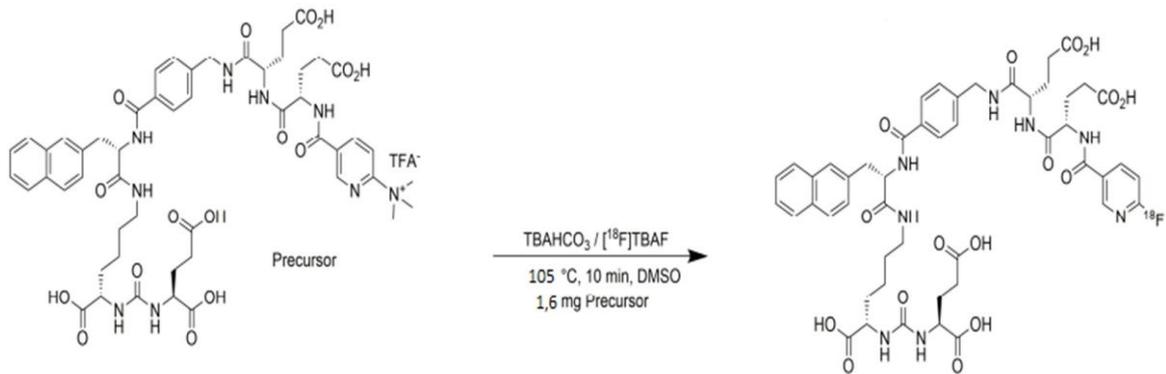
2.3 FABRICAÇÃO ^{18}F PSMA-1007

A Fabricação do ^{18}F PSMA-1007 inicia-se com a irradiação de prótons, ou também chamada de irradiação do ciclotron, onde o próton é irradiado em um alvo de água enriquecida. Essa água tem por característica o oxigênio (^{18}O), um isótopo do oxigênio (^{16}O), onde esse isótopo tem em sua constituição estrutural 8 prótons e 10 nêutrons. O próton é proveniente do gás hidrogênio (H_2), que recebe uma alta voltagem, transformando-se em um prisma, sendo arremessado da fonte de íons para o centro do tanque do ciclotron, onde H^- será acelerado através de dipolos magnéticos que o direcionarão por todo percurso até o porta-alvo. O prisma, quando se aproxima do porta alvo, passa por uma folha de carbono (foil), que realizará a remoção dos elétrons e direcionará o feixe de prótons H^+ para o porta alvo. Quando o próton do hidrogênio atinge o núcleo do ^{18}O , esse próton se fixa nesse núcleo expulsando um nêutron, onde desta forma ocorre a formação do elemento sintético fluoreto (^{18}F). A reação nuclear pode ser observada na equação abaixo (Equação 1) (SCHIRRMACHE, 2011).



Na finalização da irradiação, a água enriquecida com $^{18}\text{F}^-$ é enviada para um reator chamado de sintetizador, onde passa por uma coluna de troca iônica retendo o $^{18}\text{F}^-$. Após toda água enriquecida ter passado pela coluna, utiliza-se uma solução de hidrogenocarbonato de tetrabutylamônia (Concentração: 0,0075 M), que fará o encapsulamento do $^{18}\text{F}^-$, removendo-o da coluna e enviando para o sintetizador, onde será aquecido para evaporação do hidrogenocarbonato de tetrabutylamônia. Nesse momento, temos o início da síntese: adicionando uma alíquota de dimetilsulfóxido e o precursor PSMA-1007. Esta mistura, também denominada solução, é enviada para uma coluna C18, onde, passará pelo processo de substituição nucleofílica direta, em que o grupo amina se liga ao ^{18}F , formando o ^{18}F -PSMA-1007. A substituição nucleofílica pode ser observada na figura 1 (DI IORIO, 2021).

Figura 1 - Reação de substituição nucleofílica direta



Fonte: DI IORIO, 2021.

2.4 CONTROLE DE QUALIDADE

O Controle de qualidade de uma indústria farmacêutica é um requisito indispensável para a obtenção das Boas Práticas de Fabricação (BPF), quando se refere à coleta de amostra, as definições das especificações, realizações de validações analítica e execução das análises.

2.4.1 Controle de qualidade de radiofármacos

O controle de qualidade de uma indústria de radiofármacos, tem como diretriz a verificação da qualidade de um produto, que será utilizado por seres humanos. Apesar da escassez deste tipo de indústria no Brasil, os radiofármacos seguem os critérios iguais de uma indústria farmacêutica convencional, seguindo as normativas e exigências da Anvisa, para a produção e verificação de qualidade de um radiofármaco.

O processo de controle de qualidade de um radiofármaco difere-se de um medicamento convencional, pois no radiofármaco há três tipos de categorias de análise que devem ser realizadas, sendo elas: análises físico-químicas, microbiológicas e radioativas, pelas quais devem seguir parâmetros pré-estabelecidos em normas oficiais como Farmacopeia Brasileira, United States Pharmacopeia e European Pharmacopeia.

Todos os métodos descritos na Farmacopeia devem ser otimizados e desenvolvidos para o laboratório em que será utilizado, levando, conseqüentemente, à validação analítica da metodologia. Toda validação deverá atender as exigências RDC166/17, para que se possa trazer a confiabilidade para os resultados, alcançado nas análises exigidas. Tomando como guia a RDC166/17 temos a figura 2, que definirá quais os parâmetros que devem ser seguidos.

Figura 2 - Parâmetros de validação.

Quadro 1. Parâmetros a serem considerados na validação analítica.

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

⁽¹⁾ Nos casos em que foi conduzida a reprodutibilidade, não é necessário conduzir a precisão intermediária.
⁽²⁾ Nos casos de ensaios de identificação, pode ser necessária a combinação de dois ou mais procedimentos analíticos para atingir o nível necessário de discriminação.
⁽³⁾ Pode ser necessário em alguns casos.

Fonte: RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017

2.4.2 Controle de qualidade PSMA

Para realizar o controle de qualidade do [¹⁸F]-PSMA-1007 foram utilizadas as Farmacopeias Europeia e Brasileira, que descrevem os parâmetros que devem ser observados, procedimentos, análises que devem ser executadas e também seus limites, para que o radiofármaco seja considerado apto para uso.

Para o [¹⁸F]-PSMA-1007 ser considerado apto para uso, este deve ser aprovado nas análises de qualidade, que são divididas em dois grupos, sendo elas análises físico-químicas e análises microbiológicas. O Quadro 1 indica estas análises.

Quadro 1 - Análises do [¹⁸F]-PSMA-1007

| Análise físico-química | Análise microbiológica |
|-------------------------------|---------------------------------|
| Identidade radionuclílica | Esterelidade |
| Pureza radionuclílica | |
| Pureza química | |
| Solventes residuais | Teor de endotoxinas bacterianas |
| Potencial hidrogeniônico (pH) | |

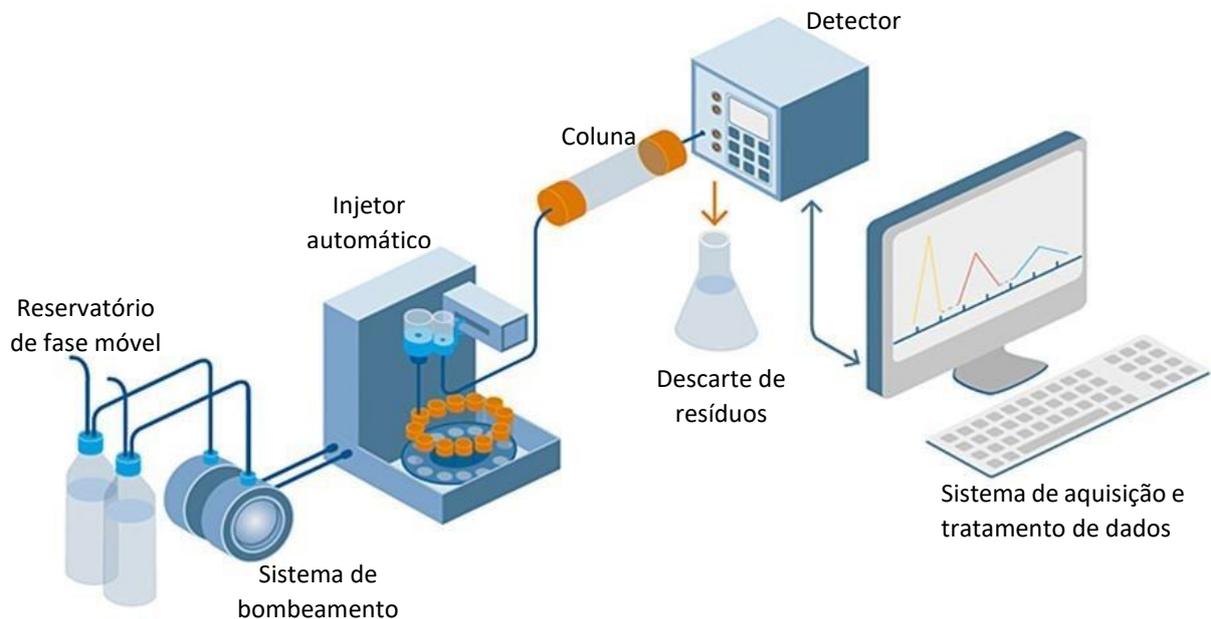
Fonte: Autor

2.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A cromatografia líquida de alta eficiência tem sido altamente utilizada na química analítica, por sua versatilidade em quantificação e qualificação de compostos mais ou menos complexo, em qualquer tipo de amostra, sendo ela dissolvida em um líquido, há a possibilidade de quantificar e identificar com alta precisão (McMaster, 2007; SARGAÇO, 2013). Na figura 03 apresenta um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, com a descrição simplificada dos seus principais componentes.

O sistema de bombeamento pode ser trabalhado de duas maneiras: sistema isocrático e sistema gradiente. No sistema isocrático é bombeado apenas uma fase móvel durante todo o período da análise, e no sistema gradiente, que utiliza mais de uma fase móvel, podendo variar a porcentagem das fases móveis durante a corrida. A bomba cria um aumento da pressão no sistema que é controlado através de um medidor, em um fluxo específico (ml/min), podendo ser alterado dependendo do tipo de coluna utilizada e da configuração do próprio sistema (McMaster, 2007; SARGAÇO, 2013).

Figura 3 - Sistema representativo da cromatografia líquida de alta eficiência



Fonte: Analytical Methods, High performance liquid chromatography, The Lindle Group, 2013, consultado em 06 de Abril de 2022: http://hiq.lindegas.com/en/analytical_methods/liquid_chromatography/high_performance_liquid_chromatography.html

O sistema de injeção automática, realiza a coleta da amostra líquida e a dispensa em um loop de capacidade conhecida, então a amostra é transferida para o caminho da fase móvel, onde, será encaminhada para a coluna cromatográfica (McMaster, 2007; SARGAÇO, 2013).

A coluna, também conhecida como fase estacionária, é onde se inicia a separação dos compostos da amostra por mecanismos de interação moleculares entre estes, e com a interação fase móvel e fase estacionária. As colunas podem oferecer diferentes tipos de interação, podendo assim, realizar a separação por partição, absorção ou troca iônica, dependendo do tipo de material em que a coluna é composta e dos analitos analisados. Entender o tipo de mecanismo que a coluna trabalha é de extrema importância para que se realize uma separação satisfatória dos compostos da amostra. A característica do material de enchimento da coluna afeta a separação do analito, seletividade e resolução cromatográfica (McMaster, 2007; SARGAÇO, 2013).

A partir da separação dos compostos da coluna, a fase móvel continua sendo bombeada até o analito chegar no detector, que será escolhido dependendo da amostra analisada, para uma melhor resolução, e assim respondendo as mudanças de concentração de todos analitos presentes (McMaster, 2007; SARGAÇO, 2013).

O detector é responsável por emitir um sinal que é recebido por um sistema computadorizado, que processa de forma a gerar um cromatograma, onde, pode se distinguir diferentes analitos e diferentes tempos de retenções, possibilitando a identificação do analito e a quantificação com a respectivas áreas apresentadas. O software que realiza o processamento dos dados também é responsável por permitir a realização de parâmetros operacionais como fluxo da fase móvel e volume de injeção da amostra (McMaster, 2007; SARGAÇO, 2013).

2.6 MÉTODOS DE SEPARAÇÃO

O método de separação é definido pelo tipo de material que é constituído a coluna cromatográfica, sendo a separação por partição uma das mais utilizadas. No caso deste tipo de separação, a polaridade do analito da amostra, da fase móvel e da fase estacionária, determina o tempo de retenção dos diferentes analitos, que interagiram com a coluna (CHAMPION, 2009; SARGAÇO, 2013).

Os dois tipos de separações por partição são: NP-HPLC, separação por fase normal, e RP-HPLC, separação por fase reserva. No tipo separação por fase normal, há uma elevada

polaridade na fase estacionaria, já a fase móvel possui baixa polaridade, obtendo uma baixa interação com a coluna, sendo os primeiros a serem eluídos (CHAMPION, 2009).

Na separação por fase reserva as características são invertidas, onde, a fase móvel passa a ter uma alta polaridade e a fase estacionaria uma baixa polaridade. A polaridade da fase estacionaria, neste caso, é dada pela utilização de sílica modificada quimicamente, promovendo assim, uma ligação de cadeias de hidrocarbonetos hidrofóbicos, podendo ter cadeias que variam em uma faixa de oito a dezoito átomos de carbono, aumentando a característica hidrofóbica da coluna (ENGELHARDT, 2011; CLAESSENS, 2001).

A corrida cromatográfica no modo de separação RP-HPLC se comporta da seguinte maneira: compostos com polaridade baixa passam por mais tempo retidos na coluna, por terem uma baixa afinidade com a fase móvel e uma alta afinidade com a fase estacionaria; já os compostos com maior polaridade são eluídos pela fase móvel, por possuir maior compatibilidade com estes compostos (CHAMPION, 2009).

A técnica de separação RP-HPLC, tem mais de 80% na aplicabilidade dos métodos envolvidos em HPLC. A maior abrangência deste método de separação é devido aos vários mecanismos de separação possíveis de executar com base em interações hidrofóbicas e hidrofílicas, junto com a grande quantidade de fase estacionaria de alta qualidade, permitindo que este método realize a separação de uma grande variedade de substâncias (CHAMPION, 2009; CLAESSENS, 2001).

2.7 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA

A validação de uma metodologia analítica tem como prática trazer a legitimidade do método desenvolvido e equipamento utilizado, com a evidência documental dos parâmetros rigorosos pré-estabelecidos, podendo garantir, desta forma, que o processo produtivo mantenha a uniformidade, mantendo o nível de qualidade dentro dos limites estabelecidos (VALENTINI, 2007).

Uma metodologia validada está atrelada ao equipamento e há um único tipo de concentração daquela amostra, sendo que, ao mudar o equipamento e a concentração de uma amostra, a metodologia deverá ser validada novamente. A validação parcial deve ocorrer apenas quando há transferência da metodologia de um laboratório da mesma instituição, não sendo aceita uma validação que tenha ocorrido em um outro laboratório (GARFIELD, 2004; MORETTO, 2000).

2.8 NORMATIVA RDC 166

A normativa RDC N° 166, DE 24 DE JULHO DE 2017, tem como objetivo estabelecer os critérios adotados para uma validação da metodologia analítica, utilizada na produção de insumos farmacêuticos e medicamentos (ANVISA RDC n.166, 2017).

2.8.1 Seletividade/Especificidade

A seletividade tem por necessidade ser o primeiro parâmetro a ser avaliado ao iniciar uma validação de metodologia analítica. A importância deste parâmetro é fundamental para que se entenda como os demais parâmetros como linearidade, precisão e exatidão e irão se comportar. No caso de um método que será validado, não obter parâmetros satisfatórios de seletividade comprometerá os demais parâmetros (ANVISA RDC n.166, 2017; DE SOUSA NUNES, 2005; SARGAÇO, 2013).

O objetivo da seletividade em uma validação é a capacidade de demonstrar que o método analítico empregado tem a capacidade de identificar e quantificar o analito de interesse, mesmo que a amostra apresente outros componentes, como matriz, impureza e diluentes. A critério de especificidade de um método, a garantia de que o sinal medido tenha a origem apenas no analito de interesse. Desta forma, para o método ser considerado seletivo, deve-se possuir várias respostas de diversos analito em uma matriz e conseguir distinguir a resposta de um componente de outro. No entanto, o método é específico quando responde apenas a um analito da matriz (ANVISA RDC n.166, 2017; DE SOUSA NUNES, 2005; SARGAÇO, 2013).

A seletividade proporciona a possibilidade de visualizar interferências que possam ocorrer por meio de componentes da matriz, podendo levar à amplificação ou diminuição do sinal instrumental e/ou resposta instrumental do analito. Há algumas maneiras de obtenção da seletividade, sendo ela por adição de padrão ou a comparação de matriz com e sem o analito de interesse (ANVISA RDC n.166, 2017; DE SOUSA NUNES, 2005; SARGAÇO, 2013).

O caso do método por adição de padrão, a recuperação deve ser avaliada através da equação 2. Os valores para que um método seja considerado seletivo deve estar entre 80% e 120 % de recuperação (ANVISA RDC n.166, 2017; DE SOUSA NUNES, 2005; SARGAÇO, 2013).

$$\%Recuperação = \frac{[AF] - |A|}{|P| * 100}$$

Equação 2

Onde: $|AF/|$ é a concentração da amostra com padrão; $|A|$ a concentração de amostra; $|P|$ o incremento de concentração esperado pela adição do padrão.

2.8.2 Linearidade

A linearidade em um método analítica é demonstrada pela capacidade analítica de obter uma resposta satisfatória diretamente proporcional à concentração do analito de uma amostra, assim, avaliando-a relação da linearidade em toda faixa determinado pelo método. Como critério de avaliação, têm-se a utilização de no mínimo cinco concentrações diferentes da substância química de referência definida, e deve ser realizada em triplicada (ANVISA RDC n.166, 2017; DE SOUSA NUNES, 2005; SARGAÇO, 2013).

Para realizar a avaliação da linearidade de um método, os dados obtidos devem ser apresentados correspondendo todos os critérios, como representação gráfica das respostas em função da concentração do analito, o gráfico dispersão dos resíduos, acompanhado de sua avaliação estatística e equação da reta de regressão de y em x , estimada pelo método dos mínimos quadrados. Avaliação da associação linear entre as variáveis por meio dos coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2). Avaliação da significância do coeficiente angular. A homocedasticidade dos dados deve ser investigada para a utilização do modelo adequado. Nos testes estatísticos, deve ser utilizado um nível de significância de 5% (cinco por cento). O coeficiente de correlação deve estar acima de 0,990. O coeficiente angular deve ser significativamente diferente de zero (ANVISA RDC n.166, 2017).

2.8.3 Precisão

A precisão de uma validação analítica que tem por objetivo a identificação e estimativa dos erros das medidas obtidas através dos resultados das múltiplas análises das amostras. Como é impossível eliminar por completo todos os erros, é preciso conhecer e entender a origem destes erros na validação, para que se possa tentar minimizá-los (ANVISA RDC n.166, 2017; DE SOUSA NUNES, 2005; SARGAÇO, 2013).

Uma metodologia só pode ser considerada precisa, quando os resultados das análises independentes, que são repetidas do mesmo analito e preparadas de maneira, respeitando todos os critérios da metodologia analítica a ser validada, estão com valores próximo aos determinados pelo método. Desta forma, a precisão é determinada a partir da repetibilidade, e deve ser complementada utilizando a precisão intermediária ou reprodutibilidade (ANVISA RDC n.166, 2017; DE SOUSA NUNES, 2005; SARGAÇO, 2013).

A avaliação da precisão é demonstrada pela dispersão dos resultados, que devem ser calculados através da equação 3, que resulta no desvio padrão relativo (DPR) das medidas obtidas (ANVISA RDC n.166, 2017).

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

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

A repetibilidade deve ser capaz de seguir os critérios, como avaliar as amostras sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica. Utilizar, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível ou 6 (seis) réplicas a 100% (cem por cento) da concentração do teste individualmente preparadas (ANVISA RDC n.166, 2017).

A determinação da precisão intermediária deve ser capaz de obedecer aos critérios, como expressar a proximidade entre os resultados obtidos da análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes, realizada por operadores distintos. Contemplar as mesmas concentrações e o mesmo número de determinações descritas na avaliação da repetibilidade (ANVISA RDC n.166, 2017).

A reprodutibilidade deve ser obtida por meio da proximidade dos resultados obtidos em laboratórios diferentes. A reprodutibilidade é aplicável em estudos colaborativos ou na padronização de métodos analíticos para inclusão desses em compêndios oficiais, mediante testes estatísticos adequados (ANVISA RDC n.166, 2017).

2.8.4 Exatidão

A exatidão na validação da metodologia analítica é obtida através por meio dos resultados avaliados de maneira individual em relação ao valor de referência que obtida através da curva de calibração. O valor obtido para comprovar que o método é exato deve ter sido verificado por no mínimo 9 determinações, por meio 3 concentrações: baixa, média e alta, em triplicata por nível, sendo as amostras preparadas de forma independente (ANVISA RDC n.166, 2017; DE SOUSA NUNES, 2005; SARGAÇO, 2013).

A exatidão é calculada pela relação entre concentração média, obtida experimentalmente, e a concentração teórica correspondente, de acordo com a equação 4, deve-se calcular o desvio padrão relativo (DPR) para cada concentração (ANVISA RDC n.166, 2017; DE SOUSA NUNES, 2005; SARGAÇO, 2013).

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concetração média experimental}}{\text{concetração teorica}} * 100 \quad \text{Equação 4}$$

2.8.5 Limite de Detecção e Quantificação

O limite de detecção (LD) em uma amostra apresenta a menor concentração que pode ser detectada nas condições experimentais estabelecidas, mas não poder ser quantificada. O limite de quantificação (LQ) da amostra é a menor quantidade respectiva do analito que pode ser quantificado, respeitando os critérios de precisão e exatidão e as condições experimentais estabelecidas. Os parâmetros LD e LQ podem ser calculados a partir das equações (5) e (6) (ANVISA RDC n.166, 2017; DE SOUSA NUNES, 2005; SARGAÇO, 2013).

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{IC} \quad \text{Equação 5}$$

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{IC} \quad \text{Equação 6}$$

Onde, IC é a inclinação da curva de calibração, σ é o desvio padrão e pode ser obtido de 3 formas:

- 1 – A partir do desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de detecção;
- 2 – A partir do desvio padrão residual da linha de regressão;
- 3 – A partir da estimativa de ruído proveniente da análise de um apropriado número de amostras do branco.

2.8.6 Robustez

A robustez de um método analítico é avaliada através das pequenas variações em alguns parâmetros da metodologia desenvolvida. Essas intervenções nos métodos quantitativos, devem causar variações no resultado que deverão ser analisados de acordo com os critérios estabelecido pela exatidão. No método qualitativo é verificado a variação da resposta analítica. Os parâmetros considerados para indicar a robustez de um método analítico estão na figura 4 (ANVISA RDC n.166, 2017; DE SOUSA NUNES, 2005; SARGAÇO, 2013).

Figura 4 - Condições para a avaliação da robustez do método.

| | |
|-----------------------|--|
| Preparo das Amostras | Estabilidade das soluções analíticas |
| | Tempo de extração |
| | Compatibilidade de filtros |
| Espectrofotometria | Variação do pH da solução |
| | Diferentes lotes ou fabricantes de solventes |
| Cromatografia Líquida | Variação do pH da fase móvel |
| | Variação na composição da fase móvel |
| | Diferentes lotes ou fabricantes de colunas |

Fonte: RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados para o desenvolvimento da metodologia e validação da análise foram os seguintes:

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, marca Shimadzu, composto com os seguintes componentes, CBM-20A (módulo de comunicação), FCV-10AL_{VC} (equipamento seletor de fase móvel), LC-10A_i (bomba mecânica), SIL-10A_i (injetor automático), SPD-M20A (detector espectrofotométrico, de comprimento de onda na faixa do ultravioleta);
- Coluna C18 150 x 4,6 mm – 2,7 micron (InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, Agilent) e uma pré-coluna 5 x 4,6 mm – 2,7 micron (InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, Agilent);
- Balança analítica, marca METLER TOLEDO;
- Sistema de ultrapurificação de água, marca Millipore, modelo Direct-Q 8;
- Balão volumétrico 10 ml e 5 ml.

3.2 REAGENTES

Os reagentes e padrões de PSMA utilizados e respectivas especificações do fabricante estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Reagentes utilizados.

| Reagente | Marca |
|------------------------|-----------------|
| PSMA – OH | ABX |
| PSMA – Precursor | ABX |
| PSMA – Standard | ABX |
| Acetonitrila grau HPLC | Merck |
| Fosfato de sódio | Química moderna |
| Etanol grau HPLC | Merck |
| Ácido fosfórico 80% | Merck |
| Fosfato de potássio | Merck |
| Cloreto de sódio | Merck |
| Cloreto de potássio | Merck |

3.3 SOLUÇÕES

3.3.1 Solução Água/Etanol (60:40)

Esta solução foi preparada através da medida em proveta de 60 ml de água ultrapura, sendo transferida para um recipiente e adicionado 40 ml de etanol medido em proveta.

3.3.2 Solução A

Para o preparo foram pesados 800 mg de cloreto de sódio, 20 mg de fosfato de potássio, 114 mg de cloreto de potássio e 20 mg de fosfato de sódio e transferidos para um balão volumétrico de 100 ml sendo avolumado com água ultrapura.

3.3.3 Solução diluente PSMA

Esta solução foi preparada a partir das soluções de água/etanol (60:40) e solução A, sendo transferido para o recipiente 30 ml de solução A e 10 ml de água/etanol (60:40).

3.3.4 Solução fosfato de sódio 0,02M

Esta solução tampão foi utilizada como a fase móvel do HPLC e foi pesado 2,7598 g de fosfato de sódio e transferido para um balão volumétrico de 1 litro, sendo avolumado com água ultrapura e adicionado 0,485 ml de ácido fosfórico 80% para ajuste de pH 2,5.

3.3.5 Solução padrão PSMA – standard 0,1 mg/ml

O frasco de padrão adquirido contém apenas 1 mg de PSMA – standard, sendo assim, foi realizado a diluição diretamente no frasco com 5 mL de solução diluente PSMA e agitado por 16 minutos em ultrassom; o conteúdo do frasco foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL e avolumado com a solução diluente PSMA.

3.3.6 Solução padrão PSMA – precursor 0,1 mg/ml

O frasco de padrão adquirido contém apenas 1 mg de PSMA – precursor, sendo assim, foi realizado a diluição diretamente no frasco com 4 mL de etanol e 1 mL água ultrapura, sendo agitado por 5 minutos em ultrassom até a dissolução do padrão, o conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL e avolumado com água ultrapura.

3.3.7 Solução padrão PSMA – OH 0,1 mg/ml

O frasco de padrão adquirido contém apenas 1 mg de PSMA – OH, sendo assim, foi realizado a diluição diretamente no frasco com 4 mL de etanol e 1 mL água ultrapura e agitado por 5 minutos em ultrassom até a dissolução do padrão, o conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL e avolumado com água ultrapura.

3.4 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

A condições cromatográficas foram otimizadas para melhor adequação no sistema onde foi realizada as análises das soluções padrão e apresentada na tabela 2.

Tabela 2 - Condição cromatográfica.

| Parâmetros | Condições |
|--------------------------------|--|
| Modo de Separação | Fase reversa |
| Fluxo | 0,8 mL/mim |
| Volume de injeção | 20 µL |
| Detector (comprimento de onda) | 225 nm |
| Temperatura do forno da coluna | 30°C |
| Temperatura da amostra | Ambiente |
| Tempo de corrida | 26 minutos |
| Fase móvel | Acetonitrila e Fosfato de sódio 0,02 M em modo gradiente |

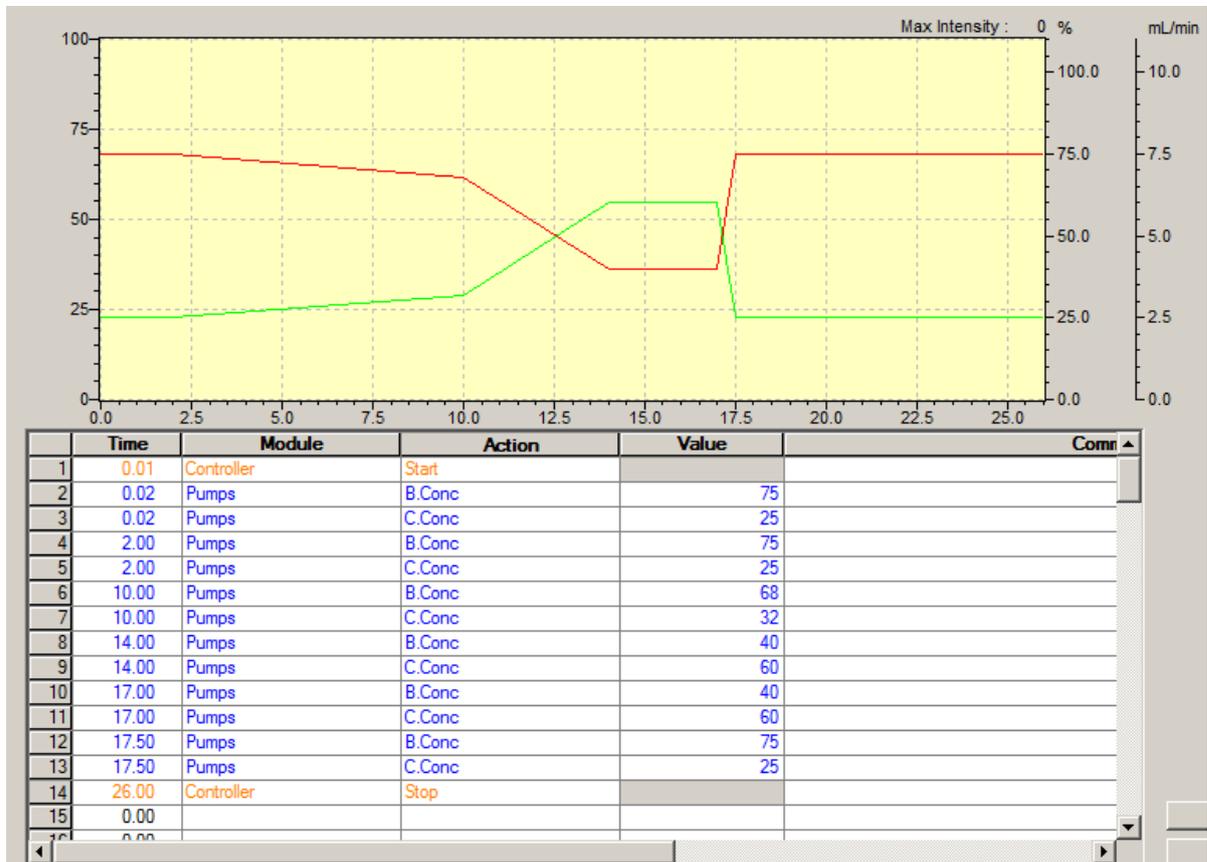
Fonte: Autor (2022)

O gradiente foi configurado de forma em que as fases moveis alteram suas concentrações durante a corrida cromatográfica. A Tabela 3 apresenta a variação do gradiente e a Figura 5 apresenta o Sistema Gradiente expresso no equipamento.

Tabela 3 - Variação do Gradiente

| Tempo (min) | Fosfato de sódio 0,02M | Acetonitrila |
|-------------|------------------------|--------------|
| 0 – 2 | 75% | 25% |
| 2 – 10 | 68% | 32% |
| 10 – 14 | 40% | 60% |
| 14 – 17 | 40% | 60% |
| 17 – 17,5 | 75% | 25% |
| 17,5 – 26 | 75% | 25% |

Fonte: Autor (2022)

Figura 5 - Sistema gradiente HPLC.

Fonte: Autor.

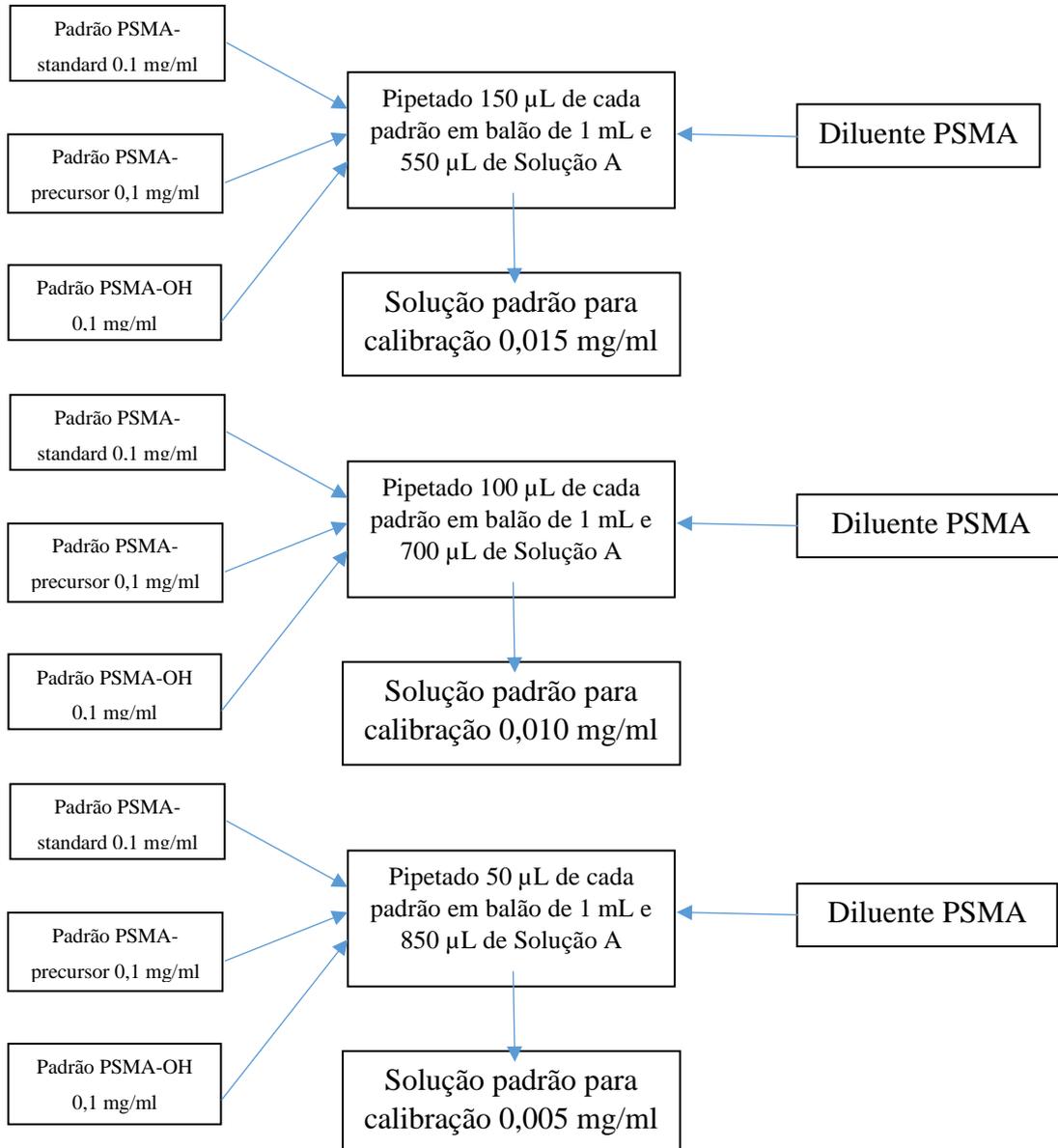
3.5 PREPARO DE PADRÕES E AMOSTRA

3.5.1 Preparo de solução padrão de calibração

A partir das soluções padrões de PSMA de concentração conhecida de 0,1 mg/ml foram geradas as diluições para a realização de uma curva com pontos definidos em 150%, 100% e

50 % e a concentração definida como de partida de 0,01mg/ml, sendo realizada conforme demonstrado no Fluxograma 01.

Fluxograma 01 – Curva Padrão PSMA



Fonte: Autor (2022)

3.5.2 Preparo de solução padrão de Linearidade

O preparo do padrão de linearidade teve como ponto de partida a concentração de 0,1 mg/ml igual a 100% da concentração especificada, deste ponto foi preparada uma solução de 0,02 mg/ml igual a 200% da concentração de partida, e então, a partir desta solução foi realizada as diluições 120%, 100%, 90%, 60%, 30% e LQ.

3.5.3 Preparo de solução padrão de Exatidão

O preparo do padrão de exatidão teve como ponto de partida a concentração de 0,1 mg/ml igual a 100% da concentração especificada, deste ponto foram preparadas as soluções de 0,01 mg/ml e a partir desta solução foi realizada as diluições 120%, 100%, 80%.

3.5.4 Preparo de solução padrão de Robustez

O preparo do padrão de robustez teve como ponto de partida a concentração de 0,1 mg/ml igual a 100% da concentração especificada e deste ponto foram preparadas as soluções de 0,01 mg/ml e a partir desta solução foi realizada a diluição de 100%.

3.5.5 Preparo de solução padrão de Seletividade

O preparo do padrão de seletividade teve como ponto de partida a concentração de 0,1 mg/ml igual a 100% da concentração especificada, deste ponto foram preparadas as soluções de 0,01 mg/ml e a partir desta solução foi realizada a diluição de 100%; também foram preparadas duas soluções de 100%, uma utilizando água ultrapura e outra utilizando solução fisiológica 0,9%.

3.5.6 Preparo de solução padrão de Repetibilidade

O preparo do padrão de repetibilidade teve como ponto de partida a concentração de 0,1 mg/ml igual a 100% da concentração especificada, deste ponto foram preparadas as soluções de 0,01 mg/ml, e a partir desta solução foi realizada a diluição de 100%.

3.5.7 Preparo de solução padrão de Precisão intermediária

O preparo do padrão de precisão intermediária teve como ponto de partida a concentração de 0,1 mg/ml igual a 100% da concentração especificada, deste ponto foram preparadas as soluções de 0,1 mg/ml, e a partir desta solução foi realizada a diluição de 100%, sendo preparado por outro analista.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

O Limite de Detecção e quantificação foram calculados a partir da curva de calibração que utilizou os dados de linearidade com quatro faixas de concentrações: 120%, 90%, 60% e 30%.

Para a determinação de LD (limite de detecção) e LQ (limite de quantificação) devem ser utilizados as Equações 5 e 6, que se encontram na seção “2.8.5 Limite de Detecção e Quantificação”, em Revisão Bibliográfica, e também se apresentam abaixo.

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{IC} \quad \text{Equação 5}$$

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{IC} \quad \text{Equação 6}$$

Onde, IC é a inclinação da curva de calibração, σ é o desvio padrão.

Para o cálculo do σ utilizou-se o desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, três curvas de calibração construídas, contendo concentração do analito próxima ao suposto limite de detecção. O IC é o coeficiente angular da curva de calibração. Os dados podem ser observados no Apêndice A, nos Quadros 2 e 4.

5.2 SELETIVIDADE

A seletividade foi demonstrada analisando doze amostras, sendo divididas da seguinte maneira: três amostras de solução fisiológica 0,9%, três amostras de fase móvel, três amostras de diluente solução fisiológica 0,9% com padrão e três amostras de fase móvel com padrão. Os dados obtidos junto com o critério estabelecidos podem ser observados no Apêndice B, nos Quadros 5 a 8.

5.3 LINEARIDADE

A linearidade foi demonstrada a partir das análises em triplicatas de cinco concentrações diferentes, partindo de uma solução padrão de concentração de 200% da concentração limite de 0,01mg/ml, e foram realizadas as diluições de 120%, 100%, 90%, 60%, 30%. Os dados obtidos

podem ser observados nos Apêndice C, demonstrados nos Quadros 9 e 11, e nos Gráficos de 1 a 4.

5.4 PRECISÃO

A precisão foi avaliada pelos ensaios de Repetibilidade e Precisão Intermediária, onde, um analista realizou seis análises na concentração de 100% em um dia, com os dados apresentados no Apêndice D, Quadro 12 e 14, e outro analista realizou seis análises nas mesmas condições no dia seguinte, com os dados apresentados no Apêndice E, nos Quadros 15 e 17.

5.5 EXATIDÃO

Para ensaio de exatidão foram avaliadas, em triplicatas, com padrões nas concentrações alta, média e baixa, os dados podem ser obtidos podem ser observados no Apêndice F, nos Quadros 18 e 20.

5.6 ROBUSTEZ

Na robustez foram avaliados os efeitos de alterações de alguns parâmetros operacionais sobre os resultados obtidos. Dentre os parâmetros alterados foram:

- Alteração nas concentrações do gradiente (5% para mais e para menos de acetonitrila);
- Coluna de fabricante diferente;
- Alteração no pH da fase móvel de fosfato de sódio 0,02M (pH: 2,0; 3,0);
- Estabilidade da solução (0h, 24h, 48h, 72h,).

Os Dados obtidos dos ensaios podem ser observado nos Apêndice G, nos Quadros 21 a 25.

6 CONCLUSÃO

A metodologia adota para análise do radiofármaco [^{18}F]-PSMA-1007 demonstrou se adequada, conseguindo com alta eficácia realizar a identificação e quantificação das impurezas químicas. Os dados e cálculos podendo ser observado no apêndice A, quadro de 2 a 4.

Na avaliação da seletividade, não houve nenhum pico interferente no tempo de retenção dos padrões de PSMA-Precursor e PSMA-OH, tanto na solução fisiológica quanto na fase móvel. O método analítico demonstrou capacidade de identificar e mensurar os analitos de interesse, na presença de componentes que podem estar presentes nas amostras. Demonstrado no apêndice B, quadro de 5 a 8.

O método foi avaliado na faixa de 30% a 120% com padrões de PSMA-Precursor e PSMA-OH, através da linearidade, foi considerado linear obtendo-se um coeficiente de correlação acima de 0,99, que é homocedástico através da avaliação da igualdade de variância (Teste de Cochran), com desvio padrão relativo menor que 5% e uma taxa de recuperação dentro do aceitável em ambos os padrões conforme apresentado no apêndice C, nos quadros 11.

As amostras avaliadas nos ensaios de repetibilidade e precisão intermediárias, sob as mesmas condições de operação e mesmo instrumento, com diferentes analistas e dias diferentes, ambos apresentaram resultados de desvio padrão relativo de no máximo 5% e recuperação de 90% a 110% dentro dos critérios descritos no apêndice D, quadro 14 e apêndice E, quadro 17.

O ensaio de exatidão, expresso pela relação de percentual de recuperação entre 90% a 110% do analito, com concentrações conhecidas, apresentaram valores dentro dos critérios estabelecidos para o desvio padrão relativo máximo de 5%, observado no apêndice F, quadro 20.

Nos ensaios para análise da robustez do método, consegue-se observar na comparação das áreas entre as diversas alterações feitas que o desvio padrão relativo é menos que 5% podendo gerar uma falsa impressão que o método é robusto, mas quando levado em consideração os tempos de retenção das triplicatas, é observado o desvio padrão relativo acima dos 50%, observado no apêndice G, quadro 25, determinado que o método é robusto para variação de pH, e não é robusto para as demais alterações no sistema.

Dessa maneira, o método atende a todos os parâmetros avaliados, seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez parcial, e pode ser considerado eficiente para o

propósito a que se destina, ou seja, ensaio de identificação e quantificação de impureza no produto [¹⁸F]-PSMA-1007.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. Resolução RDC n. 166, de 24 de Julho de 2017. **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências**, 2017.

BLANC, D.; COMMANAY, L.; TEYSSIER, J. L. - La détection des particules par scintillation. **Onde Électrique**, **508/509:1** - 8, 1969.

CARVALHO, Fernando P. As descobertas científicas de Marie Curie e o seu legado à ciência e à humanidade. **Revista Captar: Ciência e Ambiente para Todos**, v. 3, n. 2, p. 1-11, 2011.

CHAMPION, Bill. **HPLC Separation Fundamentals**. Agilent Technologies, Inc 2009.

CLAESSENS H.A., **Trends and progress in the characterization of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography**. **Trends in analytical chemistry**, Vol. 20, 2001, p. 563- 583.

CRF-SP: Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo. “Radiofarmácia – 1ª Edição - 2019”. Disponível em: <<http://www.crfsp.org.br/images/cartilhas/radiofarmacia.pdf>>. Acesso em: 11 de out. de 2020.

DE SOUSA NUNES, Rogéria et al. Validação de metodologia analítica para doseamento do timol em extratos vegetais de *Lippia sidoides* Cham por CLAE. **Rev. Bras. Farm**, v. 86, n. 3, p. 87-91, 2005.

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

ENGELHARDT H., **Bonded Stationary phases**. In: **Corradini D. (ed), Handbook of HPLC, 2nd ed., Chromatographic Science Series**. Taylor and Francis Group, 2011, p. 47-66.

GARFIELD, F. M. Quality assurance principles for analytical laboratories. Arlington: **Association of Official Analytical Chemistry International**, p. 220. 1994.

GIAROLA, Rodrigo Sanchez. **Estudo teórico experimental da resposta radiométrica de câmaras de ionização utilizadas em dosimetria em feixes de raios X para diagnóstico radiológico**. 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

KAPLAN, I. Física nuclear, vol. 2. **Guanabara Dois, Rio de Janeiro**, 1978.

McMaster M.C. (ed.), **HPLC: A Practical User's Guide**, 2nd ed., Wiley & Sons Inc, New Jersey, 2007, p. 3-14.

MORETTO L.D., SHIB M. **A era da validação**. **Pharmaceutical Technology**. 4:4- 48. 2000.

MONTANHEIRO, MARIA NAZARETH STOLF. **Gamma spectrometry analysis for simultaneous detection of ^{54}Mn , ^{65}Zn and ^{59}Fe in aqueous solutions and plant tissues**. Sao Paulo Univ., 1975.

MONTANHEIRO, Maria Nazareth S.; NASCIMENTO FILHO, Virgílio F.; PINTO, Fernando A. Introdução à espectrometria gama. **Boletim Didático**, n. 021, 1977.

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

PRADO, Marcos de Freitas. Análise comparativa dos indicadores de produção e controle de qualidade da síntese do ^{18}F FDG produzido por dois diferentes equipamentos. 2015.

PATTON, Dennis D. The birth of nuclear medicine instrumentation: Blumgart and Yens, 1925. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 44, n. 8, p. 1362-1365, 2003.

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

SANTOS-OLIVEIRA, Ralph; CARNEIRO-LEÃO, Ana Maria dos Anjos. História da radiofarmácia e as implicações da Emenda Constitucional N. 49. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 377-382, 2008.

SARGAÇO, Bruno Ruela. **Otimização e validação de um método de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) para a determinação do edulcorante ciclamato: ocorrência em adoçantes de mesa**. 2013. Tese de Doutorado. Instituto Superior de Engenharia de Lisboa.

SCAFF, L. A. M. Física na Radioterapia A Base Analógica de uma Era Digital. **São Paulo: Editora Projeto Saber**, 2010.

SCHIRRMACHE, R.; WANGLER, C.; SCHIRRMACHER, F. Fluorine-18 radiochemistry: theory and practice. In: **Pharmaceutical Radiochemistry Scintomics**, v 1 of Munich molecules imaging Handbook series. 31, 2011

VALENTINI, Sóstenes Rosa; SOMMER, Willy Arno; MATIOLI, Graciette. Validação de métodos analíticos. **Arquivos do MUDI**, v. 11, n. 2, p. 26-31, 2007.

APÊNDICE A - Dados e cálculos do limite de detecção e quantificação.

Quadro 2 - Dados para cálculo LD e LQ para PSMA-Precursor.

| Curva 1 | | Curva 2 | | Curva 3 | |
|-------------------------------------|----------|------------------------------|----------|------------------------------|----------|
| Conc. (mg/ml) | Área | Conc. (mg/ml) | Área | Conc. (mg/ml) | Área |
| 0,0030 | 243598 | 0,0030 | 250766 | 0,0030 | 247407 |
| 0,0060 | 498546 | 0,0060 | 497398 | 0,0060 | 495561 |
| 0,0090 | 762179 | 0,0090 | 734993 | 0,0090 | 730621 |
| 0,0120 | 909174 | 0,0120 | 909711 | 0,0120 | 912400 |
| Coefficiente linear curva 1 | 38284 | Coefficiente linear curva 2 | 44609 | Coefficiente linear curva 3 | 38987 |
| Coefficiente angular curva 1 | 75345367 | Coefficiente angular curva 2 | 73814333 | Coefficiente angular curva 3 | 74334633 |
| Média coeficiente linear | | | 40627 | | |
| Desvio Padrão do coeficiente linear | | | 3467 | | |
| Média do coeficiente angular | | | 74498111 | | |

Fonte: Autor

Quadro 3 - Dados para cálculo LD e LQ para PSMA-OH.

| Curva 1 | | Curva 2 | | Curva 3 | |
|-------------------------------------|-----------|------------------------------|-----------|------------------------------|-----------|
| Conc. (mg/ml) | Área | Conc. (mg/ml) | Área | Conc. (mg/ml) | Área |
| 0,0030 | 312849 | 0,0030 | 322243 | 0,0030 | 321437 |
| 0,0060 | 634930 | 0,0060 | 639328 | 0,0060 | 638601 |
| 0,0090 | 950262 | 0,0090 | 943835 | 0,0090 | 941882 |
| 0,0120 | 1327025 | 0,0120 | 1327408 | 0,0120 | 1334832 |
| Coefficiente linear curva 1 | -33199 | Coefficiente linear curva 2 | -21797 | Coefficiente linear curva 3 | -26679 |
| Coefficiente angular curva 1 | 111928667 | Coefficiente angular curva 2 | 110666733 | Coefficiente angular curva 3 | 111448867 |
| Média coeficiente linear | | | -27225 | | |
| Desvio Padrão do coeficiente linear | | | 5720 | | |
| Média do coeficiente angular | | | 74498111 | | |

Fonte: Autor

Quadro 4 - Parâmetro e critérios de aceitação seletividade.

| Parâmetros | Critérios de aceitação | Resultado PSMA - Precursor | Resultado PSMA - OH |
|------------|------------------------|----------------------------|---------------------|
| L.D. | mg/ml e área | 0,00026 e 12725 | 0,00028 e 18016 |
| L.Q. | mg/ml e área | 0,00078 e 38560 | 0,00086 e 54595 |

Fonte: Autor

APÊNDICE B - Dados e cálculos de seletividade.**Quadro 5** – Dados diluentes sem padrões.

| Amostra | PSMA-PRECURSOR | | PSMA-OH | |
|-----------------------------|----------------|-----------------|---------|-----------------|
| | Área | Média das Áreas | Área | Média das Áreas |
| Solução Fisiológica 0,9 % A | | | | |
| Solução Fisiológica 0,9% B | | | | |
| Solução Fisiológica 0,9% C | | | | |
| Fase móvel A | | | | |
| Fase móvel B | | | | |
| Fase móvel C | | | | |

Fonte: Autor

Quadro 6 – Dados diluentes com padrão PSMA-Precursor.

| Amostra | Concentração Teórica (%) | Concentração Amostra (%) | Recuperação (%) | Área | Média das Áreas | Pureza média dos picos (%) |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------|--------|-----------------|----------------------------|
| (Fisiológica + padrão) A | 0,0100 | 0,0105 | 105 | 832577 | 831586 | 99,83 |
| (Fisiológica + padrão) B | 0,0100 | 0,0104 | 104 | 831094 | | |
| (Fisiológica + padrão) C | 0,0100 | 0,0105 | 105 | 831901 | | |
| (Fase móvel + padrão) A | 0,0100 | 0,0105 | 105 | 831662 | | |
| (Fase móvel + padrão) B | 0,0100 | 0,0104 | 104 | 831003 | | |
| (Fase móvel + padrão) C | 0,0100 | 0,0104 | 104 | 831280 | | |

Fonte: Autor

Quadro 7 – Dados diluentes com padrão PSMA-OH.

| Amostra | Concentração Teórica (%) | Concentração Amostra (%) | Recuperação (%) | Área | Média das Áreas | Pureza média dos picos (%) |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------|---------|-----------------|----------------------------|
| (Fisiológica + padrão) A | 0,0100 | 0,0098 | 98 | 1052506 | 1048511 | 98,43 |
| (Fisiológica + padrão) B | 0,0100 | 0,0097 | 97 | 1048837 | | |
| (Fisiológica + padrão) C | 0,0100 | 0,0097 | 97 | 1050105 | | |
| (Fase móvel + padrão) A | 0,0100 | 0,0097 | 97 | 1045267 | | |
| (Fase móvel + padrão) B | 0,0100 | 0,0097 | 97 | 1046411 | | |
| (Fase móvel + padrão) C | 0,0100 | 0,0097 | 97 | 1047942 | | |

Fonte: Autor

Quadro 8 – Parâmetro e critérios de aceitação seletividade.

| Parâmetros | Critérios de aceitação | Resultado PSMA - Precursor | Resultado PSMA - OH |
|----------------------|------------------------|----------------------------|---------------------|
| Pureza média do pico | Maior 98 % | 99,83 | 98,43 |
| Recuperação | Entre 90 e 110 % | OK | OK |

Fonte: Autor

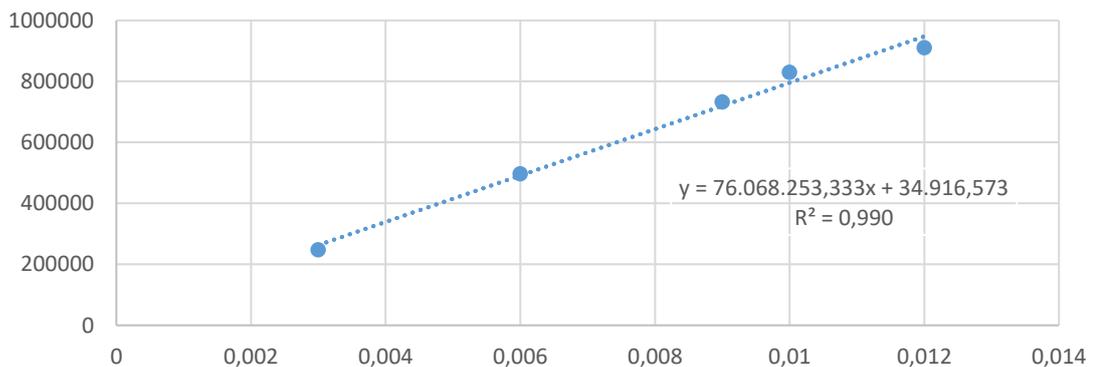
APÊNDICE C - Dados, cálculos e gráficos da Linearidade.

Quadro 9 – Dados linearidade PSMA-Precursor.

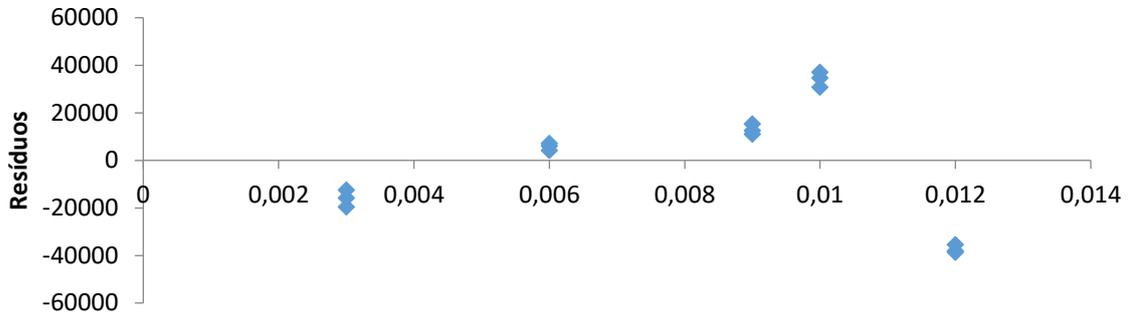
| Amostra | Concentração (mg/mL) | Área do pico | Concentração obtida | Recuperação (%) | DPR (%) | Resíduo | |
|--|----------------------|--------------|---------------------|-----------------|---------------------|----------|--|
| Linearidade 30% A | 0,0030 | 243598 | 0,0027 | 90 | 1.451 | -19523 | |
| Linearidade 30% B | 0,0030 | 250766 | 0,0028 | 93,3 | | -12355 | |
| Linearidade 30% C | 0,0030 | 247407 | 0,0027 | 90 | | -15714 | |
| Linearidade 60% A | 0,0060 | 498546 | 0,0060 | 100 | 0.303 | 7220 | |
| Linearidade 60% B | 0,0060 | 497398 | 0,0060 | 100 | | 6072 | |
| Linearidade 60% C | 0,0060 | 495561 | 0,0060 | 100 | | 4235 | |
| Linearidade 90% A | 0,0090 | 732179 | 0,0092 | 102,2 | 2.302 | 12648 | |
| Linearidade 90% B | 0,0090 | 734993 | 0,0092 | 102,2 | | 15462 | |
| Linearidade 90% C | 0,0090 | 730621 | 0,0091 | 101,1 | | 11090 | |
| Linearidade 100% A | 0,0100 | 826445 | 0,0104 | 104 | 0,387 | 30846 | |
| Linearidade 100% B | 0,0100 | 832812 | 0,0105 | 105 | | 37213 | |
| Linearidade 100% C | 0,0100 | 830328 | 0,0104 | 104 | | 34729 | |
| Linearidade 120% A | 0,0120 | 909174 | 0,0115 | 95,8 | 0.190 | -38562 | |
| Linearidade 120% B | 0,0120 | 909711 | 0,0115 | 95,8 | | -38025 | |
| Linearidade 120% C | 0,0120 | 912400 | 0,0115 | 95,8 | | -35336 | |
| Coeficientes da Regressão ($y = ax + b$) PSMA-Precursor | | | | | | | |
| | | Curva 1 | Curva 2 | Curva 3 | Média \pm DPR | | |
| Coeficiente Angular (a): | | 70425980 | 75816700 | 76254400 | 109442093 \pm 0,3 | | |
| Coeficiente Linear (b): | | 68811 | 38602 | 33228 | -21507 \pm 21,1 | | |
| Coeficiente de Correlação (r): | | 0,9715 | 0,9944 | 0,9952 | 0,9974 \pm 0,0004 | | |
| Estatística de regressão – PSMA-Precursor | | | | | | | |
| R múltiplo | | | | | | 0,995 | |
| R-Quadrado | | | | | | 0,990 | |
| R-quadrado ajustado | | | | | | 0,989 | |
| Erro padrão | | | | | | 26506,27 | |
| Observações | | | | | | 15 | |
| $C_{calculado}$ = maior variância em y / soma de todas as variâncias | | | | | | 0,3859 | |
| $C_{tabelado}$ (para o n° 3 de replicatas de y e n° 5 de pontos) | | | | | | 0,7885 | |

Fonte: Autor

Gráfico 1 – Gráfico de regressão linear PSMA-Precursor.



Fonte: Autor

Gráfico 2 – Gráfico de resíduos PSMA-Precursor.

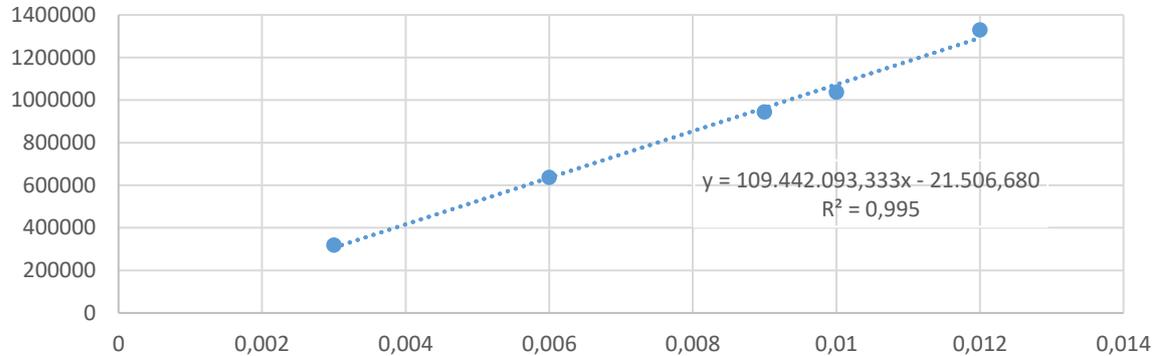
Fonte: Autor

Quadro 10– Dados linearidade PSMA-OH.

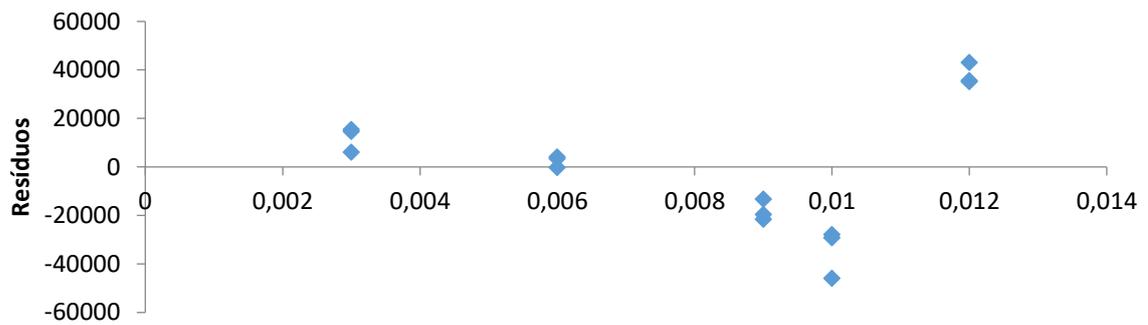
| Amostra | Concentração (mg/mL) | Área do pico | Concentração obtida | Recuperação (%) | DPR (%) | Resíduo | |
|--|----------------------|--------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------|--|
| Linearidade 30% A | 0,0030 | 312849 | 0,0029 | 96,6 | 1,633 | 6029 | |
| Linearidade 30% B | 0,0030 | 322243 | 0,0030 | 100 | | 15423 | |
| Linearidade 30% C | 0,0030 | 321437 | 0,0030 | 100 | | 14617 | |
| Linearidade 60% A | 0,0060 | 634930 | 0,0059 | 98,3 | 0,370 | -216 | |
| Linearidade 60% B | 0,0060 | 639328 | 0,0059 | 98,3 | | 4182 | |
| Linearidade 60% C | 0,0060 | 638601 | 0,0059 | 98,3 | | 3455 | |
| Linearidade 90% A | 0,0090 | 950262 | 0,0088 | 97 | 0,464 | -13210 | |
| Linearidade 90% B | 0,0090 | 943835 | 0,0087 | 96 | | -19637 | |
| Linearidade 90% C | 0,0090 | 941882 | 0,0087 | 96 | | -21590 | |
| Linearidade 100% A | 0,0100 | 1027002 | 0,0095 | 95 | 0,970 | -45912 | |
| Linearidade 100% B | 0,0100 | 1045105 | 0,0097 | 97 | | -27809 | |
| Linearidade 100% C | 0,0100 | 1043712 | 0,0097 | 97 | | -29202 | |
| Linearidade 120% A | 0,0120 | 1327025 | 0,0123 | 102,5 | 0,331 | 35227 | |
| Linearidade 120% B | 0,0120 | 1327408 | 0,0123 | 102,5 | | 35610 | |
| Linearidade 120% C | 0,0120 | 1334832 | 0,0124 | 103,3 | | 43034 | |
| Coeficientes da Regressão ($y = ax + b$) | | | | | | | |
| | | Curva 1 | Curva 2 | Curva 3 | Média \pm DPR | | |
| Coeficiente Angular (a): | | 109565220 | 109076120 | 109684940 | 109442093 \pm 0,3 | | |
| Coeficiente Linear (b): | | -26108 | -17025 | -21387 | -21507 \pm 21,1 | | |
| Coeficiente de Correlação (r): | | 0,9971 | 0,9978 | 0,9972 | 0,9974 \pm 0,0004 | | |
| Estatística de regressão – PSMA-OH | | | | | | | |
| R múltiplo | | | | | | 0,997 | |
| R-Quadrado | | | | | | 0,995 | |
| R-quadrado ajustado | | | | | | 0,994 | |
| Erro padrão | | | | | | 27229,140 | |
| Observações | | | | | | 15 | |
| $C_{calculado}$ = maior variância em y / soma de todas as variâncias | | | | | | 0,5874 | |

| | |
|--|--------|
| $C_{tabelado}$ (para o n° 3 de replicatas de y e n° 5 de pontos) | 0,7885 |
|--|--------|

Fonte: Autor

Gráfico 3 – Gráfico de regressão linear PSMA-OH.

Fonte: Autor

Gráfico 4 – Gráfico de resíduos PSMA-OH.

Fonte: Autor

Quadro 11 – Parâmetro e critérios de aceitação linearidade.

| Parâmetros | Crítérios de aceitação | Resultado PSMA - Precursor | Resultado PSMA - OH |
|---|--|--|--|
| Coeficiente de correlação (r) | Mínimo 0,990 | 0,994 | 0,997 |
| Coeficiente de determinação (r ²) | Maior 0,990 | 0,990 | 0,995 |
| Recuperação | Entre 90 e 110 % | OK | OK |
| DPR (%) | Máximo 5,0% | 30 % DPR = 1.451 60 % DPR = 0.303 90 % DPR = 2.302 100 % DPR = 0,387 120 % DPR = 0.190 | 30 % DPR = 1.451 60 % DPR = 0.303 90 % DPR = 2.302 100 % DPR = 0,970 120 % DPR = 0.190 |
| Gráfico de Resíduos Perfil de dispersão | Aleatoriamente distribuído ao redor do eixo x | Confirme gráfico 02 | Confirme gráfico 04 |
| Teste de Cochran (nível de 5% de significância) | $C_{cal} < C_{Tab}$ (homocedasticidade) – aplicar Mínimos Quadrados Ordinários | $C_{cal} = 0,3859$ < $C_{Tab} = 0,7885$ | $C_{cal} = 0,5874$ < $C_{Tab} = 0,7885$ |

Fonte: Autor

APÊNDICE D - Dados e cálculos de precisão (Repetibilidade).**Quadro 12** – Dados repetibilidade PSMA-precursor.

| Amostra | Área | Média das Áreas | DPR (%) | Concentração Teórica (mg/ml) | Concentração Recuperada (mg/ml) | Fator de Recuperação (%) |
|-------------------|--------|-----------------|---------|------------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| Precisão Padrão A | 831246 | 832507 | 0,167 | 0,0100 | 0,0104 | 104 |
| Precisão Padrão B | 833808 | | | 0,0100 | 0,0105 | 105 |
| Precisão Padrão C | 831264 | | | 0,0100 | 0,0104 | 104 |
| Precisão Padrão D | 831881 | | | 0,0100 | 0,0105 | 105 |
| Precisão Padrão E | 834132 | | | 0,0100 | 0,0105 | 105 |
| Precisão Padrão F | 832710 | | | 0,0100 | 0,0105 | 105 |

Fonte: Autor

Quadro 13 – Dados repetibilidade PSMA-OH.

| PRECISÃO REPETIBILIDADE (PSMA-OH) | | | | | | |
|-----------------------------------|---------|-----------------|---------|------------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| Amostra | Área | Média das Áreas | DPR (%) | Concentração Teórica (mg/ml) | Concentração Recuperada (mg/ml) | Fator de Recuperação (%) |
| Precisão Padrão A | 1051119 | 1053039 | 0,241 | 0,0100 | 0,0097 | 97 |
| Precisão Padrão B | 1054478 | | | 0,0100 | 0,0098 | 98 |
| Precisão Padrão C | 1051765 | | | 0,0100 | 0,0097 | 97 |
| Precisão Padrão D | 1050636 | | | 0,0100 | 0,0097 | 97 |
| Precisão Padrão E | 1052848 | | | 0,0100 | 0,0098 | 98 |
| Precisão Padrão F | 1057392 | | | 0,0100 | 0,0098 | 98 |

Fonte: Autor

Quadro 14 – Parâmetros e critérios de aceitação de repetibilidade.

| Parâmetros | Critérios de aceitação | Resultado PSMA - Precursor | Resultado PSMA - OH |
|-------------|------------------------|----------------------------|---------------------|
| DPR (%) | Máximo 5 % | 0,241 | 0,167 |
| Recuperação | Entre 90 e 110 % | OK | OK |

Fonte: Autor

APÊNDICE E - Dados e cálculos de precisão (Precisão intermediária).

Quadro 15 – Dados Precisão Intermediária PSMA-Precursor.

| Amostra | Área | Média das Áreas | DPR (%) | Concentração Teórica (mg/ml) | Concentração Recuperada (mg/ml) | Fator de Recuperação (%) |
|--------------------------|--------|-----------------|---------|------------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| Precisão Intermediária A | 833652 | 830778 | 0,336 | 0,0100 | 0,0107 | 107 |
| Precisão Intermediária B | 826156 | | | 0,0100 | 0,0108 | 108 |
| Precisão Intermediária C | 830007 | | | 0,0100 | 0,0108 | 108 |
| Precisão Intermediária D | 833706 | | | 0,0100 | 0,0107 | 107 |
| Precisão Intermediária E | 830681 | | | 0,0100 | 0,0108 | 108 |
| Precisão Intermediária F | 830463 | | | 0,0100 | 0,0108 | 108 |

Fonte: Autor

Quadro 16 – Dados Precisão Intermediária PSMA-OH.

| PRECISÃO INTERMEDIÁRIA (PSMA-OH) | | | | | | |
|----------------------------------|---------|-----------------|---------|------------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| Amostra | Área | Média das Áreas | DPR (%) | Concentração Teórica (mg/ml) | Concentração Recuperada (mg/ml) | Fator de Recuperação (%) |
| Precisão Intermediária A | 1050701 | 1050355 | 0,308 | 0,0100 | 0,0097 | 97 |
| Precisão Intermediária B | 1053553 | | | 0,0100 | 0,0098 | 98 |
| Precisão Intermediária C | 1051534 | | | 0,0100 | 0,0097 | 97 |
| Precisão Intermediária D | 1045793 | | | 0,0100 | 0,0097 | 97 |
| Precisão Intermediária E | 1053408 | | | 0,0100 | 0,0098 | 98 |
| Precisão Intermediária F | 1047143 | | | 0,0100 | 0,0097 | 97 |

Fonte: Autor

Quadro 17 – Parâmetro e critérios de aceitação precisão intermediária.

| Parâmetros | Critérios de aceitação | Resultado PSMA - Precursor | Resultado PSMA - OH |
|-------------|------------------------|----------------------------|---------------------|
| DPR (%) | Máximo 5 % | 0,336 | 0,308 |
| Recuperação | Entre 90 e 110 % | OK | OK |

Fonte: Autor

APÊNDICE F - Dados e cálculos da exatidão.

Quadro 18 – Dados exatidão PSMA-Precursor.

| Amostra | Área | Concentração Teórica (mg/ml) | Concentração Recuperada (mg/ml) | Recuperação (%) | Recuperação Média por nível (%) | DPR (%) |
|-----------------|--------|------------------------------|---------------------------------|-----------------|---------------------------------|---------|
| Exatidão 80% A | 676991 | 0,0080 | 0,0084 | 105 | 105,00 | 0,000 |
| Exatidão 80% B | 679878 | 0,0080 | 0,0084 | 105 | | |
| Exatidão 80% C | 679867 | 0,0080 | 0,0084 | 105 | | |
| Exatidão 100% A | 826445 | 0,0100 | 0,0104 | 104 | 104,33 | 0,553 |
| Exatidão 100% B | 832812 | 0,0100 | 0,0105 | 105 | | |
| Exatidão 100% C | 830328 | 0,0100 | 0,0104 | 104 | | |
| Exatidão 120% A | 916013 | 0,0120 | 0,0115 | 95,8 | 96,07 | 0,481 |
| Exatidão 120% B | 912671 | 0,0120 | 0,0116 | 96,6 | | |
| Exatidão 120% C | 910676 | 0,0120 | 0,0115 | 95,8 | | |

Fonte: Autor

Quadro 19 – Dados Precisão Intermediária.

| EXATIDÃO (PSMA-OH) | | | | | | |
|--------------------|---------|------------------------------|---------------------------------|-----------------|---------------------------------|---------|
| Amostra | Área | Concentração Teórica (mg/ml) | Concentração Recuperada (mg/ml) | Recuperação (%) | Recuperação Média por nível (%) | DPR (%) |
| Exatidão 80% A | 861901 | 0,0080 | 0,0080 | 100 | 100,43 | 0,747 |
| Exatidão 80% B | 866351 | 0,0080 | 0,0080 | 100 | | |
| Exatidão 80% C | 869353 | 0,0080 | 0,0081 | 101,3 | | |
| Exatidão 100% A | 1027002 | 0,0100 | 0,0095 | 95 | 96,33 | 1,199 |
| Exatidão 100% B | 1045105 | 0,0100 | 0,0097 | 97 | | |
| Exatidão 100% C | 1043712 | 0,0100 | 0,0097 | 97 | | |
| Exatidão 120% A | 1324243 | 0,0120 | 0,0123 | 102,5 | 102,5 | 0,000 |
| Exatidão 120% B | 1329145 | 0,0120 | 0,0123 | 102,5 | | |
| Exatidão 120% C | 1327791 | 0,0120 | 0,0123 | 102,5 | | |

Fonte: Autor

Quadro 20 – Parâmetros e critérios de aceitação e exatidão.

| Parâmetros | Crítérios de aceitação | Resultado PSMA - Precursor | Resultado PSMA - OH |
|-------------|------------------------|---|---|
| DPR (%) | Máximo 5 % | Baixa 80 % = 0,000 Média 100 % = 0,553 Alta 120 % = 0,481 | Baixa 80 % = 0,747 Média 100 % = 1,199 Alta 120 % = 0,000 |
| Recuperação | Entre 90 e 110 % | Baixa 80 % = 105,00 Média 100 % = 104,33 Alta 120 % = 96,07 | Baixa 80 % = 100,43 Média 100 % = 96,33 Alta 120 % = 102,50 |

Fonte: Autor

APÊNDICE G - Dados da Robustez.

Quadro 21 – Dados robustez PSMA-Precursor área.

| Amostra | Condições | Área | Média das Áreas | DPR (%) |
|------------|--|--------|-----------------|---------|
| Robustez A | Fase móvel com + 5% de acetonitrila durante toda a corrida | 841006 | 838568 | 0,945 |
| Robustez B | Fase móvel com + 5% de acetonitrila durante toda a corrida | 840865 | | |
| Robustez C | Fase móvel com + 5% de acetonitrila durante toda a corrida | 841900 | | |
| Robustez A | Fase móvel com - 5% de acetonitrila durante toda a corrida | 842242 | | |
| Robustez B | Fase móvel com - 5% de acetonitrila durante toda a corrida | 841044 | | |
| Robustez C | Fase móvel com - 5% de acetonitrila durante toda a corrida | 844383 | | |
| Robustez A | Coluna de fabricante diferente | 820044 | | |
| Robustez B | Coluna de fabricante diferente | 825945 | | |
| Robustez C | Coluna de fabricante diferente | 825034 | | |
| Robustez A | Fase móvel pH 2,0 | 843719 | | |
| Robustez B | Fase móvel pH 2,0 | 845130 | | |
| Robustez C | Fase móvel pH 2,0 | 843464 | | |
| Robustez A | Fase móvel pH 3,0 | 840258 | | |
| Robustez B | Fase móvel pH 3,0 | 841325 | | |
| Robustez C | Fase móvel pH 3,0 | 842158 | | |

Fonte: Autor.

Quadro 22 – Dados robustez PSMA-OH área.

| Amostra | Condições | Área | Média das Áreas | DPR (%) |
|------------|--|---------|-----------------|---------|
| Robustez A | Fase móvel com + 5% de acetonitrila durante toda a corrida | 1010482 | 1034157 | 2,663 |
| Robustez B | Fase móvel com + 5% de acetonitrila durante toda a corrida | 1015633 | | |
| Robustez C | Fase móvel com + 5% de acetonitrila durante toda a corrida | 1014016 | | |
| Robustez A | Fase móvel com - 5% de acetonitrila durante toda a corrida | 1060984 | | |
| Robustez B | Fase móvel com - 5% de acetonitrila durante toda a corrida | 1065544 | | |
| Robustez C | Fase móvel com - 5% de acetonitrila durante toda a corrida | 1069367 | | |
| Robustez A | Coluna de fabricante diferente | 999636 | | |
| Robustez B | Coluna de fabricante diferente | 1012328 | | |
| Robustez C | Coluna de fabricante diferente | 1010831 | | |
| Robustez A | Fase móvel pH 2,0 | 1016364 | | |
| Robustez B | Fase móvel pH 2,0 | 1018631 | | |
| Robustez C | Fase móvel pH 2,0 | 1016757 | | |
| Robustez A | Fase móvel pH 3,0 | 1066654 | | |
| Robustez B | Fase móvel pH 3,0 | 1068762 | | |
| Robustez C | Fase móvel pH 3,0 | 1066365 | | |

Fonte: Autor.

Quadro 23 – Dados robustez PSMA-Precursor tempo de retenção.

| Amostra | Condições | Tempo de retenção | Média das Áreas | DPR (%) |
|------------|--|-------------------|-----------------|---------|
| Robustez A | Fase móvel com + 5% de acetonitrila durante toda a corrida | 13,688 | 6,513 | 59,048 |
| Robustez B | Fase móvel com + 5% de acetonitrila durante toda a corrida | 13,692 | | |
| Robustez C | Fase móvel com + 5% de acetonitrila durante toda a corrida | 13,698 | | |
| Robustez A | Fase móvel com - 5% de acetonitrila durante toda a corrida | 2,914 | | |
| Robustez B | Fase móvel com - 5% de acetonitrila durante toda a corrida | 2,917 | | |
| Robustez C | Fase móvel com - 5% de acetonitrila durante toda a corrida | 2,913 | | |
| Robustez A | Coluna de fabricante diferente | 5,032 | | |
| Robustez B | Coluna de fabricante diferente | 4,873 | | |
| Robustez C | Coluna de fabricante diferente | 4,873 | | |
| Robustez A | Fase móvel pH 2,0 | 5,516 | | |
| Robustez B | Fase móvel pH 2,0 | 5,511 | | |
| Robustez C | Fase móvel pH 2,0 | 5,514 | | |
| Robustez A | Fase móvel pH 3,0 | 5,518 | | |
| Robustez B | Fase móvel pH 3,0 | 5,516 | | |
| Robustez C | Fase móvel pH 3,0 | 5,514 | | |

Fonte: Autor.

Quadro 24 – Dados robustez PSMA-OH tempo de retenção.

| Amostra | Condições | Tempo de retenção | Média das Áreas | DPR (%) |
|------------|--|-------------------|-----------------|---------|
| Robustez A | Fase móvel com + 5% de acetonitrila durante toda a corrida | 15,021 | 7,527 | 54,445 |
| Robustez B | Fase móvel com + 5% de acetonitrila durante toda a corrida | 15,026 | | |
| Robustez C | Fase móvel com + 5% de acetonitrila durante toda a corrida | 15,031 | | |
| Robustez A | Fase móvel com - 5% de acetonitrila durante toda a corrida | 3,326 | | |
| Robustez B | Fase móvel com - 5% de acetonitrila durante toda a corrida | 3,330 | | |
| Robustez C | Fase móvel com - 5% de acetonitrila durante toda a corrida | 3,326 | | |
| Robustez A | Coluna de fabricante diferente | 5,798 | | |
| Robustez B | Coluna de fabricante diferente | 5,611 | | |
| Robustez C | Coluna de fabricante diferente | 5,611 | | |
| Robustez A | Fase móvel pH 2,0 | 6,801 | | |
| Robustez B | Fase móvel pH 2,0 | 6,800 | | |
| Robustez C | Fase móvel pH 2,0 | 6,800 | | |
| Robustez A | Fase móvel pH 3,0 | 6,808 | | |
| Robustez B | Fase móvel pH 3,0 | 6,807 | | |
| Robustez C | Fase móvel pH 3,0 | 6,803 | | |

Fonte: Autor.

Quadro 25 – Parâmetros e critérios de aceitação robustez.

| Parâmetros | Critérios de aceitação | Resultado PSMA - Precursor | Resultado PSMA - OH |
|-----------------------------|------------------------|----------------------------|---------------------|
| DPR (%) - Área | Máximo 5 % | 2,663 | 0,945 |
| DPR (%) - Tempo de retenção | Máximo 5 % | 59,048 | 54,445 |

Fonte: Autor.