Instituto Politécnico de Lisboa

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

Estágio em Indústria Farmacêutica

CAROLINA BAPTISTA RIBEIRO SIMÕES

RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUBMETIDO COMO REQUISITO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM FARMÁCIA, ESPECIALIZAÇÃO FARMACOLOGIA E FARMACOTERAPIA AVANÇADA

LISBOA, 2021

Instituto Politécnico de Lisboa

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

Estágio em Indústria Farmacêutica

CAROLINA BAPTISTA RIBEIRO SIMÕES

RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUBMETIDO COMO REQUISITO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM FARMÁCIA, ESPECIALIZAÇÃO FARMACOLOGIA E FARMACOTERAPIA AVANÇADA

Orientadores:

Professor Doutor Antero de Abrunhosa, ICNAS-UC

Professora Doutora Liliana Aranha Caetano, ESTeSL-IPL

LISBOA, 2021

Declaração

Declaro ser a autora deste trabalho, parte integrante das condições exigidas para obtenção do grau de Mestre em Farmácia. Este relatório é um trabalho original e inédito que nunca foi submetido (parcial ou integralmente) a outra instituição de ensino superior para obtenção de grau académico ou outra habilitação. Atesto que todas as citações estão devidamente identificadas. Declaro ainda que tenho consciência de que o plágio poderá levar à anulação do trabalho que agora submeto.

Lisboa, 30 de outubro de 2021

Carolina Simões

“No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade.”

Albert Einstein

“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação. Mas se você não fizer nada, não existirão resultados.”

Mahatma Gandhi

Agradecimentos

Agradeço aos meus orientadores de estágio, Professor Doutor Antero de Abrunhosa, Diretor do Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde, Universidade de Coimbra (ICNAS-UC), e Professora Doutora Liliana Aranha Caetano, Diretora do Mestrado em Farmácia da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL-IPL), por todo o seu apoio e disponibilidade e pela oportunidade de realizar este estágio que muito contribuiu para o enriquecimento da minha formação académica e científica.

Um agradecimento especial à diretora do Controlo e Qualidade do ICNAS-P, Doutora Ana Almeida, pela sua orientação, apoio, motivação, extrema dedicação, disponibilidade, experiência transmitida e ensinamentos proporcionados ao longo da realização destes seis meses, e pela sua disponibilidade durante a elaboração escrita deste relatório.

A todos os membros do ICNAS da Universidade de Coimbra, que diretamente ou indiretamente contribuíram para que o meu trabalho de estágio tenha sido realizado, pelo acolhimento e a boa disposição que proporcionaram no local de estágio.

À minha família, principalmente aos meus pais e irmã, que me deram a possibilidade de tirar este curso, por todo o amor, apoio e disponibilidade que dispuseram para me apoiar e sem os quais não teria sido possível percorrer este caminho.

Agradeço também a todos os meus amigos que me deram força para continuar e conselhos bastante úteis para chegar até ao fim desta caminhada.

Um agradecimento especial aos meus colegas, a Raquel e ao David, que partilharam casa comigo durante os seis meses de estágio e que muito me apoiaram durante esta etapa.

Quero, por fim agradecer àquele que está comigo todas as horas e minutos da minha vida, que me guia, acompanha e ampara.

A todos, muito obrigado.

Lista de Siglas

ACN	Acetonitrilo
AIM	Autorização de Introdução no Mercado
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
C	Carbono
CITAC	The Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry
CT	Caraterísticas de medicina radiológica
EMA	Agência Europeia de Medicamentos
ESTeSL	Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa
FID	Detetor de ionização de chamas
GC	Cromatografia Gasosa
GMP	Good Manufacturing Practice
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
ICNAS	Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde
ICNAS-P	ICNAS Produção Unipessoal Lda.
INFARMED	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.
IPL	Instituto Politécnico de Lisboa
ISO	International Standard Organization
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LOD	Limite de deteção
LOQ	Limite de Quantificação
MN	Medicina Nuclear
MNC	Medicina Nuclear Convencional
MRI	Imagiologia por Ressonância Magnética
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PET	Tomografia de Emissão com Positrões
PET/CT	Tomografia computadorizada
T	Tesla
TCA	Ácido tricarboxílico
THF	Tetrahidrofurano
US EPA	United States Environmental Protection Agency
USP	United States Pharmacopeia
WHO	World Health Organization

Resumo

Os radiofármacos são medicamentos que contém átomos radioativos utilizados para fins de diagnóstico, monitorização e tratamento de algumas patologias, sendo administrados na sua maioria por via intravenosa. A radiofarmácia ocupa-se da pesquisa e desenvolvimento, produção, controlo de qualidade, garantia da qualidade e outros aspetos relacionados com os radiofármacos, sendo um ramo inovador e desafiante na área da Farmácia.

O controlo de qualidade na indústria farmacêutica é um conjunto de procedimentos destinados a verificar a qualidade de vários intervenientes no circuito do medicamento (desde matérias-primas ao produto acabado), de forma a que a seja garantida a obtenção de medicamentos seguros, eficazes e de qualidade.

Pretende-se com o presente trabalho final de mestrado, na sequência do estágio de natureza profissional com duração de 6 meses desenvolvido no Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde (ICNAS), descrever o estado da arte, atividades desenvolvidas e competências adquiridas no contexto do controlo de qualidade de radiofármacos na indústria farmacêutica.

É ainda apresentado um estudo de caso referente ao radiofármaco ^{11}C-Acetato, para o qual foi validado, de acordo com as *guidelines* aplicáveis, o método proposto de análise de solventes residuais (éter dietílico e tetrahidrofurano) por cromatografia gasosa, com apresentação dos resultados especificidade, exatidão, precisão, linearidade, alcance, limite de deteção, limite de quantificação e robustez.

Palavras-Chave: farmácia; indústria farmacêutica; controlo de qualidade; radiofármaco; ^{11}C-Acetato; validação de método analítico

Abstract

The radiopharmaceuticals are medicines that contain radioactive atoms used for diagnostic purposes, monitoring and the treatment of some pathologies, being administrated mostly intravenously. The radiopharmacy takes care of the research and development, production, quality control, quality warranty and other aspects related to radiopharmaceuticals, being an innovative and challenging branch in the area of pharmacy.

The quality control in the pharmaceutical industry is a set of procedures destined to check the quality of various stakeholders in the medicine circuit (since raw material to the finished product), in a way that it is guaranteed that safe, effective and quality medicines are obtained.

With this final master paper it is intended, in the sequence of the professional internship lasting 6 months developed in the Institution of Nuclear Sciences Applied to Health (ICNAS), the description of the state of art, activities developed and acquired skills in the context of radiopharmaceuticals quality control in the pharmaceutical industry.

It is also presented a study of the case referent to the ^{11}C-Acetate radiopharmaceutical, for which it was authenticated, according to the guidelines applied, the proposed method of residual solvent analysis (diethyl ether and tetrahydrofuran) by gas chromatography, with the presented results of specificity, accuracy, precision, linearity, range, detection limit, quantification limit and robustness.

KeyWords: pharmacy, pharmaceutical industry; quality control; radiopharmaceutical; ^{11}C-Acetate; analytical method validation

Índice geral

Agradecimentos ii
Lista de Siglas iii
Resumo iv
Abstract v
Índice geral vi
Índice de tabelas vii
Índice de figuras viii
Introdução 1
Capítulo I – Enquadramento teórico 2
1.1. Radiofarmácia 2
1.1.1. Radiofármacos 2
1.1.2. Características do radiofármaco ideal 4
1.1.3. Riscos para a saúde 6
1.2. Indústria farmacêutica e regulamentação do setor 6
1.3. Controlo de qualidade 7
1.3.1. Princípios de qualidade na indústria farmacêutica 7
1.3.2. Validação de métodos analíticos 9
Capítulo II – Caraterização do local de estágio 22
2.1. Instituto Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde (ICNAS) 22
2.2. Experiência de estágio no ICNAS-P 24
Capítulo III – Estudo de caso 26
3.1. Radiofármaco ^{11}C-Acetato 26
3.2. Cromatografia gasosa (GC) 27
3.3. Materiais e equipamentos 27
3.4. Validação do método analítico GC para o ^{11}C-Acetato 28
Capítulo IV – Análise e discussão dos resultados 30
4.1. Análise dos resultados 30
4.2. Discussão dos resultados 37
4.3. Limitações do estudo 39
4.4. Conclusão 39
Capítulo V - Considerações finais 40
5.1. Competências adquiridas 40
5.2. Análise e apreciação critica do estágio 41
Referências Bibliográficas 42
Apêndice 1 – Cronograma de estágio 45

Índice de tabelas

Tabela 1-Elementos necessários para a validação de um ensaio 11
Tabela 2- Estratégias para demonstrar a exatidão de acordo com as normas propostas pela ICH 15
Tabela 3-Amostras e reagentes 27
Tabela 4-Componentes do cromatógrafo de gás Agilent Technologies®, modelo Agilent 6850 (GCO1) 28
Tabela 5-Condições de operação de cromatógrafo 29
Tabela 6-Parâmetros de adequação do sistema 29
Tabela 7-Parâmetros analíticos e critérios de aceitação 30
Tabela 8-Resultados de precisão do éter dietílico 5mg/mL 31
Tabela 9-Resultados de precisão do THF 0,72mg/mL 32
Tabela 10-Resultados do limite de quantificação 32
Tabela 11-Resultados do limite de quantificação 33
Tabela 12-Resultados do limite de deteção na solução de éter dietílico 33
Tabela 13-Resultados do limite de deteção na solução de THF 33
Tabela 14-Resultados das amostras “as is” Acetato 210407-01 34
Tabela 15-Resultados das amostras “as is” Acetato 210412-01 34
Tabela 16-Resultados de exatidão para éter dietílico 35
Tabela 17-Resultados de exatidão para THF 35
Tabela 18-Resultados de repetibilidade para a amostra de Acetato 210407-01 contaminado com Éter dietílico na concentração de 5 mg/mL 36
Tabela 19-Resultados de repetibilidade para a amostra de Acetato 210412-01 contaminada com THF na concentração de 0,72 mg/mL 36

Índice de figuras

Figura 1-Esquema de um radiofármaco de perfusão (A) e de um radiofármaco específico (B) em que o radionuclídeo é um metal (9). 3
Figura 2-Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde (ICNAS)..... 22

Introdução

O presente relatório de estágio foi elaborado no âmbito do segundo ano do Mestrado em Farmácia, na área de especialização Farmacologia e Farmacoterapia Avançada, lecionado na Escola Superior de Tecnologias da Saúde de Lisboa (ESTeSL).

O mestrado em farmácia pretende preparar profissionais e investigadores para otimizar o seu conhecimento em situações complexas no contexto profissional em serviços de saúde e instituições onde o uso de medicamentos seja central, como é o caso do ICNAS. Promove o desenvolvimento de capacidades críticas e analíticas com base na evidência, de resolução de problemas e desempenho estratégico em equipas de saúde. Por outro lado, este mestrado estimula o desenvolvimento de investigação e produção de conhecimento científico na área de especialização de Farmacologia e Farmacoterapia Avançada.

Este relatório surge como suporte teórico do estágio realizado no ICNAS. O estágio foi realizado mais especificamente na área dedicada à unidade de produção elaborada no Laboratório de Radiofarmácia e Ciclotrão visto o tema ser “Indústria Farmacêutica”.

Assim sendo, este relatório tem como objetivo dar a conhecer o local de estágio, alguns princípios teóricos subjacentes ao tema do trabalho, nomeadamente os conceitos de farmácia, conceitos básicos da Medicina Nuclear (MN) e indústria farmacêutica, os diferentes processos de obtenção e desenvolvimento de radiofármacos e um especial enfoque nas atividades por mim desenvolvidas durante o período descrito anteriormente abordadas numa nova metodologia para a análise dos solventes residuais (tetrahidrofurano (THF) e do éter dietílico (por cromatografia gasosa (GC)) do radiofármaco ^{11}C-Acetato ICNAS-Produção. Através do desenvolvimento de testes necessários para a validação do método analítico do teste limite.

Os principais objetivos deste trabalho são:

- Reconhecer a importância dos radiofármacos e da farmácia;
- Demonstrar que o método analítico proposto é adequado ao que se propõe e garantir que a metodologia analítica seja exata e precisa, além de estável, reprodutível e flexível para THF e Éter Dietílico;
- Descrever as atividades desenvolvidas na organização no âmbito do estágio;

Os medicamentos são definidos como produtos farmacêuticos ou substâncias que devidamente manipuladas, se aplicam ao organismo do indivíduo com a finalidade de prevenir, diagnosticar ou tratar uma doença humana (1).

As etapas do circuito do medicamento de uso humano são investigação e desenvolvimento, ensaios clínicos, autorização, fabrico, distribuição por grosso, prescrição, dispensa e, por último, utilização (1,2). A investigação e desenvolvimento, é uma fase importante no processo de desenvolvimento de novos medicamentos. A indústria farmacêutica, em parceria com as faculdades de medicina e de farmácia, outras empresas e centros de investigação nacionais e estrangeiros, fomenta projetos de investigação para o desenvolvimento de medicamentos seguros e eficazes (1,2).

1.1. Radiofarmácia

A radiofarmácia ocupa-se da pesquisa e desenvolvimento, produção, controlo de qualidade, garantia da qualidade e mais aspetos relacionados aos radiofármacos (3). Um radiofármaco é descrito como uma substância química que contém átomos radioativos na sua estrutura para ser administrado no ser humano. Os radiofármacos são medicamentos administrados, em sua maioria, por via intravenosa e utilizados para fins de diagnóstico, monotorização e terapia de algumas doenças (4). A maioria dos radiofármacos são usados em diagnóstico (cerca de 95%) enquanto (5) que a minoria, os restantes 5%, são utilizados para tratamento terapêutico (6).

1.1.1. Radiofármacos

Um radiofármaco é composto por um radionuclídeo e um fármaco, são compostos sem ação farmacológica, que têm na sua composição um radionuclídeo (7). A sua produção, distribuição e utilização são consideradas peculiares em comparação aos medicamentos convencionais.

Quando comparados aos fármacos convencionais, a característica única dos radiofármacos é a sua capacidade de destruir células adjacentes as células tumorais, mesmo não sendo estas o seu alvo direto (4). Um agente radioterapêutico em circulação sistémica é capaz de eliminar locais de tumor primários assim como metástases e outras populações celulares não detetáveis em imagiologia de diagnóstico (4).

Os radiofármacos são compostos formulados em diferentes formas químicas e físicas de modo que atingem partes especificas do corpo, e consequentemente, fornecerem informações sobre o comportamento dos sistemas biológicos através da deteção das

radiações emitidas pelos mesmos. As características físico-químicas do radiofármaco determinam a sua farmacocinética, isto é, a sua fixação no órgão alvo, metabolização e eliminação do organismo, enquanto que as características físicas do radionuclídeo determinam a aplicação do composto em diagnóstico ou terapia (5–7).

Relativamente à biodistribuição, os radiofármacos podem ser considerados (4,8):

1) **de perfusão** – a biodistribuição é determinada pelas características químicas e físicas (lipofília, carga e tamanho entre outras) da molécula que constitui os radiofármacos;
2) **específicos** – o radiofármaco incorpora uma biomolécula com alta afinidade e especificidade para o alvo molecular sobreexpresso ou processo bioquímico característico das células a visualizar (diagnóstico) ou a eliminar (terapia).

Na grande maioria dos radiofármacos utilizados para fins clínicos são de perfusão, sendo também classificados como radiofármacos de 1ª geração (9). Os radiofármacos que incorporam uma biomolécula que direcione o radionuclídeo para os tecidos alvo são designados de 2ª geração (8,9).

Os radiofármacos podem ser compostos por radionuclídeos metálicos. Quando tal acontece, os radiofármacos específicos envolvem um agente quelante bi-funcional[a] adequado para se ligar a uma dada molécula biológica (Figura 1) (8). No entanto, qualquer que seja o radiofármaco deve apresentar uma elevada atividade específica[b], pois um excesso do agente quelante bi-funcional, que está ligado à biomolécula, pode saturar os recetores aos quais se deveria ligar o radiofármaco. Os ligandos de recetores membranares, em particular os pequenos péptidos biologicamente ativos com afinidade para recetores associados à proteína G, têm sido das biomoléculas mais exploradas para vetorizar radiofármacos específicos (8).

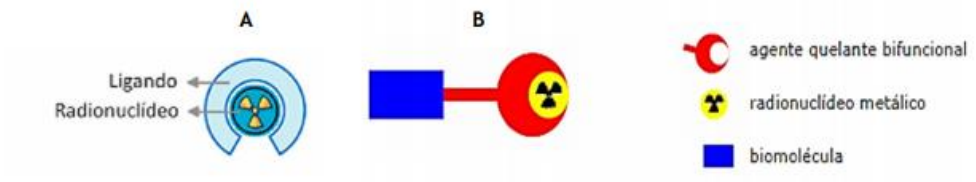

Figura 1-Esquema de um radiofármaco de perfusão (A) e de um radiofármaco específico (B) em que o radionuclídeo é um metal (8).

Quando se produz um radiofármaco, primeiro escolhe-se o fármaco, baseando-se na ação do fármaco na respetiva função fisiológica do órgão, e, em seguida escolhe-se o radionuclídeo que irá ser marcado no fármaco (5,7).

---

[a] Agente Quelante bi-funcional- tem como finalidade a formação de quelatos, formar complexos hidrossolúveis, onde ião metálico é envolvido por ligações covalentes com a capacidade de estabilizar o centro metálico e adequado para a sua ligação a uma dada molécula.

[b] Atividade especifica- atividade por unidade de massa do agente quelante bi-funcional contendo a biomolécula.

Quando se utilizam radiofármacos de diagnóstico na tomografia por emissão de positrões (PET, sigla em inglês), estes são particulares emissores de partículas β+. Estas partículas ao serem injetadas no doente sobre a forma de radiofármacos, vão se ligar a células cujo a sua atividade se pretende estudar. Isto é, os positrões colidem com eletrões de átomos do corpo do doente. Esta colisão irá produzir dois fotões gama(γ) de elevada energia por aniquilação, que são detetados por câmaras especiais("PET*scanners*") (6,10). Para além desta particularidade de produzir dois fotões apresenta ainda outra propriedade de serem emitidos em direções opostas embora com a mesma energia 511keV, independentemente do isótopo utilizado (6).

A tomografia por emissão de positrões é um exame imagiológico que utiliza radionuclídeos que emitem um positrão no momento da sua desintegração. O mapa da distribuição de um radiofármaco emissor de positrões num determinado corte do corpo (11) estabelece a capacidade de medir de forma não invasiva a espessura do substrato. O decaimento por emissão de positrões pode ser descrito por:

$$ {}^{A}_{Z}X \rightarrow {}_{Z-1}^{A}Y + {}_{Z-1}^{0}e + \upsilon $$

onde o radionuclídeo X decai para o radionuclídeo Y, com a subsequente emissão de um positrão(β+) e de um neutrino (υ) (11).

O padrão de distribuição da radiação num órgão ao longo do tempo permite uma avaliação da morfologia e da função do respetivo sistema. Para além destas considerações em âmbito de diagnóstico, é também importante que o radiofármaco se concentre no órgão alvo de estudo, uma vez que a atividade nas áreas não alvo podem por vezes ocultar informações relevantes do órgão-alvo e consequentemente comprometer o diagnóstico (6).

A tomografia por emissão de positrões associada à tomografia computadorizada (PET/CT), é um dispositivo que reúne as características de medicina nuclear (PET) e de radiologia (CT) conseguindo obter-se imagens metabólicas (PET) e anatómicas sobrepostas (CT) (12).

1.1.2. Características do radiofármaco ideal

Os radiofármacos devem apresentar caraterísticas favoráveis, de forma a que as suas radiações possam ser detetadas e possam ser administrados de forma segura (6), de entre as quais se destacam:

i. Acessibilidade

Os radiofármacos devem ser acessíveis, i.e., devem ter uma produção facilitada, com um baixo custo de produção, e encontrar-se disponíveis facilmente nos laboratórios de indústria farmacêutica. São fatores limitantes os métodos de produção muito complexos e

ainda grandes distâncias entre o local de produção e o consumidor final, pois implica um aumento do custo e devido ao curto tempo de semivida destes compostos (13).

ii. Tempo de semivida biológica

Uma das caraterísticas individuais de cada radionuclídeo é o tempo de semivida. Os radiofármacos são eliminados pelo organismo por processos semelhantes aos dos fármacos convencionais, ou seja, apresentam um tempo de semivida biológica. No caso dos radiofármacos, este é definido como o tempo necessário para desintegrar metade da massa do radioisótopo do organismo (13). Pretende-se que o tempo de semivida efetiva de um radiofármaco seja suficientemente curto para minimizar a exposição do doente à radiação, mas suficientemente longo para permitir adquirir e processar as imagens (5).

iii. Emissão de partículas α e β

Os radiofármacos maioritariamente apresentam como principal finalidade diagnosticar patologias e disfunções no organismo. Podendo também ser utilizados como terapêuticos de determinadas doenças, particularmente no tratamento de tumores radiossensíveis (14).Contudo, quando a sua finalidade é diagnosticar patologias, utilizam-se radiofármacos que na sua composição apresentem radionuclídeos emissores de radiação gama (γ) (13). Esta radiação é uma onde eletromagnética e, portanto, expõe grande penetração perante os tecidos (13,14). Esta radiação apresenta também pequena capacidade de ionização comparativamente com as radiações particulares emitidas pelos núcleos dos átomos radioativos de partículas α e β. A sua baixa capacidade de ionização da radiação gama (γ) minimiza a dose de radiação absorvida a que o doente possa estar exposto (13,14).

No que diz respeito à emissão de partículas, as partículas alfa danificam mais os tecidos do que os raios γ e, por isso, o seu uso no diagnóstico deve ser cauteloso. No entanto, a emissão de partículas é vantajosa na terapêutica, visto que a sua radiação danifica as células prejudiciais ao organismo humano. No que diz respeito às partículas beta apesar de serem pouco mais penetrantes que as partículas alfa, já não apresentam riscos (6).

Assim, num processo de decaimento radioativo para fins de diagnóstico não é favorável a emissão de partículas α e β de um radionuclídeo (13), uma vez que a radiotoxicidade pode tornar-se prejudicial para o doente. Por outro lado, quando a finalidade da utilização dos radiofármacos é terapêutica, o efeito nocivo da radiação é utilizado com o objetivo de destruir células tumorais. E, neste contexto, os radiofármacos utilizados são compostos por radionuclídeos emissores de partículas α e β (13,14). Estas, embora possuam baixo poder de penetração, são altamente energéticas e assim vão ionizando o meio por onde atravessam e, consequentemente, causando efeitos que originam a morte das células tumorais (14).

iv. Elevado Contraste

Para a construção de um radiofármaco ideal para fins de estudo de diagnóstico, o radiofármaco a utilizar deve ter a capacidade de produzir elevado contraste. Isto é, o radiofármaco deve ter elevada afinidade para o seu alvo e baixa afinidade para um “não alvo” (13).

As caraterísticas enumeradas, desde acessibilidade, tempo de semivida biológica, emissão de partículas α e β e ainda o elevado contraste são fundamentais para produção de um radiofármaco eficaz. O radiofármaco ideal deve ser facilmente produzido, não dispendioso e encontrar-se disponível de forma a otimizar o seu uso (5,7) e proporcionar a máxima eficácia no diagnóstico de doenças e uma dose mínima de radiação para o doente.

1.1.3. Riscos para a saúde

Tendo em conta a natureza dos radiofármacos existem requisitos específicos para a sua utilização de modo seguro e eficaz. Assim, estes compostos requerem a utilização de procedimentos para proteger os doentes da exposição à radiação emitida pelos radiofármacos, para proteger as pessoas que manuseiam e para proteger a saúde pública no geral de forma a evitar e controlar o desperdício ambiental radioativo (5).

O manuseamento de todo o material radioativo exige que os profissionais de saúde tenham a devida formação e experiência no manuseio destes materiais (15). Estão preconizados os requisitos específicos para as unidades onde são preparados radiofármacos, no que diz respeito a diversos fatores, nomeadamente (15):

- Instalações, sua localização e distribuição;
- recursos humanos, médicos, farmacêuticos, físicos, técnicos de medicina nuclear, pessoal de enfermagem, administrativo e auxiliar;
- equipamento, critérios de aceitabilidade, controlo de qualidade, segurança mecânica, equipamentos destinados à proteção radiológica, equipamento de reanimação;
- procedimentos de radiofarmácia; segurança e proteção radiológica; e qualidade.

1.2. Indústria farmacêutica e regulamentação do setor

O setor do medicamento é extremamente regulamentado (16). Durante todo o seu ciclo de vida, os medicamentos de uso humano estão sujeitos a normas de qualidade, eficácia, segurança e associados a um conjunto de responsáveis com o intuito de o colocarem no mercado, quer das autoridades competentes nacionais quer comunitárias.

A indústria farmacêutica é reconhecida por ser altamente regulamentada, pelo que dispõem de normas e regras que geram um controlo muito rigoroso desde o início do desenvolvimento do medicamento até à libertação dos mesmos no mercado (17). O sistema

de Autorizações de Introdução no Mercado (AIM), tem em conta que é preciso garantir que todos os medicamentos são avaliados e controlados por autoridades competentes e que apresentam a capacidade de assegurar a conformidade com os requisitos de segurança, qualidade e de eficácia em vigor no momento (17).

A entidade reguladora responsável pela regulação do medicamento em todo o seu circuito, desde o fabrico de matérias-primas até à sua dispensa e utilização dos doentes (1,2), é a Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P. (INFARMED, IP) (2). O INFARMED é responsável por avaliar o cumprimento da conformidade regulamentar e emitir um certificado de cumprimento das normas GMP (*Good Manufacturing Practice*). Além disso, é o INFARMED que concede a autorização para que um medicamento seja colocado no mercado, a Autorização de Introdução no Mercado (AIM), de modo a garantir a qualidade, a segurança e eficácia dos medicamentos (2).

1.3. Controlo de qualidade

Diariamente, por todo o mundo em milhares de laboratórios são aplicadas diferentes e infinitas medidas analíticas que envolvem uma ampla atividade socioeconómica (18). Todas estas medidas analíticas que se aplicam são consideradas o suporte de muitas das decisões que estão na base das sociedades modernas, como por exemplo, avaliar a qualidade da água de consumo, também como suporte de decisões de saúde, segurança alimentar e proteção ambiental (18).

O controlo de qualidade é um conjunto de procedimentos destinados a verificar a qualidade de cada lote de medicamentos, para que satisfaçam os requisitos de qualidade previamente estabelecidos (3,19). Para que a indústria farmacêutica consiga oferecer sempre produtos seguros, eficazes e de qualidade, é necessário o departamento de controlo e qualidade de medicamentos nas Indústrias Farmacêuticas (19). A área de controlo e qualidade é decisiva e imprescindível para que o processo de produção se consiga ir mantendo de forma padronizado e controlado (19). Na indústria farmacêutica, a aprovação e a reprovação de lotes de medicamentos é responsável pelo controlo e qualidade dos medicamentos (19).

1.3.1. Princípios de qualidade na indústria farmacêutica

Na indústria farmacêutica, a qualidade analítica é um fator crucial para obter o sucesso dos programas de desenvolvimento, assim como, a produção e controlo de qualidade dos medicamentos (18). Na produção ou desenvolvimento da síntese de uma nova molécula é fundamental os resultados analíticos, pois suportam os estudos de novas formulações, estabelecem prazos de validade baseados na estabilidade da molécula (18). Por outro lado,

estes resultados analíticos são também utilizados com a missão de avaliar a conformidade dos materiais com as especificações de qualidades instituídas (18).

É com base nos resultados analíticos que é permitido a distinção entre um produto bom/aceitável de um outro de qualidade inferior/rejeitável (18). Esta é uma área crítica da indústria farmacêutica, sendo inadmissível aceitar ou até mesmo rejeitar um produto com base numa análise incorreta (18). Resultados dúbios ou pouco credíveis implicam um trabalho adicional na repetição da análise, que por sua vez, implicam maiores custos e atrasos no processo de produção de um medicamento (18). Assim, diretrizes específicas são seguidas para evitar resultados dúbios ou pouco credíveis.

O mais comum é os laboratórios provarem a qualidade dos seus resultados analíticos demonstrando que os resultados obtidos numa produção satisfazem os níveis de precisão e exatidão para o fim a que se destinam (20). Para concretizar este objetivo existem várias práticas de qualidade que se encontram minuciosamente descritas na literatura e nos protocolos, padrões e diretrizes dedicadas à garantia de qualidade (18).

As medidas de controlo e qualidade existentes compreendem práticas que são quase independentes, que foram e estão em constante desenvolvimento pelos químicos analíticos em situações especificas (18). Algumas das práticas utilizadas e estabelecidas nos métodos validados já alguns anos são, o controlo de qualidade interno, a análise de materiais de referência certificados, a indicação da incerteza e rastreabilidade dos resultados, e o controlo e qualidade externo (18).

Com o passar dos anos, estas práticas têm vindo a evoluir de forma diferente e consoante o setor em que se encontre a atividade analítica sendo-lhe atribuída uma importância relativa à sua utilidade na implementação da qualidade (18). Assim, esta situação de evolução resultou num conjunto de práticas e conceitos que, por vezes, dificulta os peritos em qualidade, em avaliar se as práticas são insuficientes ou redundantes (18).

Para evitar a duplicação de esforços para atingir a qualidade surgiu a necessidade de criar um programa de garantia de qualidade coerente que defina, com clareza, quais as práticas a aplicar em cada situação particular. Habitualmente as práticas integradas num programa de garantia de qualidade devem incluir, ou utilizar (18):

1. Pessoal competente, qualificado e devidamente treinado para executar a tarefa
2. Utilizar equipamentos e materiais calibrados
3. Definir o fim a que se destinam os resultados
4. Utilizar métodos validados
5. Utilizar materiais de referência
6. Quantificar a incerteza e rastreabilidade dos resultados
7. Controlo de qualidade interno bem definido
8. Controlo de qualidade externo

9. Acreditação e certificação

Para formalizar este consenso foram recentemente identificados seis princípios básicos de qualidade para a prática analítica, que surgiram de uma iniciativa destinada a promover as boas práticas de medida analítica (18):

1. As medidas analíticas devem satisfazer um objetivo definido
2. As medidas analíticas devem ser efetuadas utilizando métodos e equipamentos que foram testados de maneira a garantir que são adequados para o fim a que se destinam (validação).
3. O pessoal que executa as análises deve ser qualificado e competente para desempenhar a tarefa.
4. Deve ser feita uma avaliação independente regular para o desempenho técnico de um laboratório.
5. As medidas analíticas feitas num local devem ser consistentes com outras realizadas noutro local qualquer.
6. As organizações que efetuam medidas analíticas devem definir concretamente os procedimentos de controlo e garantia de qualidade.

1.3.2. Validação de métodos analíticos

Uma das principais condições em qualquer processo que envolva análises químicas é a obtenção de dados de qualidade que superem os objetivos propostos (21). A validação dos métodos analíticos é descrita como um processo que permite demonstrar que os métodos são adequados aos requisitos exigidos pela aplicação analítica pretendida (22). Resumidamente, o processo de validação pretende demonstrar que o método é adequado para a quantificação do analito na matriz, a um certo nível de concentração, com alguns parâmetros como seletividade, precisão, repetibilidade, limite de deteção, limite de quantificação e exatidão satisfatórios (22).

Um método de ensaio consiste num processo envolvem a manipulações suscetíveis à acumulação por vezes de erros, quer erros sistemáticos e/ou aleatórios. Quando ocorre um deste tipo de erros em algumas situações irá alterar de forma significativa o resultado final (22). Assim, é importante que em cada laboratório disponha de protocolos e critérios objetivos para determinado processo. De forma, a demonstrarem através dos métodos de validação descritos para o processo específico que os métodos internos de ensaio que executam levam a que os resultados sejam credíveis e adequados à qualidade a que se pretende obter (22).

As definições e estratégias que definem o processo de validação encontram-se descritos em artigos, relatórios e também e em Guidelines/diretrizes definidas pelos comités industriais e por autoridades reguladoras (18). Algumas destas autoridades reguladoras reconhecidas internacionalmente na área da análise química, como a *International Standard*

Organization (ISO) (23), a *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)* e a *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)*, a *EURACHEM - A focus for analytical chemistry in Europe, em cooperação com The Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry (CITAC)*, e a *United States Environmental Protection Agency (US EPA)*, *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use(ICH) (NOTE FOR GUIDANCE ON VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY (CPMP/ICH/381/95))* (24), publicam regularmente textos atualizados sobre a matéria. A grande maioria das definições recomendadas por estas autoridades são concordantes, o que torna o processo cada vez mais fácil de estabelecer, em qualquer área de aplicação da química analítica (18).

Na indústria farmacêutica os procedimentos analíticos são utilizados para verificar se os produtos farmacêuticos asseguram a sua identidade, potência e pureza, e satisfazem aos requisitos de qualidade (18). Para cada um destes procedimentos analíticos pode ser utilizado uma grande variedade de técnicas e tecnologias analíticas, sendo que as exigências de desempenho dependem da aplicação pretendida. O processo de validação na indústria farmacêutica tornou-se oficial com a incorporação da secção "validação de métodos" nos regulamentos das GMP (25). Outra organização que também publicou diretrizes para a validação de métodos foi a United States Pharmacopeia (USP) (18,26), tornando obrigatória a utilização de métodos documentados e validados para o registo e autorização de comercialização de novos medicamentos (18). A nível mundial, a validação de métodos ficou padronizada na área da indústria farmacêutica após a publicação das diretrizes da ICH (18,24).

As especificações descritas nas Farmacopeias[c] (16) compõem os ensaios de avaliação dos produtos farmacêuticos. Em conformidade com estes documentos oficiais, os utilizadores dos métodos descritos não são obrigados a avaliar a exatidão e credibilidade destes métodos, apenas precisam de verificar que são apropriados para as condições atuais de utilização (18). Contudo, quando se propõem novos métodos, ou quando se apresenta uma proposta de revisão de um método validado, são necessários dados laboratoriais que demonstrem a validação do método proposto (18). Nestes casos, são necessários resultados analíticos que comprovem que o método proposto (novo método interno, ou método validado revisto) cumpre os requisitos estabelecidos pelas Farmacopeias de referência.

Os ensaios descritos nas Farmacopeias variam entre ensaios altamente seletivos e análises de atributos subjetivos, necessitando cada um deles de diferente informação analítica. As categorias de ensaio mais comuns são classificadas pela USP (18) (Tabela 1):

---

[c] Documentos oficiais com valor legal que acompanham a evolução científica e tecnológica ligada aos medicamentos, garantindo a atualização da qualidade dos mesmos, salvaguardando assim a Saúde Pública.

1) Categoria I - Métodos analíticos utilizados para quantificar as substâncias ativas na matéria-prima, ou nos produtos farmacêuticos formulados.

2) Categoria II - Métodos analíticos para determinar impurezas, ou produtos de degradação, na matéria-prima ou nos produtos farmacêuticos formulados. Estes métodos incluem os testes quantitativos e os testes limite de impurezas. Ambos pretendem refletir de uma forma exata as características de pureza da amostra, no entanto, as características de validação são mais exigentes para os testes quantitativos.

3) Categoria III - Métodos analíticos para determinar características específicas de desempenho (ex., testes de dissolução, de libertação de fármaco). Estes métodos devem ser altamente seletivos e sensíveis, pois têm de determinar o analito na presença de excipientes, impurezas e compostos de degradação.

4) Categoria IV - Testes de identificação. Estes testes garantem a identidade de um analito numa amostra e são normalmente uma comparação apropriada (espectro, comportamento cromatográfico, reatividade química) entre uma propriedade da amostra e a mesma propriedade de um padrão de referência.

Tabela 1-Elementos necessários para a validação de um ensaio

Carateristicas Analíticas	Categoria ensaio I	Categoria Ensaio II		Categoria ensaio III	Categoria ensaio IV
		Quantitativo	Testes Limite		
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Limite de deteção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de Quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não

As estratégias de validação propostas na literatura podem ser distinguidas em duas categorias independentes: a validação interna e a validação interlaboratorial.

A validação interna designa-se como uma série de estudos em diferentes parâmetros de desempenho de determinado método analítico, realizadas num único laboratório. Com a finalidade de validar um novo método implementado por esse laboratório (18). Assim, na industria farmacêutica quando se pretende desenvolver um método para testar um novo medicamento, utiliza-se este tipo de validação, uma vez que, é flexível, fornece resultados rapidamente e ainda porque também não necessita da colaboração de mais nenhum

laboratório concorrente (18). Este método também apresenta algumas desvantagens como, redução da quantidade de informação que é possível obter, o que vai dificultar a comparação interlaboratorial (18).

A validação interlaboratorial consiste na realização de estudos de validação interlaboratoriais. Neste tipo de validação existe, portanto, vários protocolos publicados com ela relacionados. Este tipo de validação apresenta algumas vantagens como, é mais demorada mas por outro lado é também considerada a melhor forma de testar exaustivamente um determinado processo analítico (18). A validação interlaboratorial é ideal quando se tem o objetivo de publicar o método como um procedimento padrão e que vai ter utilidade em diferentes laboratórios (18).

Em suma, a validação é, portanto, uma parte do processo do programa de garantia de qualidade analítica e é considerada uma estratégia central para aceder à qualidade analítica (18). A validação é importante, não só para os laboratórios ou instituições como para os clientes destes, na medida em que é fundamental saber selecionar o método que melhor se adapta a cada análise e assegure a validade dos resultados (18,22). Os procedimentos utilizados para avaliar os produtos farmacêuticos asseguram a sua identidade, potência e pureza, e têm de satisfazer determinados requisitos impostos legalmente (18).

Os requisitos mínimos para a validação de métodos internos de ensaio dependem do tipo de método em causa e compreende o estudo e conhecimento dos seguintes parâmetros (22,24,27,28):

- Identificação do analito;
- Especificidade / Seletividade;
- Gama de trabalho;
- Linearidade;
- Limites de deteção (LOD);
- Limites de quantificação (LOQ);
- Precisão (repetibilidade, precisão intermedia e reprodutividade);
- Exatidão;
- Robustez;

O processo de validação envolve o estudo de parâmetros por avaliação direta e por avaliação indireta, e deverá pelo menos abranger as partes ou alterações cuja validação não tenha sido feita por um organismo conhecido (22).

i. Especificidade

O termo especificidade, é por vezes utilizado como sinónimo de seletividade. A especificidade é a componente que define a capacidade do método em avaliar inequivocamente o analito de interesse na presença de componentes que poderão estar

presentes na amostra. Já a seletividade refere-se à capacidade de deteção de substâncias (22,28). Estes componentes, normalmente, podem incluir impurezas, matrizes entre outros (27). Para analisar as interferências normalmente realiza-se um teste de recuperação utilizando uma série de amostras, com a mesma matriz, em que apenas varia a concentração do analito em proporções bem conhecidas e ao longo de toda a gama de trabalho (22).

A análise da especificidade deve ser conduzida durante a validação dos testes de identificação, determinação de impurezas e o ensaio (28). O processo usado para demonstrar a especificidade do método depende do objetivo pretendido do procedimento analítico. Este parâmetro pode ser estabelecido em diferentes técnicas analíticas como por exemplo, nas análises cromatográficas, sendo conseguido pela comparação do resultado obtido com a combinação de vários fatores. Como substâncias diferentes podem apresentar respostas similares em dadas condições deve-se proceder à análise, seguida por outras técnicas capazes de comprovar (como cromatografia ou eletroforese acoplada à espectrometria de massas) (24). Outra forma de avaliar este parâmetro envolve a adição de padrão analítico ou a comparação com padrão externo (24).

Os testes de identificação são usados para garantir a identidade de um analito e demonstram-se adequados quando atestam a sua presença e são capazes de distinguir compostos de estruturas relacionadas entre si. Esta distinção de compostos pode ser confirmada pela obtenção de resultados positivos e negativos de amostras (24). Desde que os resultados positivos destas amostras contenham o analito e os resultados negativos não contenham o analito (27,28).

Os testes de impurezas são utilizados para procedimentos cromatográficos para garantir que todos os procedimentos analíticos realizados permitem uma determinação precisa do teor de impurezas de um analito, ou seja, teste de substâncias relacionadas, metais pesados, teor de solventes residuais (24). Este teste tem como finalidade de demonstrar a especificidade e os componentes individuais (24). As separações críticas em cromatografia devem ser estudadas num nível apropriado (28). Para separações críticas, a especificidade pode ser demonstrada pela resolução dos dois componentes que eluem mais próximos um do outro (24,27).

Um ensaio onde as impurezas estão disponíveis deve abranger a distinção do analito na presença de impurezas ou até de excipientes. Em contexto prático esta distinção pode ser feita adicionando substâncias puras, tais como, substâncias ativas ou de produto com níveis apropriados de impurezas e / ou excipientes comprovando que no final o resultado do ensaio não é afetado pela presença desses materiais quando se compara esses resultados obtidos em amostras pouco relevantes, demonstrando a separação dessas impurezas individualmente ou então a separação de outros componentes na matriz da amostra (27).

Quando os padrões de impurezas ou os produtos de degradação não estão disponíveis para a distinção do analito, a especificidade (28) pode ser demonstrada comparando os resultados dos testes de amostras contendo impurezas ou comparando com os produtos de degradação com um segundo procedimento bem caracterizado (24,27). Este procedimento bem caraterizado pode ser por exemplo, um método farmacopeico ou qualquer outro procedimento independente- procedimento analítico validado (24,28).

O ensaio (conteúdo ou potência) fornece um resultado exato que permite uma determinação precisa sobre o conteúdo ou a potência do analito em uma amostra. Quando se pretende demonstrar que determinado procedimento analítico é específico, recomenda-se a utilização de uma combinação de dois ou mais procedimentos analíticos de modo a atingir o nível de discriminação necessário (24,28).

Na prática, a especificidade é obtida em amostras de fármacos, com quantidades convenientes de impurezas, e demonstrando que na presença destes componentes os resultados dos ensaios se mantêm inalterados (18).

Quando pretende demonstrar o grau de especificidade, através das técnicas cromatográficas os documentos publicados pela ICH (24) recomendam a apresentação de cromatogramas representativos, com os picos devidamente assinalados (18). A pureza dos picos pode ser útil para provar que o pico cromatográfico do analito não é atribuído a mais do que um componente (18,24).

ii. Exatidão

A exatidão de um procedimento analítico refere-se à proximidade entre o valor que é aceite como um valor verdadeiro convencional ou um valor de referência e o valor encontrado (27,28). A exatidão deve ser estabelecida dentro da faixa especifica do procedimento analítico, habitualmente esta faixa especifica deve situar-se entre 80-120% do valor que se pretende medir (18,28). Antes de verificar a validação deste parâmetro deve ser expresso objetivamente qual a exatidão máxima aceitável, estando sempre por base o fim a que se destina a análise (18).

De todos os parâmetros a determinação do parâmetro da exatidão é o que apresenta uma tarefa mais complicada, devido à dificuldade de saber qual é o resultado considerado verdadeiro. Contudo e de acordo com a literatura são consideradas quatro estratégias para avaliar a exatidão de um método analítico, nomeadamente, a análise de um material de concentração conhecida, comparação dos resultados obtidos com um método de referência, estudos de recuperação numa amostra branco e estudo de recuperação através do método da adição padrão (18).

A indústria farmacêutica utiliza diretrizes para análise dos produtos farmacêuticos que definem as estratégias que podem ser utilizadas para avaliação da exatidão dos diferentes tipos de análises quantitativas (Tabela 2).

Tabela 2- Estratégias para demonstrar a exatidão de acordo com as normas propostas pela ICH

Princípio ativo	Aplicação do procedimento analítico a um material de referência Comparação dos resultados com um segundo procedimento bem caracterizado
Produto formulado	Aplicação do procedimento analítico a misturas sintéticas de componentes do produto formulado Fortificar o produto formulado com analito Comparação dos resultados com um segundo procedimento bem caracterizado
Impurezas	Fortificar o princípio ativo ou o produto formulado com impurezas Comparação dos resultados com um segundo procedimento bem caracterizado

Vários métodos para determinar a exatidão estão disponíveis, tais como (24):

Ensaio Princípio Ativo

a) A aplicação de um procedimento analítico a um analito de pureza conhecida como por exemplo um composto de referência.
b) Comparação dos resultados do procedimento analítico proposto com os de um segundo procedimento bem caracterizado, cuja a exatidão é definida.
c) A exatidão pode ser obtida uma vez que a precisão, linearidade e especificidade tenham sido estabelecidas.

Ensaio Componente principal

a) A aplicação do procedimento analítico a misturas sintéticas dos componentes do produto às quais foram adicionadas quantidades conhecidas da substância a ser analisada;
b) Nos casos em que é impossível obter amostras de todos os componentes do produto, pode ser aceitável adicionar quantidades conhecidas do analito ao produto ou comparar os resultados obtidos a partir de um segundo procedimento bem caracterizado, cuja exatidão é definida
c) A exatidão pode ser inferida uma vez que exista precisão, linearidade e também especificidade estabelecidas.

A exatidão deve ser avaliada em amostras que apresentem uma quantidade significativa e conhecida de impurezas (24,28). Contudo, existem situações que não se consegue alcançar amostras de certas impurezas e/ou produtos de degradação (24,28). Nestas situações considera-se oportuno comparar os resultados obtidos através de um procedimento independente. Nos métodos de validação é importante ser claro como se consegue determinar as impurezas individuais ou totais em relação ao analito principal (24,27).

A exatidão deve ser avaliada usando um mínimo de 9 determinações com um mínimo de 3 níveis de concentração da faixa especificada (24). Isto é, por exemplo, 3 concentrações com 3 repetições de cada uma do procedimento analítico total (24). A exatidão deve ser expressa como % de recuperação do ensaio da quantidade adicionada conhecida de analito na amostra ou também poderá representar a diferença entre a média e o valor verdadeiro acompanhado com os intervalos de confiança (24,27). A exatidão de um método analítico é avaliada comparando, através de testes estatísticos, o valor de concentração estimado da amostra de referência, com o valor de concentração da amostra de referência considerando verdadeiro. O teste t de *Student* é descrito para avaliar o significado estatístico da diferença entre dois resultados próximos (18).

iii. Precisão

A precisão é o grau de variação de resultados de uma medição (24). É outro critério que expressa a proximidade de concordância entre uma série de medições obtidas através de diferentes concentrações de amostras da mesma amostra homogénea as condições estabelecidas (24,28). A precisão define-se como o grau de dispersão dos resultados obtidos a partir de análises múltiplas de uma amostra homogénea (18).

Os estudos de precisão devem ser realizados seguindo os procedimentos operacionais e utilizando o mesmo tipo de amostras que irão ser utilizadas no método final, para que o valor de precisão calculado seja representativo das condições autênticas. A precisão de um procedimento analítico é geralmente expressa como a variância, desvio padrão ou coeficiente de variação de uma série de medições (24).

A precisão pode ser considerada em três níveis diferentes, nomeadamente, a repetibilidade, a precisão intermediária e a reprodutibilidade (27,28).

A <u>repetibilidade</u> expressa a precisão nas mesmas condições iniciais, num curto intervalo de tempo. A repetibilidade deve ser avaliada usando(24): a) um mínimo de 9 determinações cobrindo a faixa especificada para o procedimento (por exemplo 3 concentrações / 3 repetições cada); b) um mínimo de 6 determinações a 100% da concentração de teste.

A <u>precisão intermediária</u> é definida por variações dentro dos laboratórios: dias diferentes, analistas diferentes, equipamentos diferentes, etc (24). Esta deve ser estabelecida consoante as circunstâncias a que o procedimento se destina a ser usado (27). Não é considerado necessário estudar esses efeitos individualmente.

A <u>reprodutibilidade</u> expressa a precisão interlaboratorial, isto é, em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia.

O desvio padrão, o desvio padrão relativo (coeficiente de variação) e o intervalo de confiança devem ser descritos para cada tipo de precisão investigada (27).

iv. Linearidade

A linearidade de um procedimento analítico refere-se à capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração de analito na amostra, incluídos na faixa analítica especifica (18,24,28). Uma relação linear deve ser avaliada em toda a faixa do procedimento analítico. Pode ser demonstrado diretamente na substância ativa e / ou em pesagens separadas de misturas dos componentes do produto, utilizando o procedimento proposto (27).

A dependência linear do sinal é a situação mais conveniente e o mais utilizado na análise de produtos farmacêuticos (18). Numa relação linear, os resultados do procedimento de linearidade devem ser comprovados através de métodos estatísticos apropriados, como por exemplo, o cálculo de uma linha de regressão pelo método dos mínimos quadrados. Por outro lado os dados obtidos através da reta de regressão também poderão ser importantes para fornecer estimativas como a do grau de linearidade (27).

Deste modo, a linearidade pode ser demonstrada pelo coeficiente de correlação do gráfico analítico, que não deve ser estatisticamente diferente de 1 (avaliado pelo teste “t” de Student) (27), observando a inclinação da reta, tendo esta de ser diferente de zero. Assim, é necessário obter coeficiente de correlação estatisticamente igual a um e coeficiente angular diferente de zero (24,27,28).

Para avaliar a linearidade (24) de um procedimento é importante contabilizar o coeficiente de correlação, a interceção com eixo do y, inclinação da linha de regressão e a soma residual dos quadrados, assim, como deve ser incluído um gráfico que represente os dados de todo o procedimento (27).

Alguns procedimentos analíticos, como os imunoensaios, não demonstram linearidade após qualquer transformação, como por exemplo dados obtidos de uma cromatografia em camada fina e também em ensaios imunológicos (18,24,27). Por esta razão, alguns autores consideram o termo "resposta analítica" mais apropriado para esta característica de validação (18). Neste caso, a resposta analítica deve ser descrita por uma função apropriada da concentração de um analito em uma amostra (28). Num método analítico designa-se como intervalo o conjunto das concentrações (incluindo os extremos) no qual o método origina resultados aceitáveis em termos de precisão, exatidão e linearidade (18). Assim, de forma a se obter o intervalo de linearidade de um método é recomendado, um mínimo de 5 concentrações diferentes (18,24).

v. Alcance

O alcance de um procedimento analítico é o intervalo entre a concentração superior e inferior do analito na amostra (incluindo essas concentrações) para o qual foi demonstrado que o procedimento analítico é preciso, exato e linear.

vi. Limite de deteção

De acordo com o ICH, o limite de deteção (LOD) de um procedimento analítico individual é definido como a menor quantidade de analito que pode ser detetada em uma amostra, mas não necessariamente quantificada como um valor exato sobre condições experimentais estabelecidas (18,24,27). Ou seja, o limite de deteção é a concentração mais baixa de analito que pode ser detetada de forma confiável e distinta de zero (ou a nível de ruído do sistema), mas não necessariamente quantificado na concentração em que um valor medido for maior que a incerteza associada a ele (29).

Quando analistas desenvolvem métodos novos ou por outro lado quando tem como finalidade modificá-los para análise de gráficos, regularmente definem Limites de Deteção em função do desvio-padrão de amostras de brancos (24,27). Como um branco é constituído por todos os reagentes, com exceção da amostra e do analito, não reproduz as mesmas condições a que o analito estará sujeito durante a análise (24,28). O LOD quando determinado desta forma pode assim avaliar mudanças que ocorreram durante o desenvolvimento do método (27,28).

O limite de deteção pode ser determinado mediante o sinal-ruído, o desvio-padrão resposta e do coeficiente angular e por processos estatísticos (24,28). Existem diferentes tipos de abordagens para determinar o limite de deteção consoante o procedimento é ou não instrumental (27), nomeadamente (24):

Com base na avaliação visual

A avaliação visual pode ser usada para métodos não instrumentais, mas também pode ser usada com métodos instrumentais (24). O limite de deteção é determinado pela análise de amostras com concentrações conhecidas de analito e pelo estabelecimento do nível mínimo no qual o analito pode ser detetado com segurança (24).

Com base no sinal para ruído

Esta abordagem só pode ser aplicada a procedimentos analíticos que exibem ruído de linha de base (24,28). A determinação da razão sinal-ruído é realizada comparando os sinais medidos de amostras com baixas concentrações conhecidas de analito com aquelas de amostras em branco e estabelecendo a concentração mínima na qual o analito pode ser detetado com segurança (24,27).

Com base no desvio padrão da resposta e na inclinação

O limite de deteção (LOD) pode ser expresso como:

$$LOD = \frac{3.3\sigma}{S}$$

Onde,

σ = desvio padrão da resposta

S = inclinação da curva de calibração

A inclinação da curva de calibração (S) pode ser obtida a partir da curva de calibração do analito. Por outro lado, o desvio padrão já pode ser obtido por diferentes maneiras, como por exemplo (24).

Com base no desvio padrão do branco

A medição da magnitude da resposta analítica de base é realizada analisando um número apropriado de amostras em branco e calculando o desvio padrão dessas respostas(27).

Com base na curva de calibração

Uma curva de calibração específica deve ser estudada usando amostras contendo um analito na faixa de LOD (24). O desvio padrão residual de uma reta de regressão ou o desvio padrão da interceção com o eixo y da reta de regressão pode ser usado como o desvio padrão (24). Se o LOD for determinado com base na avaliação visual ou na relação sinal-ruído, a apresentação dos cromatogramas relevantes é considerada aceitável e justificativa (27,28). Nos casos em que um valor estimado para o limite de deteção é obtido por cálculo ou extrapolação, esta estimativa pode ser posteriormente validada pela análise independente de um número adequado de amostras conhecidas por estarem próximas (24,27).

vii. Limite de quantificação

O limite de quantificação (LOQ) (18,27) de um procedimento analítico é a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser quantificado, com precisão e exatidão adequadas (24). É usado particularmente para a determinação de impurezas e / ou produtos de degradação (24,27). Para a determinação deste parâmetro deve ser seguido o mesmo procedimento descrito no limite de deteção, sendo que, a razão sinal/ruído deve ser superior a 10:1 (29).

O limite de quantificação e o método usado para determinar o limite de quantificação devem ser apresentados nos modelos de validação de método (24,28). Consoante o procedimento seja instrumental ou não são possíveis várias abordagens, nomeadamente (24):

Com base na avaliação visual

A avaliação visual pode ser usada para métodos não instrumentais, mas também pode ser usada com métodos instrumentais. O limite de quantificação é geralmente determinado pela análise de amostras com concentrações conhecidas de analito e pelo estabelecimento do nível mínimo no qual o analito pode ser quantificado com exatidão e precisão (27).

Com base no sinal-ruído

Esta abordagem só pode ser aplicada em procedimentos analíticos que apresentem ruído na linha de base (24). A determinação da relação sinal-ruído é realizada comparando os sinais medidos das amostras com baixas concentrações conhecidas de analito com concentrações de amostras do branco (24).

Com base no desvio padrão da resposta e na inclinação

O limite de quantificação (LOQ) pode ser expresso como (24,27):

$$LOQ = \frac{10\sigma}{S}$$

Onde,

- σ = desvio padrão da resposta
- S = inclinação da curva de calibração

A inclinação da curva de calibração (S) pode ser obtida a partir da curva de calibração do analito(24). A estimativa de σ pode ser realizada de várias maneiras, incluindo (24):

Com base no desvio padrão do branco

A medição da magnitude da resposta analítica é realizada analisando um número apropriado de amostras em branco e calculando o desvio padrão dessas respostas (24,27).

Com base na curva de calibração

Uma curva de calibração específica deve ser estudada usando amostras, contendo um analito na faixa de LOQ (24). O desvio padrão residual de uma reta de regressão ou o desvio padrão da interceção com o eixo Y da reta de regressão pode ser usado como o desvio padrão (24,27).

Em suma, o limite de deteção e o limite de quantificação são indiscutivelmente úteis quando se pretende determinar quantidades vestigiais de analito numa amostra (18). Normalmente, é mais útil avaliar se estes limites são suficientes nas condições a que estão a ser aplicados, do que calcular experimentalmente os seus valores. Se for necessário detetar uma impureza a um nível de concentração de 0,1 %, apenas é necessário demonstrar, através de análises de amostras contendo a impureza acima e abaixo deste valor de concentração, que o procedimento origina resultados de confiança (18).

viii. Robustez

A robustez é um parâmetro de validação que aparece na literatura com alguma ambiguidade, o que induz que por vezes se designe robustez (18). É um procedimento analítico consiste na medida da capacidade do procedimento de permanecer inalterado sob pequenas variações (18,24,27). Por outro lado, a rigidez é um parâmetro que se insere num estudo intralaboratorial, cujo a sua finalidade, é avaliar a influência de pequenas variações nas suas condições ambientais (18). Com base nestas duas definições pode-se concluir que estes dois conceitos apenas diferem no aspeto semântico e não na aplicação prática (18).

A robustez deve ser avaliada durante a fase de desenvolvimento e dependendo do procedimento em estudo. Esta avaliação deve demonstrar a confiabilidade de variações intencionais que se provocam nos parâmetros do método (27,28). Se as medições forem

suscetíveis a variações nas condições analíticas, as condições analíticas devem ser adequadamente controladas. Caso estas não sejam adequadamente controladas deve existir outras formas de justificação incluídas no procedimento (24,27). Exemplos de variações típicas são a estabilidade das soluções analíticas e o tempo de extração (24).

Conclui-se que um método é robusto quando origina resultados confiáveis mesmo introduzindo pequenas alterações variações nos parâmetros do procedimento analítico, que podem ocorrer durante a utilização em rotina. E os testes de robustez, tem como intuito indicar os fatores que podem influenciar, de modo significativamente, a resposta do método em estudo (24,27).

2.1. Instituto Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde (ICNAS)

O instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde (ICNAS) é uma Unidade Orgânica de Investigação da Universidade de Coimbra, com carácter multidisciplinar, inaugurado em 2009. O ICNAS é dirigido pelo Professor Doutor Antero de Abrunhosa, Professor Associado da Faculdade de Medicina da UC, e subdiretor Professor Doutor João Manuel Carvalho Pedroso de Lima, Professor Associado Convidado da Faculdade de Medicina da UC (30).

O ICNAS está localizado no Pólo III – Pólo das Ciências da Saúde da Universidade de Coimbra. Trata-se de um edifício com uma arquitetura moderna (Figura 2) dotado de características adequadas à atividade que desenvolve, nomeadamente no que respeita à proteção radiológica (31). As características e especificidades dos diversos equipamentos e instalações do ICNAS conferem-lhe um carácter multidisciplinar único em Portugal e obrigaram a um minucioso planeamento de modo a cumprir as mais rigorosas normas de segurança (31,32).

Figura 2-Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde (ICNAS).

Esta Unidade Orgânica, juntamente com as Faculdades de Ciências e Tecnologia, de Medicina e de Farmácia, apresenta como objetivos fundamentais (33):

a. Desenvolver a investigação científica, implementar novas técnicas de investigação básica e clínica no âmbito das tecnologias nucleares aplicadas à saúde e divulgar os avanços científicos alcançados na sua área de intervenção;
b. Prestar serviços especializados de saúde no domínio das aplicações biomédicas das radiações;
c. Promover a interdisciplinaridade, explorando as articulações possíveis entre as áreas científicas envolvidas na sua atividade;

d. Desenvolver, ao nível nacional e internacional, a cooperação entre as entidades de investigação, educação e prestação de cuidados de saúde nas áreas científicas a que se dedica.

Caracterizado por um elevado investimento na área da investigação biomédica, mais precisamente na imagem molecular, os objetivos do ICNAS estão também relacionados com a formação avançada e a prestação de serviços à comunidade. Para o efeito, o ICNAS dispõe de duas instituições (34):

- ICNAS - centro de investigação onde se insere a clínica, que compreende as duas áreas da Medicina Nuclear (MN): a Medicina Nuclear Convencional (MNC) e Tomografia de Emissão com Positrões (PET);
- ICNAS- P - empresa de indústria farmacêutica, responsável pela produção de radiofármacos.

O ICNAS centro de investigação dispõe de diversos equipamentos de imagem, como PET-CT (PET - Tomografia Computorizada). O ICNAS-P, apresenta diversas instalações/equipamentos para produção, investigação e desenvolvimento de radiofármacos, como o ciclotrão e os laboratórios GMP (Boas Práticas de Produção); laboratórios de química; instalações dedicadas à experimentação animal e outras que possibilitam a execução de programas de investigação rigorosos e ao melhor nível, desde a pesquisa biomédica básica às aplicações clínicas mais exigentes; Para além destas características, no mesmo edifício encontra-se instalado o Pólo de Coimbra da Rede de Imagiologia Cerebral Funcional que conta com a presença de um tomógrafo MRI (Imagiologia por Ressonância Magnética) de 3 tesla (T) (34).

Assim, o ICNAS é uma unidade completa de Medicina Nuclear, englobando uma unidade clínica equipada com 4 Câmaras Gama (piso 0) e um PET/CT (do inglês *Positron Emission Tomography – Computed Tomography*) (piso -1), uma unidade de produção constituída por um Laboratório de Radiofarmácia e Ciclotrão (piso -2) e ainda uma Ressonância Magnética (piso -2).

Para além do ciclotrão, da unidade de radiofarmácia e das várias modalidades de imagem (PET, CT e MRI), coexistem diversas áreas funcionais:

- clínica / investigação / ensino;
- doentes / animais;
- Medicina Nuclear / Radiologia;
- zonas ativas (quentes) / zonas não ativas (frias);
- diferentes percursos para doentes / pessoal técnico / animais.

O ICNAS, tal como qualquer empresa de sucesso, tem a sua visão e missão claramente definidas e difundidas pela organização. Relativamente à visão da empresa, o ICNAS é pioneiro em (31):

- Aquisição e análise de dados de Medicina Molecular
- Desenvolvimento de novos marcadores moleculares
- Investigação de ponta com técnicas de imagem multimodais
- Imagem médica estrutural e funcional
- Investigação Biomédica translacional

Para responder à sua missão (32) o ICNAS colabora com uma vasta rede de parceiros nacionais e internacionais nas várias áreas da imagem médica. É um instituto com forte ligação à investigação básica desenvolvendo conhecimentos e competências para uma aplicação biomédica translacional, com grande enfase nas neurociências e doenças crónicas. Em suma, a Inovação, Investigação e Desenvolvimento faz parte da missão do departamento.

2.2. Experiência de estágio no ICNAS-P

O auge do Mestrado de Farmácia foi, para mim, o seu segundo ano, em que me foi dada a oportunidade de experienciar a realidade profissional através do estágio curricular em indústria farmacêutica, sob orientação da Prof.ª Dra. Liliana Aranha Caetano (ESTeSL-IPL) e do Prof. Dr. Antero Abrunhosa (ICNAS/UC).

O estágio decorreu no Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde- Produção (ICNAS-P), na área dedicada à produção, a qual é constituída por um Laboratório de Radiofarmácia e Ciclotrão, e uma sala com um equipamento de Ressonância Magnética, no período compreendido entre 11 de janeiro de 2021 a 30 de junho de 2021. O ICNAS-P é uma indústria farmacêutica (35) que apresenta como missão a operação do Ciclotrão sediado no ICNAS, tendo em vista a Produção de radiofármacos com intuito da sua disponibilização, Controlo de Qualidade e disponibilização de Radionuclídeos à comunidade.

Com este estágio de 6 meses, tive o meu primeiro contacto com a realidade empresarial, em que pude pôr em prática as valências adquiridas ao longo da minha formação, assim como ganhar experiência na área da indústria farmacêutica. Fundamentais para ter tirado o máximo partido deste estágio, foram também, a Doutora Ana Almeida, Diretora do Controlo e Qualidade do ICNAS-Produção, bem como todos os colaboradores do ICNAS-Produção, cujo apoio, auxílio e dedicação foram indispensáveis no meu progresso.

As atividades desenvolvidas durante o período de estágio no ICNAS-P desenvolveram-se no âmbito da observação e atuação nas diferentes atividades que decorrem diariamente no ICNAS-P, nomeadamente na produção de radiofármacos para o uso de diagnóstico, na área de controlo e qualidade. As atividades desenvolvidas, e sua realização

no decorrer do período de estágio, encontram-se descritas no *Cronograma de estágio* (Apêndice 1).

O principal foco de estágio foi a validação do método analítico do teste limite do estudo de impurezas dos solventes residuais por cromatografia gasosa para o fármaco ^{11}C-Acetato UC, de modo a evidenciar que o método analítico proposto é adequado e que a metodologia é exata e precisa para os solventes residuais. A validação deste método visa promover e melhorar os métodos de utilização deste radiofármaco em contexto de diagnóstico em doentes com cancro.

Cada vez mais é exigida e reconhecida a necessidade de evidenciar a qualidade dos métodos analíticos, de forma a evitar a presença de possíveis erros (sistemáticos ou aleatórios) e, consequentemente, eventuais alterações significativas do resultado final da análise (36). O objetivo fundamental da validação visa então confirmar que as caraterísticas do método satisfazem as especificações exigidas para os resultados analíticos, bem como estabelecer limites de controlo a aplicar no trabalho de rotina.

Assim, é essencial que o método de validação se encontre descrito num procedimento laboratorial e que a determinação dos parâmetros de validação seja efetuada em equipamentos e instrumentos dentro das especificações, devidamente calibrados, de modo, a que não ocorram complicações aquando da administração do fármaco ao doente para a realização de exames de diagnóstico.

3.1. Radiofármaco ^{11}C-Acetato

O tema e objeto de análise desta investigação foi o radiofármaco acetato marcado com ^{11}C (^{11}C-Ace). Atualmente, existem vários estudos com o acetato marcado com ^{11}C, sendo este um traçador de fluxo de carbono através do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). O ciclo do ácido tricarboxílico, lípidos e síntese de colesterol representam as vias metabólicas para o acetato (37).

O Acetato é um radiofármaco utilizado na PET para diagnóstico de células cancerosas e miocárdio (38). O ^{11}C-acetato também é usado para estudar o metabolismo oxidativo do miocárdio assim como o fluxo sanguíneo do miocárdio (38). É composto por um radionuclídeo ^{11}C, que apresenta um tempo de semivida de cerca de 20,334 min, cujo a sua formula molecular é $CH_3[^{11}C]O_2^-$ (38).

O principal mecanismo de retenção *in vivo* é a conversão do acetato pela acetil-CoA sintetase no citosol e / ou mitocôndria em acetil-CoA. O acetil-CoA é então convertido pela sintetase de ácidos gordos em ácidos gordos e incorporado aos microdomínios da membrana de fosfatidilcolina intracelular ou alternativamente oxidado através do ciclo do ácido tricarboxílico na mitocôndria em dióxido de carbono e água (38).

O ^{11}C-Acetato entra no interior das células por difusão ou transportadores monocarboxilato e facilmente é eliminado na corrente sanguínea (37). Nas células este radiofármaco é facilmente ativado para ^{11}C-acetil-CoA pela enzima acetil-CoA sintetase, tanto no citosol como nas mitocôndrias (37). O ^{11}C-acetil-CoA formado na mitocôndria entra no ciclo do ácido tricarboxílico e o carbono é oxidado para $^{11}C\text{-}CO_2$ com a taxa de fosforilação oxidativa ou então, é transferido e usado para geração anabólica de lípidos ou aminoácidos (37).

O acetil-CoA é incorporado na membrana intracelular nos microdomínios de fosfatidilcolina, importantes para o crescimento tumoral e metastático (37). Deste modo, pode-se afirmar que este radiofármaco é tipicamente incorporado na membrana celular em proporção à taxa de proliferação celular ou, alternativamente, oxidado a dióxido de carbono e água (38).

O radiofármaco ^{11}C-Acetato é atualmente é utilizado para do cancro da próstata e hepatocarcinoma com monografia farmacopeica para produção e controlo de qualidade aprovada (39). Tendo sido desenvolvido um novo método de produção do radiofármaco no ICNAS-P, surgiu a necessidade de validar um novo método analítico, uma vez que os solventes residuais são diferentes dos descritos na farmacopeia Europeia vigente (39).

3.2. Cromatografia gasosa (GC)

A cromatografia é uma técnica qualitativa e quantitativa que apresenta como finalidades a identificação de substâncias e a separação-purificação de misturas, usando propriedades como solubilidade, tamanho e massa (24,27,28).

A cromatografia pode ser de dois tipos consoante a classificação da fase móvel, nomeadamente, cromatografia líquida e gasosa. A cromatografia líquida ocorre quando a fase móvel é um líquido e a estacionaria é um solida, fazendo a separação através da sólida. Na cromatografia gasosa, a fase móvel é um gás e a fase estacionaria é um solido ou liquido (27).

No caso da cromatografia líquida, exemplos de variações típicas na robustez são (24):

- influência das variações de pH em uma fase móvel,
- influência das variações na composição da fase móvel,
- diferentes lotes e / ou fornecedores,
- temperatura.

No caso da cromatografia gasosa, é utilizado um gás de arraste que transporta a amostra através da coluna do cromatógrafo gasoso. No entanto, este gás de transporte pode conter impurezas, como por exemplo a água e o oxigénio. Estas impurezas podem interagir com a fase estacionária e por sua vez dar origem a variações típicas como:

- diferentes fluxos,
- diferentes temperaturas,
- muito ruido de fundo.

Estas variações influenciam a sensibilidade do analisador e diminuem a vida útil da coluna.

3.3. Materiais e equipamentos

Para desenvolvimento do método de validação do radiofármaco ^{11}C-Acetato, utilizaram-se as amostras e reagentes descritos na Tabela 3, e um cromatógrafo de gás Agilent Technologies, modelo Agilent 6850 (GC01) equipado com os componentes descritos na Tabela 4.

Tabela 3-Amostras e reagentes

Nome	Lote	Marca	Abreviaturas
^{11}C-Acetato UC	Acetato210407-01 Acetato210412-01	ICNAS-P	—
Tetrahidrofurano	A0377708	Acros®	THF
Éter dietílico	2872321	Fisher®	—
Acetonitrilo	2167262	Fisher®	ACN

Tabela 4-Componentes do cromatógrafo de gás Agilent Technologies®, modelo Agilent 6850 (GCO1)

Liner[d]	Liner 4 mm com lã de vidro(PN #5183-4647 ou equivalente)
Coluna	RES-SOLV (30m×0,53 mm×1,0 µm; PN# 190095V-420 ou equivalente)
Detector	Detector de ionização de chamas (FID)
Software de aquisição de dados	Software Gina Star®, versão 4.8

3.4. Validação do método analítico GC para o ^{11}C-Acetato

A validação do método analítico deste radiofármaco para o novo método de produção reveste-se da maior importância para garantir a atualização da qualidade do mesmo, salvaguardando desse modo a Saúde Pública (16). Para o efeito, foram desenvolvidos os testes necessários para a validação do método analítico do teste limite de estudos de impurezas, nomeadamente, a especificidade, exatidão, precisão, linearidade, alcance, limite de deteção, limite de quantificação e a robustez.

O método analítico em estudo corresponde à categoria II (secção de validação dos métodos analíticos) e compreende a cromatografia gasosa (GC). As condições de operação do cromatógrafo na validação do método estão descritas abaixo na tabela 5. Os parâmetros que foram avaliados ao longo do trabalho de validação do método estão expressos na Tabela 6. Com esta validação, pretende-se demonstrar que o método analítico GC para controlo do conteúdo de THF e Éter dietílico no radiofármaco ^{11}C-Acetato é adequado para a finalidade pretendida.

[d] Local onde amostra é vaporizada e enviada para a coluna através do gás de arraste

Tabela 5-Condições de operação de cromatógrafo

Forno	
Tempo de equilíbrio	3 min
Temperatura Inicial	30 °C
Tempo Inicial	2 min.
Rampa 1	6,66 ºC/min
Temperatura 1	50ºC
Tempo de espera	0 min
Rampa 2	50 ºC/min
Temperatura 1	100ºC
Tempo de espera	1 min

Injetor	
Modo	*Split*
Temperatura inicial	250 °C
Split	15:1
Fluxo dividido	N/AP
Volume de injeção	0.4µL
Gás transportador	Hélio
Liner	4 mm com lã de vidro (PN #5183-4647 ou equivalente)

Coluna	
Comprimento	30 m
Diâmetro interno	530 µm
Espessura do filme	1,0 µm
Gás de arraste	Hélio
Fluxo	3,0 mL/min

Detetor	
Temperatura	260 °C
Modo	Fluxo constante
Fluxo	30 mL/min (He)
Fluxo de hidrogênio	30 mL/min
Fluxo de ar	300 mL/min

Legenda: N/AP- Não se Aplica;

Tabela 6-Parâmetros de adequação do sistema

Solução	Nº de injeções	Critérios de aceitação
Branco	≥ 1	Nenhuma interferência significativa entre o branco e qualquer um dos picos de interesse.
Solução padrão a 0,72mg/mL THF 5 mg/mL Éter dietílico	1	A área deve estar de acordo com análise anterior.

O presente método analítico foi validado como um método de teste de limite que permite controlar as impurezas (Éter Dietílico e THF) no máximo a que estes podem estar presentes na amostra. Os níveis máximos são permitidos pela ICH (24). O limite definido para Éter dietílico e THF é de 0,1 mg / V, onde V é a dose máxima recomendada em mililitros que para o produto de drogas ^{11}C-Acetato UC é de 10 mL. Portanto, o padrão utilizado para avaliar o nível de solventes no radiofármaco tem uma concentração de 5mg/mL para o éter dietílico e 0,72 mg/mL para THF. Assim, permite a comparação direta entre a amostra em análise com o padrão.

Os resultados obtidos foram comparados aos critérios de aceitação especificados no protocolo de validação e estão resumidos na Tabela 7.

Tabela 7-Parâmetros analíticos e critérios de aceitação

Parâmetro Analítico	Critérios de aceitação	Resultados / Observações
Seletividade	Nenhuma interferência significativa entre o em branco e os picos de interesse	Os picos do THF e do éter dietílico estão resolvidos de todos os outros picos.
LOD	S/N ≥ 3 (THF e éter dietílico)	S/N (THF) = 794 (prep1); 1366 (prep2) S/N (éter dietílico) = 106 (prep1); 149 (prep2)
LOQ	S/N ≥ 10 (THF e éter dietílico)	S/N ($_{\text{média}}$THF) = 1295 (prep1); 1703 (prep2) S/N (média$_{\text{éter dietílico}}$) = 1688 (prep1); 1598 (prep2)
Precisão	% RSD ≤ 15% (THF e éter dietílico)	% RSD (éter dietílico) = 8% % RSD (THF) = 10%
Exatidão	% Recuperação = 100 ± 30 % (3 concentrações diferentes)	80 % - 113 % (éter dietílico) 92 % - 121 % (THF)
Repetibilidade	% RSD ≤ 15 %	10 % (éter dietílico) 11 %(THF)

Legenda: S/N-relação sinal ruído: %RSD- coeficiente de variação;

4.1. Análise dos resultados

A seletividade foi realizada para garantir que o método seja capaz de resolver o pico de éter dietílico e do THF e que não haja interferência significativa entre o branco e o pico de interesse. Este parâmetro foi avaliado ao injetar uma vez cada uma das seguintes soluções:

- um branco;
- solução padrão de referência a 5 mg/mL de éter dietilico e 0,72 mg/mL de THF;
- solução padrão de referência na concentração de limite quantificação (0,2 mg/mL de éter dietilico e 0,05 mg/mL de THF);
- amostra.

A partir dos resultados obtidos, verificou-se que os solventes em estudo estavam resolvidos de qualquer outro pico, e que o branco não apresentava interferência no tempo de retenção dos picos de interesse. Portanto, pode-se concluir que a seletividade atendeu a todos os critérios de aceitação definidos no protocolo de validação e o método analítico é considerado seletivo.

A precisão do método foi avaliada nas concentrações 5 mg/mL para o éter dietílico e 0,72 mg/mL de THF. Consequentemente, a % RSD comprova que o método é preciso. A precisão foi avaliada pela realização de seis injeções consecutivas de solução padrão na concentração limite (5 mg/mL de éter dietílico e 0,72 mg/mL de THF). A % RSD das áreas de pico nas seis injeções foi calculada para demonstrar que o sistema cromatográfico mostra precisão. Os resultados são apresentados na Tabela 8 e 9.

Tabela 8-Resultados de precisão do éter dietílico 5mg/mL

Injeção	Área do éter dietílico
1	786.8
2	883.7
3	945.6
4	773.8
5	810.3
6	925.8
% RSD	8
Critério de aceitação	**% RSD (áreas de pico) ≤ 15%**
Conformidade	**Cumpre**

Legenda: %RSD- coeficiente de variação;

Tabela 9-Resultados de precisão do THF 0,72mg/mL

Injeção	Área do THF
1	262.4
2	288.3
3	268.3
4	219.9
5	239.5
6	287.9
% RSD	10
Critério de aceitação	**% RSD (áreas de pico) ≤ 15%**
Conformidade	**Cumpre**

Legenda: %RSD- coeficiente de variação;

A partir dos resultados obtidos, verifica-se que o % RSD das áreas de pico de Éter dietílico e THF atendeu ao critério de aceitação definido no protocolo de validação, tendo-se comprovado a precisão do método.

O limite de quantificação (LOQ) do procedimento analítico foi avaliado através da menor concentração do analito em uma amostra, com precisão e exatidão adequadas. Assim, este parâmetro foi avaliado através da injeção de três vezes da menor concentração de éter dietílico e de THF utilizado nas retas de calibração (0,2 mg/mL de éter dietílico e 0,05 mg/mL de THF) de duas amostras independentes. Avaliando a razão sinal/ruído e verificando se esta está de acordo com a razão 10:1.

A tabela 10 e 11 representa os resultados das seis injeções da menor concentração do analito que pode ser quantificado na amostra.

Tabela 10-Resultados do limite de quantificação

Injeção da Solução de Éter Dietilico	S/N éter dietilico Prep1	S/N éter dietilico Prep2
1	1731	1404
2	1937	2028
3	1396	1363
Média	1688	1598
Critério de Aceitação	**S/N ≥10**	
Conformidade	**Cumpre**	

Legenda: S/N-relação sinal ruído; Prep1- preparação 1; Prep2- preparação 2;

Tabela 11-Resultados do limite de quantificação

Injeção da Solução de THF	S/N THF Prep1	S/N THF Prep2
1	1320	1442
2	979	1990
3	1587	1677
Média	1295	1703
Critério de Aceitação	**S/N ≥10**	
Conformidade	**Cumpre**	

Legenda: S/N-relação sinal ruído; Prep1- preparação 1; Prep2- preparação 2;

A partir dos resultados obtidos, verifica-se que o S/N das injeções das soluções de éter dietílico e THF atendeu ao critério de aceitação definido no protocolo de validação, S/N≥10 e, portanto, o limite de quantificação do método foi comprovado.

O limite de deteção (LOD) é definido como a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detetado, porém não necessariamente quantificado, sobe as condições experimentais estabelecidas. Isto é, a mais baixa concentração de analito que pode ser detetado de forma confiável e diferente de zero.

Assim, de forma a avaliar este parâmetro fez-se a injeção da menor concentração utilizada nas retas de calibração do éter dietílico e do THF diluída com um fator de diluição 1/3 da mesma concentração em duas amostras independentes. A tabela 12 e 13 representa os resultados das injeções da menor concentração diluída do analito que pode ser quantificado na amostra.

Tabela 12-Resultados do limite de deteção na solução de éter dietílico

Injeção da Solução de Éter dietilico	S/N éter dietilico Prep1	S/N éter dietilico Prep2
1	106	149
Critério de Aceitação	S/N ≥3	
Conformidade	**Cumpre**	

Legenda: S/N-relação sinal ruído; Prep1- preparação 1; Prep2- preparação 2;

Tabela 13-Resultados do limite de deteção na solução de THF

Injeção da Solução de THF	S/N THF Prep1	S/N THF Prep2
1	794	1366
Critério de Aceitação	S/N ≥3	
Conformidade	**Cumpre**	

Legenda: S/N-relação sinal ruído; Prep1- preparação 1; Prep2- preparação 2;

A partir dos resultados obtidos, verifica-se que o S/N das injeções das soluções de Éter dietílico e THF atendeu ao critério de aceitação definido no protocolo de validação. Portanto, o limite de deteção do método foi comprovado.

A exatidão do método para éter dietílico e do THF foi avaliada pela injeção de seis soluções de amostras Acetato 210407-01 e Acetato 210412-01 contaminadas com os solventes em análise (éter dietílico e THF) a três níveis de concentração diferentes.

Além disso, três análises independentes dos lotes Acetato210407-01 e Acetato210412-01, foram injetadas e foi demonstrado que a amostra "*as is*"[e] para determinar a concentração do éter dietílico e THF já presentes na amostra. A Tabela 14 e 15 apresentam os resultados, das amostras "*as is"*. Os resultados para a exatidão do éter dietílico e THF são apresentados na Tabela 16 e 17.

Tabela 14-Resultados das amostras "*as is"* Acetato 210407-01

Injeção	Área éter dietílico	Área do THF
1	3,13	48,02
2	2,18	36,15
3	3,30	53,76
Média	**2,87**	**45,98**

Tabela 15-Resultados das amostras "*as is"* Acetato 210412-01

Injeção	Área éter dietilico	Área do THF
1	0,71	1,84
2	0,51	1,53
3	0,49	0,97
Média	**0,57**	**1,45**

[e] Solução de base sem qualquer contaminação

Tabela 16-Resultados de exatidão para éter dietílico

Prep.	Média Área Amostra *"as is"*	Área de amostras contaminadas de éter dietílico	A (am "*spike*")-A (am "*as is*")	Conc. teórica (mg/mL)	Conc. obtida (1)	% Recuperação (2)	Critérios de aceitação	Conformidade
1		396,6	396,03		2,817	113		**Cumpre**
2	0,57	313,4	312,83	2,5	2,225	89		**Cumpre**
3		282,9	282,33		2,008	80		**Cumpre**
4		738,2	735,33		5,23	104	%	**Cumpre**
5	2,87	577,3	574,38	5,0	4,09	81	Recuperação:	**Cumpre**
6		630,6	627,73		4,47	89	70% - 130%	**Cumpre**
7		715,6	715,06		5,086	85		**Cumpre**
8	0,57	774,9	774,38	6,0	5,508	92		**Cumpre**
9		716,7	715,99		5,093	85		**Cumpre**

Legenda: Prep- preparação; am- amostra; Conc- concentração;

(1) y=140,58x (Reta de calibração do Éter dietílico)

Onde:

y- Diferença das áreas A (am contaminadas do Éter dietílico) -A (am "*as is*")

x-Concentração Obtida

(2) $$\%\,Recovery = \frac{C(obtida)}{C(teórica)}\ x\ 100$$

Tabela 17-Resultados de exatidão para THF

Prep	Média Área Amostra *as is*	Área de amostras contaminada do THF	A(am "spike")-A(am "as is")	Conc teórica (mg/mL)	Conc obtida (3)	% Recuperação (4)	Critérios de aceitação	Conformidade
1		104,98	59,00		0,295	120		**Cumpre**
2	45,98	126,27	80,29		0,302	121	%	**Cumpre**
3		100,91	54,93	0,25	0,275	112	Recuperação:	**Cumpre**
4		143,75	142,3		0,713	99	70% - 130%	**Cumpre**
5	1,45	136,82	135,4		0,678	94		**Cumpre**
6		133,70	132,22	0,8	0,662	92		**Cumpre**
7		257,57	211,6		1,059	112		**Cumpre**
8		224,19	178,2		0,893	94		**Cumpre**
9	45,98	277,78	231,8	0,95	1,161	122		**Cumpre**

Legenda: Prep- preparação; am- amostra; Conc- concentração;

(3) y=199,67x (Reta de calibração do THF)

Onde:

y- Diferença das áreas A (am contaminadas do THF) -A (am "as is")

x-Concentração Obtida

$$^{(4)}\%\ \text{Recovery} = \frac{\text{C(obtida)}}{\text{C(teórica)}}\ \text{x}\ 100$$

Os resultados obtidos demonstram que o método analítico é exato, pois todas as nove amostras independentes analisadas atenderam aos critérios de aceitação definidos.

A repetibilidade para o éter dietílico e THF foi avaliada através de seis injeções consecutivas de uma amostra do produto final contaminadas com os solventes em estudo. Para o estudo de repetibilidade do éter dietílico a amostra Acetato 210407-01 foi contaminada para apresentar este solvente na concentração de 5mg/mL, por sua vez para o estudo de repetibilidade do THF a amostra Acetato210412-01 foi contaminada com este solvente na concentração de 0,72 mg/mL (Tabela 18 e 19).

Tabela 18-Resultados de repetibilidade para a amostra de Acetato 210407-01 contaminado com Éter dietílico na concentração de 5 mg/mL

Preparação de Éter dietílico	Área de amostras Contaminadas
1	738,2
2	577,3
3	630,6
4	602,02
5	549,48
6	569,06
Média	611,11
%RSD	10
Critérios de aceitação	**% RSD ≤ 15%**
Conformidade	**Cumpre**

Legenda: %RSD- coeficiente de variação;

Tabela 19-Resultados de repetibilidade para a amostra de Acetato 210412-01 contaminada com THF na concentração de 0,72 mg/mL

Preparação de THF	Área de amostras Contaminadas
1	257,57
2	224,19
3	277,78
4	221,15
5	215,24
6	205,34
Média	233,55
%RSD	11
Critérios de aceitação	**% RSD ≤ 15%**
Conformidade	**Cumpre**

Legenda: %RSD- coeficiente de variação;

Com base nos resultados apresentados na Tabela 18 e 19, observou-se que o valor % RSD atendeu aos critérios de aceitação, quer para o éter dietílico quer para o THF nas amostras contaminadas, definido no protocolo de validação. Assim, foi demonstrada a repetibilidade do método analítico.

A precisão intermédia é normalmente estudada em fazes mais avançadas do produto pelo que não foi avaliada no âmbito deste relatório.

A estabilidade das soluções não precisa de ser estudada; contudo, implica que sempre que se pretenda avaliar parâmetros do método de validação que se faça soluções novas.

4.2. Discussão dos resultados

A validação do método analítico é uma etapa importante e deve ser um processo rigoroso cumprindo os mais elevados padrões de qualidade (Boas Práticas Laboratoriais e de Fabrico), segurança (se provou ser seguro em termos de toxicidade) e eficácia (demonstração dos resultados que confirma os efeitos para o fim a que se destina), de modo a garantir a proteção da saúde pública (1,2). Deste modo, garante-se o controlo rigoroso dos fármacos, dos quais irão resultar terapêuticas para o tratamento adequado de doentes, contribuindo assim para a melhoria da saúde Pública (1,19).

O radiofármaco ^{11}C-Acetate (Acetato) é promissor para a deteção do cancro da próstata e hepatocarcinoma, utilizando a técnica de PET/CT(37). O ^{11}C-Acetato é usado como um radiotraçador PET para células cancerosas de imagem através da incorporação em microdomínios de membrana de fosfolípidos intracelular em células cancerosas. O ^{11}C-acetato também é usado para estudar o metabolismo oxidativo do miocárdio e o fluxo sanguíneo da região do miocárdio (37).

Desde 1976, que tem vindo a serem desenvolvidos radiofármacos PET com a introdução clínica do ^{18}F-FDG com diferentes finalidades médicas (40). Contudo, poucos dos radiofármacos poderiam ser utilizados no uso clínico de rotina em hospitais. O ^{11}C-Acetato, é um radiofármaco que atualmente se encontra no mercado e que contém farmacopeia Europeia aprovada (39,40). Uma farmacopeia é um compêndio nacional de padrões de qualidade de medicamentos, sendo sempre reconhecida como um resumo oficial (40). Os medicamentos listados nas monografias de farmacopeias são normalmente obrigados a cumprir as disposições relacionadas com os medicamentos a nível nacional, com o objetivo de prevenir a comercialização de medicamentos inconsistentes e reduzir os possíveis riscos para a saúde pública(40).

O ^{11}C-Acetato é um radiofármaco utilizado na PET para diagnóstico de células cancerosas e miocárdio, que já se encontra disponivel no mercado e apresenta monografia aprovada dentro da farmacopeia (39). Contudo, é importante validar métodos que sejam diferentes quer em termos de solventes residuais quer em termos de método utilizado. No

ICNAS surgiu a necessidade de fazer alterações em termos dos solventes residuais (éter dietílico e THF). Assim, foi necessário fazer a sua validação de forma a garantir que o método cumpre os requisitos regulamentares.

A validação é um termo não-específico uma vez que existem diferentes definições na literatura (27). Contudo, corresponde ao desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou implementação de algum método conhecido, envolve processo de avaliação que estime sua eficiência na rotina do laboratório.

Um método é considerado validado se as suas características estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos (27). Portanto, existe diferença entre a execução de experiências que determinam os diversos parâmetros e a validação. Ou seja, a validação deve avaliar a relação entre os resultados experimentais e as questões que o método se propõe a responder.

O objetivo da validação consiste em demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito (41). A validação deve ser considerada quando se constrói/efetua adaptações em metodologias já validadas, ou inclusão de novas técnicas ou ainda o uso de diferentes equipamentos (41).

Na literatura encontram-se diferentes trabalhos que descrevem a validação de métodos analíticos e definem os critérios que devem ser seguidos durante seu desenvolvimento. Estes critérios inserem-se na área biológica, farmacêutica e química. Os diferentes artigos que descrevem a validação de métodos abordam os critérios de validação de acordo com sua área específica, realçando a exatidão, a precisão, os limites de deteção e quantificação e robustez (NOTE FOR GUIDANCE ON VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY (CPMP/ICH/381/95)). A estratégia a ser adotada para a determinação desses parâmetros depende do propósito e da natureza do método. Assim, este trabalho apresenta a definição dos parâmetros requeridos para a validação de métodos analíticos, assim como sugere roteiro para execução desse processo.

A partir dos dados cromatógraficos adquiridos durante a validação, pode ser concluído que os parâmetros estão conformes. Em primeiro lugar, a seletividade foi demonstrada. Uma vez que os picos de éter dietílico e THF estão resolvidos de qualquer outro pico e não foi observada nenhuma interferência entre o branco e o pico de interesse.

De seguida, a precisão também foi demonstrada usando soluções padrão de éter dietílico a 5 mg/mL e THF a 0,72mg/mL tendo sido obtidos %RSD de 8 e 10, respetivamente.

O limite de quantificação também foi demonstrado para soluções padrão de concentração 0,2 mg/mL para o éter dietílico e de 0,05mg/mL para o THF, com valores de S/N superiores a 10. Do mesmo modo, o limite de deteção também foi demonstrado usando soluções padrão de concentração 0,07 mg/mL para o éter dietílico e de 0,017 mg/mL para o THF, com valores de S/N superiores a 3.

A exatidão também foi comprovada pela injeção de seis soluções de amostras Acetato 210407-01 e Acetato 210412-01 contaminadas com os solventes em análise (éter dietílico e THF) a três níveis de concentração diferentes, tendo sido obtidos valores de percentagem de recuperação que variaram entre 80 % e 113 % para o éter dietílico e 92 % e 121 % para o THF.

E, por último, a repetibilidade também foi comprovada através de seis injeções consecutivas de amostra do produto final contaminadas com os solventes em estudo, verificando-se %RSD de 10% para o éter dietílico e 11% para o THF.

4.3. Limitações do estudo

Uma das limitações iniciais desta validação foi a natureza dos solventes para preparação das amostras necesssárias para avaliação dos parâmetros do método de validação. A limitada solubilidade do solvente residual utilizado, o THF, dificultou a preparação das soluções de THF com diferentes solventes, por precipitação do THF, originando grandes oscilações na análise dos dados. Esta limitação foi ultrapassada, após várias análises, com recurso à solubilização em acetonitrilo.

Uma outra limitação importante foi a ocorrência de uma avaria no GC utilizado no estudo dos parâmetros de validação do método do ^{11}C-Acetato, e consequente perda dos cromatogramas obtidos, impossibilitando a sua utilização como suporte aos dados apresentados neste relatório.

4.4. Conclusão

Conclui-se que o método analítico de GC para análise dos solventes residuais no ^{11}C-Acetato foi validado com sucesso e é adequado para o controlo de solventes residuais (éter dietilico e THF) no nível admissívelno produto ^{11}C-Acetato.

Assim, todo este processo de validação de método, realizado de acordo com as diretrizes europeias de qualidade, executado ao longo dos seis meses de estágio foi pertinente para o desenvolvimento do radiofármaco ^{11}C-Acetato de modo a obter um novo método de determinação de solventes residuais. Ao garantir que o radiofármaco ^{11}C-Acetato cumpre com a especificação da monografia, fica assegurada a sua qualidade e distribuição segura e, consequentemente, minimização dos riscos para a saúde pública.

5.1. Competências adquiridas

Com este estágio em indústria farmacêutica tive a oportunidade de participar na validação do método de GC do radiofármaco ^{11}C-Acetato e em algumas atividades diárias de controlo e qualidade desenvolvidas no ICNAS-P, o que me permitiu uma visão real da minha participação no âmbito do Controlo e Qualidade, assim como adquirir novas competências na área de optimização de métodos e produção.

Ao longo do período de estágio tive a oportunidade de por em prática vários conhecimentos teóricos, adquiridos na minha formação, nomeadamente, controlo e qualidade, utilização de farmacopeias, validação de métodos, utilização de técnicas como HPLC, GC, entre outras. Foi-me dada a possibilidade de desempenhar funções no ICNAS-P com liberdade e autonomia, o que me ajudou a crescer a nível profissional e pessoal. Apesar da responsabilidade associada que tive no desempenhar das tarefas, a organização demonstrou confiança nas minhas qualidades e competências, o que me levou a concluir que este percurso académico me propocionou a preparação necessária para enfrentar em breve uma nova realidade como profissional.

Assim sendo, resumo que consegui mobilizar conhecimentos e habilidades múltiplas para responder em tempo útil e de forma global no decorrer das diferentes etapas do estágio. Fui capaz de planear, executar e avaliar todas as fases desenvolvidas no decorrer do estágio. A realização deste relatório, onde descrevo e reflito sobre algumas das atividades desenvolvidas em estágio, foi muito benéfica no meu processo de aquisição de competências especializadas.

Assim, com este estágio tive a oportunidade de adquirir uma perspetiva global sobre a importância e componentes da avaliação de métodos de validação segundo as normas ICH, consolidando conhecimentos e adquirindo competências especializadas na área.

Para além destas competências ao nível académico, este estágio permitiu-me também desenvolver e adquirir competências a nível pessoal, como competências a nível da capacidade de trabalho e integração ativa numa equipa multidisciplinar em indústria farmacêutica, competências ao nível da linguagem técnica e científica e da capacidade de exposição oral e argumentação; e competências comunicacionais.

5.2. Análise e apreciação critica do estágio

A realização deste estágio faz parte do plano de estudos do Mestrado em Farmácia, e ao concluir esta etapa de estudos, permitiu-me um contato mais direto com o mundo empresarial na vertente de Indústria Farmacêutica. No entanto, o estágio não se fez apenas de experiências originadas por mim, sendo a Professora Dra. Liliana Caetano e o Dr. Antero de Abrunhosa e a Dra. Ana Almeida, bem como todos os outros colaboradores do ICNAS muito importantes.

A redação deste relatório permitiu a reflexão sobre as atividades desenvolvidas ao longo deste estágio na área de controlo e qualidade no ICNAS, bem como as competências desenvolvidas ao longo do mesmo. Ao cumprir estes seis meses de duração do estágio no ICNAS-P, retiro desta experiência um balanço inteiramente positivo.

Posso afirmar que o objetivo inicial de adquirir um maior conhecimento sobre o funcionamento da Indústria Farmacêutica foi inteiramente alcançado. Para conseguir atingir este objetivo foi fulcral facto de estar inserida numa empresa com uma organização e qualidade de referência e, mais especificamente, ter pertencido à Unidade de Produção-Unidade de Qualidade que considero ser um departamento essencial para um bom desempenho de toda a estrutura da empresa.

Ao estagiar no ICNAS-P no departamento de Qualidade pude ficar com uma visão mais abrangente, de todos os processos necessários na atividade diária da empresa bem como mais especificamente todas as diferentes etapas necesárias para avaliar um radiofármaco de modo a que este apresente um método de validação aprovado assim como assimilar melhor os conhecimentos que tinha sobre a unidade de gestão de qualidade. A nível pessoal, apesar dos meus receios iniciais, senti-me bastante apoiada no ICNAS durante todo o estágio, encontrando no Dr. Antero de Abrunhosa e na Dra. Ana Almeida, alguém sempre disponível e atento às minhas necessidades.

O facto de ter sido um estágio bem planificado, e orientado, quer em termos de suporte teórico quer pelo excelente auxílio por parte dos colabradores do ICNAS-P tornou este meu percurso enriquecedor e uma formação mais completa, deixando-me melhor preparada para uma entrada futura no mercado de trabalho.

Concluo, com a finalização desta fase com a certeza de que cada vez mais é preciso esforçar-nos para sermos bons profissionais, ajustando-nos sempre às exigências do mercado de trabalho e melhorando constantemente os nossos conhecimentos. E, penso, que dei mais um passo e que me encontro mais perto do objetivo de me tornar um profissional competente e capaz de ser crucial num futuro local de trabalho.

Referências Bibliográficas

1. Atlas da Saúde. Ciclo de Vida dos Medicamentos [Internet]. Available from: https://www.atlasdasaude.pt/publico/content/ciclo-de-vida-dos-medicamentos

2. Uma D, Cl E, Pr B, Pr B. Ciclo de vida de um medicamento. Saiba Mais Sobre [Internet]. 2008;(2):2. Available from: https://www.infarmed.pt/documents/15786/1228470/SaibaMaisSobre2.pdf/f2d5dcac-d7bf-406c-af28-61bed660f3db?version=1.1

3. Pujatti PB. Controlo da Qualidade de Radiofármacos. 2015.

4. RMF V. Preâmbulo. 2007. p. 1–45.

5. Oliveira R, Santos D, Ferreira D, Coelho P, Veiga F, Veiga F. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. Vol. 42, Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2006.

6. Integrado M, Medicina EM. Instituto superior de ciências da saúde egas moniz. 2016;1–7. Available from: https://core.ac.uk/download/pdf/75985146.pdf

7. Saha GB, Saha GB. Characteristics of Specific Radiopharmaceuticals. Fundam Nucl Pharm. 2018;123–62.

8. Mendes P. Síntese, Caracterização e Avaliação Biológica de Compostos Multifuncionais Osteotrópicos [Internet]. 2012. Available from: http://repositorio.ul.pt/handle/10451/9161

9. Oliveira R, Santos D, Ferreira D, Coelho P, Veiga F. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. 2006;42.

10. John L. Humm, Anatoly Rosenfeld ADG. From PET detectors to PET scanners. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2003;30(11):1574–97.

11. Robilotta CC. A tomografia por emissão de pósitrons: uma nova modalidade na medicina nuclear brasileira. 2006;20:134–42.

12. Instituto Vencer o Câncer. Tomografia Computadorizada por Emissão de Pósitrons (PET-TC) [Internet]. Available from: https://vencerocancer.org.br/cancer/diagnostico/tomografia-computadorizada-por-emissao-de-positrons-pet-tc/

13. Luís António Neto Braga, Dra. Marta Costa, da Dra. Leonor Chambel e do PD, Castro R. Relatórios de Estágio, Monografia intitulada “Desenvolvimento de Radiofármacos na Universidade de Coimbra” [Internet]. 2018. Available from: https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/84566/1/PDF final Luís.pdf

14. Araújo E De. A utilização do elemento Tecnéicio-99m no Diagnóstico de Patologias e Disfunção dos seres Vivos [Internet]. Walmorgodoi.Com. 2005. Available from: http://qnesc.sbq.org.br/online/cadernos/06/a08.pdf

15. Pereira JP, Ferreira AI, Figueira AR, Nunes AS, Costa G, Pedroso de Lima JM, et al. Rede Nacional de Especialidade Hospitalar e de Referenciação - Medicina Nuclear. República Port [Internet]. 2016;1–69. Available from: https://www.sns.gov.pt/wp-content/uploads/2016/11/RNEHR_MN_final_12_08_2016.pdf

16. Conceição J, Pita JR, Estanqueiro M, Lobo JS, De Revisão A. As farmacopeias portuguesas e a saúde pública - Portuguese pharmacopoeias and public health. Acta Farm Port. 2014;3(1):47–65.

17. Agostinho RL. Controlo de Matérias-Primas na Indústria Farmacêutica por Espetroscopia de Raman : Qualificação e Desenvolvimento de uma Base de Dados Engenharia Farmacêutica Júri. 2018;

18. Pimenta AM. Controlo de Formulações Farmacêuticas baseado em Sistemas de Exactidão aferida. 2003; Available from: www.isel.pt

19. 2A+ Farma. A importância do Controle de Qualidade de medicamentos na indústria farmacêutica [Internet]. Available from: https://www.doisamaisfarma.com.br/boas-praticas/a-importancia-do-controle-de-qualidade-de-medicamentos-na-industria-farmaceutica/

20. Online Browsing Platform (OBP). ISO 5725-1:1994(en) Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions [Internet]. Available from: https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:24415:-1:ed-1:v1:en

21. Validação de métodos analíticos [Internet]. 2020. Available from: https://xdocs.com.br/doc/validaao-de-metodos-analiticos-280qvjmp5dow

22. Validação de um método analítico. 1377;68–70. Available from: https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/20639/1/Validação de um Método Analítico.pdf

23. Iso. ISO [Internet]. 2011. Available from: http://www.iso.org/iso/home.htm

24. European Medicines Agency. ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Encycl Toxicol Third Ed. 2014;2(November 1994):1070–2.

25. RiteHite. REQUISITOS DE CGMP E VIOLAÇÕES COMUNS | RITE-HITE NORTH AMERICA [Internet]. Available from: https://www.ritehite.com/pt/am/news/2019/blog/cgmp-regulations-and-common-violations

26. Ojeda-flores R, Ortega-lópez N, Ávila-rodríguez MÁ, Alexánderson-rosas E, Nacional I, Ignacio DC. Modelo de evaluación de metabolismo y perfusión en el mio-. 2010;80(4):1–11.

27. BRITO NM, DE AMARANTE JUNIOR OP, POLESE L, RIBEIRO ML. Validação De Métodos Analíticos: Estratégia E Discussão. Pestic Rev Ecotoxicologia e Meio Ambient. 2003;13:129–46.

28. Gillings N, Todde S, Behe M, Decristoforo C, Elsinga P, Ferrari V, et al. EANM guideline on the validation of analytical methods for radiopharmaceuticals. Available from: https://doi.org/10.1186/s41181-019-0086-z

29. Portal Action. VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA [Internet]. Available from: http://www.portalaction.com.br/validacao-de-metodologia-analitica/115-limite-de-deteccao

30. Coimbra U De. ICNAS Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde [Internet]. Available from: https://www.uc.pt/icnas/quem_somos/organizacao

31. Coimbra U De. ICNAS Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde Visão [Internet]. Available from: https://www.uc.pt/icnas/quem_somos/visao

32. Coimbra U De. ICNAS Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde Missão [Internet]. Available from: https://www.uc.pt/icnas/quem_somos/missao

33. Coimbra U. Repositório de Regulamentos Instítuto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde [Internet]. Available from: http://www.uc.pt/icnas%5Cnhttp://www.uc.pt/icnas

34. Coimbra U De. ICNAS Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde Investigação [Internet]. Available from: https://www.uc.pt/icnas/investigacao

35. Coimbra U de. ICNAS Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde [Internet]. Available from: https://www.uc.pt/icnas/ICNAS-P

36. Filipa A, Martins S. Implementação e validação de métodos analíticos. 2016;

37. Autarquia N, Sobre G, De V. INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES Autarquia associada. 2008; Available from: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85131/tde-10122012-101221/publico/2012CarvalhoDesenvolvimento.pdf

38. Acetate C-. C-11 ACETATE C-11 ACETATE. 2012;(July):1–5.

39. European Pharmacopeia 10.0. Dailymed [Internet]. :1225–6. Available from: https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=911312e2-3a7c-4c97-88a8-b8d92cd12923

40. Huang Y-Y. An Overview of PET Radiopharmaceuticals in Clinical Use: Regulatory, Quality and Pharmacopeia Monographs of the United States and Europe. Nucl Med Phys. 2019;

41. Analytica. A Importância da Validação de Métodos Analíticos [Internet]. Available from: https://revistaanalytica.com.br/a-importancia-da-validacao-de-metodos-analiticos/

Apêndice 1 – Cronograma de estágio

Cronograma das atividades de estágio curricular de Mestrado em Farmácia (janeiro a outubro 2021)

Atividade	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	N.º horas aprox.	Material/Logística	Acompanhamento/Supervisão
Apresentação do tema e das instalações e equipamentos	X										7	n.a	Dr. Antero Abrunhosa, colaboradores do ICNAS
Leitura de artigos científicos e/ farmacopeias	X	X	X	X	X	X	X		X		50	Computador e artigos/farmacopeias	Orientadores
Reuniões de preparação e acompanhamento de estágio	X	X	X	X	X	X	X		X	X	20	Computador	Orientadores, Dra. Ana Almeida
Preparação de soluções e testes de solubilidade	X	X	X	X	X	X					14	Material de laboratório e reagentes	Dra. Ana Almeida, colaboradores do ICNAS
Identificação de solventes compatíveis com a amostra	X	X									14	Computador e GC	Dra. Ana Almeida, colaboradores do ICNAS
Início dos estudos dos parâmetros de validação		X									10	GC	Dra. Ana Almeida, colaboradores do ICNAS
Preparação de soluções para seletividade		X									5	Material de laboratório e reagentes	Dra. Ana Almeida, colaboradores do ICNAS
Avaliação da seletividade da amostra		X									10	GC e computador	Dra. Ana Almeida, colaboradores do ICNAS
Preparação de soluções para precisão		X	X								5	Material de laboratório e reagentes	Dra. Ana Almeida, colaboradores do ICNAS
Avaliação do parâmetro de precisão		X	X								10	GC e computador	Dra. Ana Almeida
Preparação de soluções para LOQ			X	X							5	Material de laboratório e reagentes	Dra. Ana Almeida, colaboradores do ICNAS
Avaliação do parâmetro do LOQ			X	X							10	GC e computador	Dra. Ana Almeida, colaboradores do ICNAS
Análise dos dados			X	X							20	Computador	Dra. Ana Almeida
Preparação de soluções para LOD			X	X							5	Material de laboratório e reagentes	Dra. Ana Almeida, colaboradores do ICNAS
Avaliação do parâmetro do LOD			X	X							10	GC e computador	Dra. Ana Almeida, colaboradores do ICNAS
Preparação de soluções para exatidão				X	X						5	Material de laboratório e reagentes	Dra. Ana Almeida, colaboradores do ICNAS
Avaliação do parâmetro de exatidão				X	X						10	GC e computador	Dra. Ana Almeida, colaboradores do ICNAS
Preparação de soluções para repetibilidade					X	X					5	Material de laboratório e reagentes	Dra. Ana Almeida, colaboradores do ICNAS
Avaliação do parâmetro de repetibilidade					X	X					10	GC e computador	Dra. Ana Almeida, colaboradores do ICNAS
Analise dos dados					X	X			X		20	Computador	Dra. Ana Almeida
Análise de discussão de resultados/Redação do relatório de estágio			X	X	X	X	X	X	X	X	350	Computador	Orientadores, Dra. Ana Almeida
Preparação da defesa do estágio										X	50	Computador	Orientadores, Dra. Ana Almeida
Total											**645**		