



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Cátia Sofia Marques Duarte

IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM
PROCESSO DE SÍNTESE DE 6-[¹⁸F]FDOPA
CATALISADO POR COBRE

Dissertação no âmbito do mestrado em Tecnologias do
Medicamento orientada pelo Professor Doutor Antero José Pena
Afonso de Abrunhosa e pelo Professor Doutor João José Martins
Simões Sousa e apresentada Faculdade de Farmácia da
Universidade de Coimbra

Setembro de 2023



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Cátia Sofia Marques Duarte

IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM
PROCESSO DE SÍNTESE DE 6- ^{18}F FDOPA
CATALISADO POR COBRE

Dissertação no âmbito do mestrado em Tecnologias do Medicamento
orientada pelo Professor Doutor Antero José Pena Afonso de
Abrunhosa e pelo Professor Doutor João José Martins Simões Sousa e
apresentada Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2023

“A person who never made a mistake never tried anything new.”

Albert Einstein

**“When everything seems to be going against you, remember that the airplane
takes off against the wind, not with it.”**

Henry Ford

Agradecimentos

Quero começar por agradecer ao Professor Doutor Antero de Abruñosa pela oportunidade de realizar este estágio curricular no ICNAS. Agradeço a toda a equipa do ICNAS pela vossa colaboração, dedicação, apoio e ajuda que contribuiu de forma única para o meu crescimento e aprendizagem.

Aos meus orientadores, é difícil encontrar palavras suficientes para agradecer a vossa orientação durante este percurso. O vosso conhecimento, paciência e incentivo foram cruciais para o meu desenvolvimento académico e pessoal e o vosso apoio foi fundamental para alcançar este objetivo.

À minha família, em especial aos meus pais, não há palavras que possam expressar o quanto vos agradeço. Obrigado por estarem sempre ao meu lado, apoiarem os meus sonhos e aspirações. O vosso amor incondicional e sacrifício são inestimáveis, e eu nunca teria chegado até aqui sem vocês. Mãe e pai, vocês são verdadeiramente os pilares da minha vida.

Ao meu namorado, agradeço por ser a minha âncora, o meu porto seguro. A tua compreensão, carinho e apoio constante foram fundamentais no meu percurso académico. A tua presença torna cada dia mais especial, e sou grata por ter-te ao meu lado.

Às minhas amigas Joana e Rita, obrigado por estarem ao meu lado durante esta jornada. As vossas palavras de encorajamento e o vosso apoio ajudaram-me a não desistir, mesmo nos momentos mais difíceis. A amizade que temos é inestimável, e estou grata por ter-vos na minha vida.

Em resumo, agradeço a todos vocês por fazerem parte da minha vida e por terem contribuído para o meu sucesso. Estou emocionada por ter pessoas tão incríveis na minha vida. Obrigado do fundo do meu coração.

Abstract

Radiopharmacy plays a fundamental role in the development, production, and application of medicines containing radioactive elements, gaining prominence with advances in PET technology and nuclear medicine. Radiopharmaceuticals are medicines that contain radioactive elements and are used for diagnosing and monitoring various pathologies, as they allow functional images of the body's organs and tissues to be obtained, and most of them are administrated intravenously.

6-[¹⁸F]FDOPA is a radiopharmaceutical labeled with the F-18 isotope and plays a significant role in nuclear medicine in the diagnostics, monitoring, and treatment of Parkinson's disease, brain tumors, and neuroendocrine tumors.

Quality control in the pharmaceutical industry refers to procedures and analyses to ensure that pharmaceutical products meet the quality, efficacy, and safety standards established by the regulatory authorities. This process involves rigorous testing at all stages of production, from the raw material to the final product, to ensure that medicines are safe and effective for human use and comply with the requirements established by good manufacturing practices.

The validation of analytical methods is a procedure used to prove that the results obtained are suitable for the specific purpose for which they were designed. This process involves evaluating various parameters, such as selectivity, linearity, detection limit, quantification limit, precision, accuracy, and robustness, using statistical methods to assess the results.

The aim of this study carried out as part of a curricular internship at the Institute of Nuclear Sciences Applied to Health (ICNAS), is to validate the analytical methods for the quality control of copper-catalyzed 6-[¹⁸F]FDOPA in an IBA Synthera® module, with a view to its subsequent implementation.

Keywords: pharmaceutical industry; 6-[¹⁸F]FDOPA; quality control; radiopharmaceutical; analytical method validation

Resumo

A radiofarmácia desempenha um papel fundamental no desenvolvimento, produção e aplicação de medicamentos que contêm elementos radioativos, ganhando destaque com os avanços na tecnologia PET e na medicina nuclear. Os radiofármacos são medicamentos que contêm elementos radioativos e são utilizadas para o diagnóstico e monitorização de diversas patologias, uma vez que permitem a obtenção de imagens funcionais dos órgãos e tecidos do corpo, e são administrados maioritariamente por via intravenosa.

A 6-[¹⁸F]FDOPA é um radiofármaco marcado com o isótopo F-18, que desempenha um papel significativo na medicina nuclear no diagnóstico, monitorização e tratamento da doença de Parkinson, tumores cerebrais e neuroendócrinos.

No contexto da indústria farmacêutica, o controlo de qualidade refere-se ao conjunto de procedimentos e análises realizados para garantir que os produtos farmacêuticos cumpram os padrões de qualidade, eficácia e segurança estabelecidos pelas autoridades reguladoras. Esse processo envolve testes rigorosos em todas as etapas da produção, desde a matéria-prima até ao produto final, para assegurar que os medicamentos são seguros e eficazes para uso humano e cumprem com os requisitos das boas práticas de fabrico.

A validação de métodos analíticos é um procedimento usado para comprovar que os resultados obtidos são adequados para o propósito específico a que se destinam. Este processo envolve a avaliação de diversos parâmetros, como seletividade, linearidade, limite de deteção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez, com recurso a métodos estatísticos para avaliar os resultados.

O objetivo do presente estudo, desenvolvido no âmbito do estágio curricular realizado no Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde (ICNAS), consiste na validação dos métodos analíticos do controlo de qualidade da 6-[¹⁸F]FDOPA catalisada por cobre num módulo Synthera® da IBA, com vista à sua subsequente implementação.

Palavras-Chave: indústria farmacêutica; 6-[¹⁸F]FDOPA; controlo de qualidade; radiofármaco; validação de método analítico

Lista de abreviaturas e acrónimos

ACN – Acetonitrilo

DMA – Dimetilacetamida

DP - Doença de Parkinson

EtOH – Etanol

FDA ou USFDA - United States Food and Drug Administration

FDG – F-18 fluorodesoxiglicose

FID – Detetor de ionização por Chama

GC – Cromatografia Gasosa

GMP – Boas Práticas de Fabrico

GQ - Garantia da Qualidade Farmacêutica

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

ICH – Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano

ICNAS – Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde

I&D – Investigação e Desenvolvimento

LOD – Limite de Deteção

LOQ – Limite de Quantificação

MIP – Projeção de Intensidade Máxima

PET – Tomografia de Emissão de Positrões

QC - Controlo de Qualidade

RCY – Baixo Rendimento Radioquímico

RM – Ressonância Magnética

SnCl – Cloreto de Estanho

S/N – Sinal Ruído

TAC – Tomografia Axial Computorizada

TC – Tomografia Computadorizada

TFA – Ácido Trifluoroacético

TLC – Cromatografia em Camada Fina

UC – Universidade de Coimbra

USP – Farmacopeia dos Estados Unidos

UV – Ultravioleta

UV-VIS – Ultravioleta visível

Índice

Agradecimentos	iv
Abstract	v
Resumo	vi
Lista de abreviaturas e acrónimos	vii
Índice de Figuras	xii
Lista de Tabelas	xiv
1. Introdução	1
1.1. O Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde	1
1.2. PET	3
1.3. Radiofarmácia	4
1.3.2. Síntese automatizada de 6-[¹⁸F]FDOPA	8
2. Controlo de Qualidade	9
2.1. Princípios da Qualidade	9
2.2. Validação de métodos e critérios	12
2.2.1. Seletividade	15
2.2.2. Linearidade	15
2.2.3. Limite de Quantificação	15
2.2.4. Limite de Detecção	16
2.2.5. Precisão	16
2.2.6. Exatidão	17
2.2.7. Robustez	18
2.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	19
2.4. Cromatografia Gasosa	21
3. Objetivo desta Tese	23
4. Materiais e Métodos	24

4.1.	Validação do método HPLC	24
4.1.1.	Padrões, amostras e reagentes	27
4.1.2.	Equipamento	27
4.1.3.	Condições Operacionais	28
4.2.	Validação do método GC	28
4.2.1.	Padrões, amostras e reagentes	30
4.2.2.	Equipamento	31
4.2.3.	Condições Operacionais	31
5.	Resultados e Discussão	33
5.1.	Resultados de HPLC com o detetor UV-VIS	33
5.1.1.	Seletividade	35
5.1.2.	Limite de Detecção	37
5.1.2.1.	Cloreto de Estanho	37
5.1.2.2.	Levodopa	37
5.1.2.3.	6-Hidroxdopa	38
5.1.2.4.	6-Fluoro-L-DOPA	39
5.1.3.	Limite de Quantificação	40
5.1.3.1.	Cloreto de Estanho	40
5.1.3.2.	Levodopa	41
5.1.3.3.	6-Hidroxdopa	42
5.1.3.4.	6-Fluoro-L-DOPA	42
5.1.4.	Linearidade	43
5.1.4.1.	Cloreto de Estanho	43
5.1.4.2.	Levodopa	44
5.1.4.3.	6-Hidroxdopa	46
5.1.4.4.	6-Fluoro-L-DOPA	47

5.1.5.	Precisão	48
5.2.	Resultados de HPLC com o detetor de atividade.....	49
5.2.1.	LOQ.....	49
5.2.2.	Lineariedade.....	Erro! Marcador não definido.
5.2.3.	Repetibilidade	51
5.2.4.	Exatidão	52
5.3.	Resultados do GC	53
5.3.1.	Seletividade / Especificidade.....	53
5.3.4.	Linearidade	57
5.3.5.	Precisão	60
5.3.6.	Exatidão.....	62
6.	Conclusões.....	64
7.	Bibliografia.....	65

Índice de Figuras

Figura 1: Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde (ICNAS)	1
Figura 2: Equipamento utilizado para a realização da PET.....	4
Figura 3: Centro PET: fluxograma	6
Figura 4: 6-[¹⁸ F]FDOPA.....	7
Figura 5: Diagrama do fluxo de HPLC.....	20
Figura 6: Esquema de um cromatógrafo de gás básico.....	22
Figura 7: Cromatograma do resultado do método nucleofílico com fluxo de 1 mL/mL.....	32
Figura 8: Cromatograma da injeção de 0,15 mg/ml de SnCl.....	33
Figura 9: Cromatograma da injeção de 0,01 mg/ml de 6-hydroxydopa.....	33
Figura 10: Cromatograma do resultado do método eletrofílico com fluxo de 1 mL/mL.....	33
Figura 11: Branco.....	34
Figura 12: Solução Referência de SnCl (0,05 mg/ml)	34
Figura 13: Solução Referência de Levodopa (0,02 mg/ml)	35
Figura 14: Solução Referência de 6-Hydroxydopa (0,0025 mg/ml)	35
Figura 15: Solução Referência de 6-Fluoro-L-DOPA (0,0115 mg/ml)	35
Figura 16: Amostra de F-DOPA.....	35
Figura 17: Cromatograma LOD para SnCl.....	36
Figura 18: Cromatograma LOD para Levodopa.....	37
Figura 19: Cromatograma LOD para 6-hidroxidopa.....	38
Figura 20: Cromatograma LOD para 6-Fluoro-L-DOPA.....	39
Figura 21: Cromatograma LOQ para SnCl.....	40
Figura 22: Cromatograma LOQ para Levodopa.....	40
Figura 23: Cromatograma LOQ para 6-Hidroxidopa.....	41
Figura 24: Cromatograma LOQ para 6-Fluoro-L-DOPA.....	42
Figura 25: Gráfico de linearidade do Cloreto de estanho.....	43
Figura 26: Gráfico da linearidade da Levodopa.....	44
Figura 27: Gráfico da linearidade da 6-Hidroxidopa.....	45
Figura 28: Gráfico de linearidade da 6-Fluoro-L-DOPA.....	46
Figura 29: Gráfico de linearidade da F-DOPA.....	50
Figura 30: Cromatograma do Branco.....	52
Figura 31: Cromatograma de referência do EtOH 5000 ppm.....	53

Figure 32: Cromatograma de referência do ACN 410 ppm.....	53
Figura 33: Cromatograma de referência do DMA 1090 ppm.....	53
Figura 34: Regressão linear para EtOH desde LOQ (50 ppm) até 6000 ppm.....	57
Figura 35: Regressão linear para ACN desde LOQ (50 ppm) até 492 ppm.....	58
Figure 36: Regressão linear para DMA desde LOQ (50 ppm) até 1308 ppm.....	59

Lista de Tabelas

Tabela 1: Propriedades físicas dos radionuclídeos mais importantes no diagnóstico médico nuclear.....	5
Tabela 2: Componentes necessários para a validação de um ensaio.....	14
Tabela 3: Estratégias para demonstrar a exatidão de acordo com as normas propostas pelo ICH.....	18
Tabela 4: Parâmetros analíticos e critérios de aceitação no detetor de UV-Vis.....	24
Tabela 5: Parâmetros analíticos e critérios de aceitação no detetor de Atividade.....	25
Tabela 6: Lista de materiais.....	26
Tabela 7: Componentes do cromatógrafo líquido de alta eficiência, Agilent Technologies, modelo Agilent 1260 Infinity II (HPLC3)	27
Tabela 8: Condições de operação do método.....	27
Tabela 9: Parâmetros analíticos e critérios de aceitação	28
Tabela 10: Lista de materiais.....	30
Tabela 11: Componentes do cromatógrafo de gás Agilent Technologies, modelo Agilent 6850 (GC01)	30
Tabela 12: Condições de operação do método.....	31
Tabela 13: Gradiente de concentração	32
Tabela 14: Resultados LOD para SnCl.....	36
Tabela 15: Resultados LOD para Levodopa.....	37
Tabela 16: Resultados LOD de 6-hidroxdopa.....	37
Tabela 17: Resultados LOD de 6-Fluoro-L-DOPA.....	38
Tabela 18: Resultados LOQ do SnCl.....	39
Tabela 19: Resultados LOQ da Levodopa.....	40
Tabela 20: Resultados LOQ de 6-Hydroxydopa.....	41
Tabela 21: Resultados LOQ de 6-Fluoro-L-DOPA.....	42
Tabela 22: Resultados da linearidade de SnCl.....	43
Tabela 23: Resultados da linearidade da Levodopa.....	44
Tabela 24: Resultados da linearidade de 6-Hidroxdopa.....	45
Tabela 25: Resultados da linearidade de 6-Fluoro-L-DOPA.....	46
Tabela 26: Resultados da precisão.....	47
Tabela 27: Lista de soluções.....	48

Tabela 28: Resultados LOQ de F-DOPA.....	48
Tabela 29: Resultados da linearidade de F-DOPA.....	49
Tabela 30: Resultados da precisão de F-DOPA.....	51
Tabela 31: Resultados de LOD de EtOH.....	54
Tabela 32: Resultados de LOD de ACN.....	54
Tabela 33: Resultados de LOD de DMA.....	54
Tabela 34: Resultados de LOQ de EtOH.....	55
Tabela 35: Resultados de LOQ de ACN.....	55
Tabela 36: Resultados de LOQ de DMA.....	56
Tabela 37: Resultados de linearidade EtOH.....	56
Tabela 38: Resultados de linearidade ACN.....	57
Tabela 39: Resultados de linearidade DMA.....	58
Tabela 40: Resultados de repetibilidade para EtOH.....	60
Tabela 41: Resultados de repetibilidade para ACN.....	60
Tabela 42: Resultados de repetibilidade para DMA.....	61
Tabela 43: Resultados de exatidão para o Etanol.....	61
Tabela 44: Resultados de exatidão para o ACN.....	62
Tabela 45: Resultados de exatidão para o DMA.....	62

I. Introdução

I.1. O Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde (ICNAS)

O ICNAS Pharma é uma Unidade Orgânica de investigação com carácter multidisciplinar, inaugurada em 2009, que pertence à Universidade de Coimbra, e situa-se no Polo III – Ciências da Saúde (Figura 1). É responsável pela produção de uma grande variedade de radiofármacos marcados com emissores de positrões de curta duração e detém todas as licenças necessárias para o fabrico de produtos farmacêuticos GMP (Boas Práticas de Fabrico) (1,2).



Figura 1 - Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde (ICNAS).

O ICNAS é dirigido pelo Professor Doutor Antero de Abruñhosa, tem como vice-diretora a Professora Maria João Vidigal, e como vice-diretor de investigação o Professor Investigador Miguel Castelo-Branco (3).

É um instituto especializado na investigação, desenvolvimento, produção, controlo de qualidade de radionuclídeos e radiofármacos e colabora com uma rede ampla de parceiros nacionais e internacionais nas áreas da imagem médica e investigação translacional (1,4). Como principal produtor nacional de radiofármacos, este distribui os produtos radiofarmacêuticos a nível nacional, fornecendo para a grande maioria dos hospitais e centros de imagem nacionais equipados com tomógrafos para a realização de exames PET (2,4). Além disso, o ICNAS Pharma produz radiofármacos para uso interno, estudos pré-clínicos e clínicos, e também desenvolve seus próprios produtos de investigação e desenvolvimento (I&D). (1).

Para produzir radiofármacos, o ICNAS Pharma está equipado com dois ciclotrões IBA, 2 laboratórios de produção GMP classe C totalmente equipados, 5 hotcell, 11 módulos de

síntese, um braço robótico para distribuição automática de radiofármacos, bem como um laboratório de Controlo de Qualidade totalmente equipado.

O ICNAS, as Faculdades de Ciências e Tecnologia, de Medicina e de Farmácia da Universidade de Coimbra, apresentam os seguintes objetivos fundamentais (5):

- 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 na área das aplicações biomédicas das radiações;
- c. Promover a interdisciplinaridade, explorando as articulações possíveis entre as áreas científicas envolvidas na sua atividade;
- d. Desenvolver, tanto a nível nacional como internacional, a cooperação entre as entidades de investigação, educação e prestação de cuidados de saúde nas áreas científicas a que se dedica;

Como já foi descrito anteriormente o instituto tem um carácter multidisciplinar, pelo que abrange diversas áreas da imagem médica, destacando-se no desenvolvimento de aplicações biomédicas. O ICNAS é pioneiro em: (1,4):

- Aquisição e análise de dados de Medicina Molecular
- Desenvolvimento de novos biomarcadores (radiofármacos) para imagem médica
- Investigação com técnicas de imagem multimodais
- Estudos avançados de imagem pré-clínica e clínica
- Investigação Biomédica translacional

O ICNAS, assim como empreendimentos de sucesso, possui uma visão e missão claramente estabelecidas. No que diz respeito à sua visão, ambiciona conquistar uma posição de destaque tanto a nível nacional quanto internacional no avanço do desenvolvimento de radiofármacos para aplicação em imagem médica, com foco especializado nas áreas da Oncologia, Cardiologia e Neurociências (4). Relativamente à sua missão, é um instituto com forte ligação à investigação básica desenvolvendo conhecimentos e competências para uma aplicação biomédica translacional, com grande ênfase nas neurociências e doenças crónicas (1). Em suma, a Inovação, Investigação e Desenvolvimento está intrinsecamente inserida na missão do departamento.

1.2. PET

A Tomografia por Emissão de Positrões, também conhecido por PET, é uma técnica de imagem de medicina nuclear, caracterizada pela sua natureza inócua, não invasiva e indolor, ou seja, não apresenta riscos significativos para a saúde do doente, garantindo sua segurança durante o procedimento. Utiliza moléculas que incluem um componente radioativo (radionuclídeo), denominados radiomarcadores ou radiofármacos que identificam a atividade molecular e as alterações a nível celular de maneira a detetar doenças nas fases iniciais através da avaliação da função dos órgãos e tecidos do corpo (6,7,8). Ao contrário da PET, a Ressonância Magnética (RM) e a Tomografia Axial Computorizada (TAC) fornecem uma informação mais estática concentrando-se nas características estruturais (7,8).



Figura 2 – Equipamento utilizado para a realização da PET

Os exames de Tomografia por Emissão de Positrões possibilitam a obtenção de imagens tridimensionais que revelam a distribuição das moléculas marcadas no corpo humano. Além disso, a maioria dos equipamentos da PET é combinada com um sistema de Tomografia Computadorizada (TC), também conhecida como TAC, o que permite correlacionar a informação funcional com a sua localização anatômica (8).

As moléculas marcadas atuam como sinais fluorescentes, e quando o doente é posicionado em um detetor de radiação, as regiões mais ativas do organismo aparecem como pontos luminosos, fornecendo assim informações sobre a atividade metabólica e fisiológica do corpo (8).

Os radiomarcadores são moléculas que possuem uma pequena quantidade de material radioativo ligado ou "marcado" a elas. Essas moléculas acumulam-se em tumores ou regiões inflamadas, além de poderem ligar-se a proteínas específicas do organismo. Um dos radiomarcadores mais comuns é o F-18 fluorodesoxiglicose (FDG), que é uma molécula análoga à glucose. As células cancerosas, devido à sua maior atividade metabólica, podem absorver a glucose a uma taxa mais elevada, o que é evidenciado nos exames de PET. Essa característica possibilita ao médico detectar a doença em estágios iniciais, antes que ela seja visível em outros exames de imagem. Vale ressaltar que o FDG é apenas um dos diversos radiomarcadores utilizados atualmente ou em fase de desenvolvimento para fins diagnósticos e terapêuticos (8).

Os médicos recorrem à medicina nuclear para diagnosticar, avaliar e tratar várias doenças. Estas incluem cancro, doenças cardíacas, doenças gastrointestinais, endócrinas ou neurológicas e outras doenças (7).

1.3. Radiofarmácia

A radiofarmácia é um ramo da ciência farmacêutica que está envolvido no desenvolvimento, produção, análise e aplicação de medicamentos que contêm elementos radioativos. A radiofarmácia tem vindo a adquirir uma importância significativa à medida que a tecnologia PET tem evoluído e com os progressos da medicina nuclear e da terapia oncológica por radiações. Os recentes avanços na tecnologia PET, especialmente quando combinados com a tomografia computadorizada (PET/CT), aumentaram o uso da PET como método diagnóstico no campo da oncologia. Esse desenvolvimento requer cada vez mais a síntese de produtos radiofarmacêuticos, que servem como base adicional para o desenvolvimento dos métodos PET. (9).

No desenvolvimento farmacêutico e na medicina moderna, a radioatividade tem um impacto crescente no domínio das aplicações de diagnóstico (*in vitro* e *in vivo*), bem como nas aplicações terapêuticas (10). Os radiofármacos são medicamentos que consistem ou contêm substâncias radioativas capazes de emitir radiação ionizante de forma espontânea e destinam-se a ser utilizados com base nessas propriedades, tanto para fins de diagnóstico como terapêuticos (9).

Os nuclídeos radioativos são frequentemente ligados a moléculas orgânicas que têm uma farmacocinética que facilita a absorção num órgão específico. Os nuclídeos radioativos

são selecionados de acordo com as suas características físicas. Os nuclídeos com propriedades adequadas, como o decaimento radioativo e a semi-vida, para a medição da radiação externa são utilizados em procedimentos de diagnóstico (radiação gama ou positrões), enquanto os emissores de partículas beta com uma gama baixo alcance e alta eficiência são aplicados na terapia (9). A seleção do radionuclídeo depende do alvo a nível celular e do alcance efetivo da emissão de partículas (10). Os radionuclídeos utilizados na PET diferem não só nas suas características físicas, como o decaimento radioativo e a semi-vida (9). Alguns exemplos são apresentados na Tabela I.

Tabela I - Propriedades físicas dos radionuclídeos mais importantes no diagnóstico médico nuclear

Nuclídeo	Modo de Decaimento	Energia - γ	Semi-vida
Tc-99m	γ	140	6 h
In-111	γ	250	72 h
I-123	γ	160	13 h
F-18	β^+	511	110 min
C-11	β^+	511	20 min
N-13	β^+	511	10 min
O-15	β^+	511	2 min

Além de satisfazer as exigências bioquímicas, um produto farmacêutico PET também deve cumprir requisitos radioquímicos específicos. Devido à sua semi-vida curta, os nuclídeos PET devem ser produzidos no local de utilização e exigem métodos de síntese rápidos. Isso assegura a pureza radioquímica elevada do medicamento, uma vez que a forte emissão de radiação dos nuclídeos terapêuticos muitas vezes causa uma rápida degradação dos compostos orgânicos devido aos efeitos de radiólise, limitando os tempos de armazenamento ou transporte mais longos (9,10).

Um centro PET completo é constituído por um ciclotrão, laboratórios radioquímicos e radiofarmacêuticos, além de um scanner PET (Figura 3). Essa junção requer uma colaboração especialmente intensa entre médicos, cientistas, analistas, farmacêuticos e engenheiros (9).

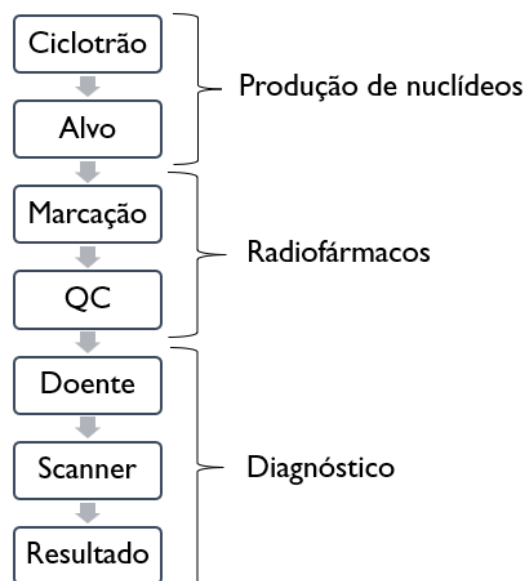


Figura 3 - Centro PET: fluxograma

Um fator fundamental para um radionuclídeo clinicamente eficaz é a sua atividade específica, ou seja, a medida da radioatividade por quantidade de massa de um radionuclídeo, que é medida em GBq/ μ g. A atividade específica é particularmente relevante para radiofármacos que são captados por recetores saturáveis (10).

Devido à elevada atividade inicial (acima de 100 GBq de F-18), à exposição da radiação e à necessidade de um processo de síntese rápido (de forma a minimizar o decaimento), realizar a síntese manualmente é praticamente inviável. Nos últimos anos, várias empresas desenvolveram módulos de síntese com orientação computacional (9,10) para a produção de marcadores PET, permitindo a execução totalmente automatizada de todas as etapas do processo. Assim, o desenvolvimento de radiofármacos PET é uma colaboração entre químicos orgânicos, radioquímicos, radiofarmacêuticos, físicos e engenheiros (10). Os módulos são normalmente instalados em células quentes hermeticamente fechadas, protegidas com 75 mm de chumbo (9,10). A seguir, serão apresentados os princípios fundamentais da radiomarcção, juntamente com exemplos específicos de radiofármacos de interesse clínico (10).

O desenvolvimento de radiofármacos para a PET envolve essencialmente cinco etapas principais (10):

1. Síntese de precursores radiomarcados adequados
2. Síntese de precursores orgânicos prontos para a marcação radioativa

3. Desenvolvimento de métodos e procedimentos de radiomarcção e purificação
4. Desenvolvimento de módulos de síntese automatizados
5. Conceção de procedimentos de controlo da qualidade aplicáveis aos produtos radiofarmacêuticos PET

Para além do cumprimento das normas de segurança radiológica, é necessário cumprir os critérios das GMP durante a produção de medicamentos, nomeadamente os descritos nas guidelines para o fabrico de produtos farmacêuticos estéreis. Só é possível cumprir estes dois requisitos com instalações de alta tecnologia e uma equipa altamente qualificada (9).

1.3.1.6-[¹⁸F]FDOPA

A 6-[¹⁸F]fluoro-L-dopa ([¹⁸F]FDOPA) é um radiofármaco marcado com F-18, com uma semi-vida de 109,8 min para a obtenção de imagens PET do sistema dopaminérgico no cérebro humano e do transportador de aminoácidos do tipo L em diversas doenças, incluindo a doença de Parkinson (DP), tumores cerebrais e neuroendócrinos (11,12).

A 6-[¹⁸F]FDOPA é um radiomarcador com relevância clínica significativa, abrangendo não só a neurologia, mas também em oncologia, onde pode ser utilizado para a imagiologia, por tomografia por emissão de positrões (PET) (11,13). O primeiro estudo PET com [¹⁸F]FDOPA no cérebro humano foi relatado em 1983 e, desde então, tem sido utilizada para imagiologia relacionada com a doença de Parkinson, tumores cerebrais e hiperinsulinismo focal da infância (11). O processo de síntese é muito complexo e, embora existam algumas implementações comerciais, apenas alguns centros têm capacidade de produzi-lo, o que dificulta o acesso dos doentes a este radiofármaco de grande importância (13).

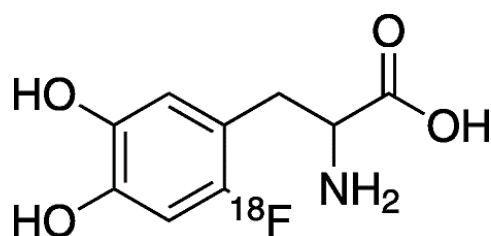


Figura 4. 6-[¹⁸F]FDOPA

Em 2019, devido à sua notável especificidade e sensibilidade no diagnóstico da doença de Parkinson (DP), a [¹⁸F]FDOPA foi aprovada pela United States Food and Drug Administration (FDA ou USFDA) como um agente de diagnóstico PET. Essa aprovação permite que seja usada para visualizar os terminais nervosos em adultos suspeitos de síndromes de Parkinson. Além disso, a [¹⁸F]FDOPA PET tem sido utilizada como um biomarcador, permitindo avaliar a integridade e funcionalidade dos terminais nervosos dopaminérgicos, sendo útil para estratificar doentes e avaliar a resposta aos tratamentos. Com os avanços na medicina regenerativa no tratamento da DP, a [¹⁸F]FDOPA PET tem o potencial de ser um biomarcador de imagem útil para monitorizar a eficácia dos tratamentos regenerativos, uma vez que se baseia na regeneração da função pré-sináptica dopaminérgica, que envolve a absorção de DOPA e a síntese de dopamina no cérebro (12).

Apesar dos progressos alcançados em várias áreas da imagiologia PET, a utilização de [¹⁸F]FDOPA tem estado limitada, em parte devido à sua radiosíntese (12).

1.3.2. Síntese automatizada de 6-[¹⁸F]FDOPA

Durante muitos anos, o único método automatizado disponível comercialmente para a síntese da 6-[¹⁸F]FDOPA foi a síntese eletrofílica. Considerando as desvantagens desse método, como o baixo rendimento radioquímico (RCY) e o baixa atividade específica devido à utilização de gás [¹⁸F]F₂ adicionado ao transportador, houve vários esforços para desenvolver um processo de síntese nucleofílica automatizada (13).

Atualmente, existem várias opções de módulos automatizados para a síntese radioquímica. No caso da produção da 6-FDOPA, é utilizado um módulo automatizado Trasis®. Esse processo é complexo, envolvendo diversas etapas e levando cerca de 90 minutos para ser concluído, com rendimentos radioquímicos de aproximadamente 35%. Além disso, também são utilizados os módulos Synthera® da IBA, que estão sendo aprimorados com um novo método de síntese catalisado por cobre (14).

O AllinOne, um sintetizador radioquímico universal desenvolvido pela Trasis, é uma plataforma completa que atende às necessidades de ambientes de pesquisa e produção. Este sistema inclui recursos como HPLC/UV semipreparativo e capacidades de reformulação, tornando-se uma ferramenta valiosa para superar os desafios nos processos de radioquímica. Através da integração de aplicativos, obtêm-se rendimentos consistentes e elevados, enquanto são minimizados os períodos de inatividade (15).

O AllinOne é altamente versátil, abrangendo uma ampla gama de funcionalidades: suporta mais de 40 marcadores diferentes, permite a utilização de até 4 colunas de HPLC e possui a capacidade de trabalhar com até 15 detetores de radiação. Graças à sua tecnologia plug-and-play, o AllinOne é adaptável a diversos marcadores (15).

O módulo Synthera® oferece uma solução eficiente e económica para a produção de marcadores. A configuração pode ser adaptada às necessidades de produção, permitindo a expansão que acompanha a procura. Este módulo permite a realização de até 12 sínteses de diferentes marcadores em uma única célula quente, devido ao uso de uma ejeção automática de cassete patenteada e ao carregador IFP (14).

O Synthera® é um equipamento totalmente automatizado utilizado na produção e purificação de compostos radioativos para aplicações de diagnóstico por imagem (PET e SPECT) e terapias, principalmente em oncologia, neurologia e cardiologia. Uma das suas vantagens é a ausência de exposição à radiação, o que permite a utilização de até três sintetizadores numa hotcell, além de apresentar um módulo de radioquímica económico (14).

2. Controlo de Qualidade

2.1. Princípios da Qualidade

Diariamente, uma variedade considerável de atividades socioeconômicas dão origem a inúmeras medidas analíticas, que são implementadas em diversos laboratórios por todo o mundo (16). Essas medidas analíticas aplicadas são reconhecidas como suporte de muitas decisões fundamentais que estão na base das sociedades modernas. Elas são utilizadas, por exemplo, na avaliação da qualidade da água destinada ao consumo, como suporte de decisões de saúde, segurança alimentar e proteção ambiental (16,17).

Para assegurar a preparação confiável e consistente de medicamentos de alta qualidade, é fundamental ter um sistema de Garantia da Qualidade Farmacêutica (GQ) bem elaborado e corretamente implementado. Esse sistema deve incluir um procedimento sistemático de gestão de riscos, conforme definido nas diretrizes do ICH (Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano). A GQ engloba todas as medidas organizacionais coordenadas com o objetivo de garantir que os medicamentos têm a qualidade necessária para o fim a que se destinam (18).

Na indústria farmacêutica, a qualidade analítica detém um papel importante para obter sucesso dos programas de desenvolvimento, como a produção e o controlo de qualidade de medicamentos (16,17). Na produção, desenvolvimento e monitorização da síntese de novas moléculas, os resultados analíticos desempenham um papel crucial, pois estes dão suporte na investigação de novas formulações, determinam prazos de validade através de estudos de estabilidade e também são responsáveis por avaliar se os materiais estão de acordo com as normas de qualidade estabelecidas (16,17).

Através da análise de resultados é possível distinguir entre um produto de qualidade satisfatória de um outro de qualidade inferior, passível de rejeição. É com base nos resultados analíticos que se distingue um produto bom ou aceitável de um outro de qualidade inferior ou rejeitável. Tem de se ter cuidados e evitar aceitar ou rejeitar um produto com base numa análise incorreta, o que poderia originar, em casos extremos, um diagnóstico ou tratamento errado. Resultados ambíguos ou pouco confiáveis implicam esforços adicionais na repetição das análises, culminando em custos e atrasos mais substanciais no processo de produção de um medicamento (16).

Com o intuito de tomar decisões acertadas, seguras e evitar as consequências de escolhas inadequadas, há uma necessidade crescente, não só legislativa, de assegurar a qualidade dos resultados analíticos, através da criação de protocolos detalhados dos procedimentos. (16).

Normalmente, os laboratórios provam a qualidade dos seus resultados analíticos ao evidenciar que estes cumprem os padrões de precisão e exatidão definidos para o fim a que se destinam. Para alcançar esse objetivo, há uma série de práticas de qualidade detalhadamente descritas na literatura, bem como em protocolos, normas e diretrizes dedicadas à garantia de qualidade (16,17).

Cada laboratório responsável pelos ensaios de controlo da qualidade deve estabelecer e seguir protocolos por escrito para a realização de cada ensaio e para documentar os resultados obtidos. É imprescindível manter registos detalhados de todos os ensaios realizados, de maneira a garantir a conformidade com os padrões e especificações estabelecidos (18).

Os métodos analíticos laboratoriais devem ser adequados à utilização a que se destinam e ser suficientemente sensíveis, específicos, exatos e reproduzíveis. É fundamental que todas as soluções preparadas sejam devidamente rotuladas, indicando claramente a sua identidade e composição (18).

As medidas de controlo de qualidade estabelecidas compreendem um conjunto de práticas quase independentes, criadas e implementadas por químicos analíticos para lidar com situações específicas. São exemplos dessas práticas a utilização de métodos validados, a análise de materiais de referência certificados, a indicação da incerteza e a rastreabilidade dos resultados (16,17).

Com o objetivo de evitar a repetição de esforços para atingir a qualidade, surgiu a necessidade de criar um programa de garantia de qualidade bem estruturado, que estabeleça com clareza, quais as abordagens a serem adotadas em cada situação particular. Habitualmente, as práticas integradas num programa de garantia de qualidade devem incluir (16,17):

- Pessoal qualificado, competente e devidamente treinado para executar as análises.
- Equipamentos e materiais calibrados.
- Estabelecimento do propósito dos resultados analíticos.
- Utilização de métodos validados.
- Utilizar materiais de referência.
- Quantificação da incerteza e rastreabilidade dos resultados.
- Acreditação e certificação.

Com o intuito de estabelecer uma harmonização, foram recentemente identificados seis princípios fundamentais de qualidade para a prática analítica. Esses princípios surgiram para promover as boas práticas de medida analítica, e são apresentados a seguir (16,17):

1. As medidas analíticas devem cumprir um objetivo definido;
2. As medidas analíticas devem ser realizadas utilizando métodos e equipamentos validados de maneira a garantir que são adequados para o fim a que se destinam;
3. O pessoal responsável pelas análises deve possuir qualificações e competências adequadas.
4. Deve ser feita, regularmente, uma avaliação independente do desempenho técnico de um laboratório.
5. As análises realizadas em diferentes locais devem ser consistentes entre si.
6. As organizações que realizam medidas analíticas devem estabelecer procedimentos claros de controlo e garantia de qualidade.

Em suma, as atividades analíticas desempenham um papel crucial na tomada de decisões e regulamentação das sociedades modernas. Essa importância é ainda mais acentuada na indústria farmacêutica, onde a qualidade analítica é essencial para o sucesso de programas abrangendo desenvolvimento, produção e controle de qualidade de medicamentos. Para assegurar a integridade e confiabilidade dos resultados analíticos, a adoção de práticas de garantia de qualidade é imperativa, com um consenso internacional delineando guidelines específicas. A aplicação desses princípios fundamentais reforça a credibilidade das medidas analíticas, minimiza riscos e contribui para a excelência em todas as áreas da análise (16).

2.2. Validação de métodos e critérios

A validação do método é um processo fundamental na confirmação e documentação da confiabilidade de procedimentos de forma a demonstrar que os resultados obtidos numa medida analítica são adequados (16,19). No contexto analítico, a validação de um método é realizada por meio de estudos laboratoriais para assegurar que as características de desempenho do método atendem aos requisitos da aplicação analítica pretendida (19).

A validação é essencial para qualquer método novo ou modificado, a fim de garantir que ele seja capaz de produzir resultados reprodutíveis e confiáveis, independentemente de diferentes operadores utilizarem o mesmo equipamento em laboratórios distintos ou no mesmo laboratório. O tipo de programa de validação necessário depende das características específicas do método e das suas aplicações propostas. Os resultados da validação de métodos possibilitam uma maneira de avaliar a qualidade, confiabilidade e consistência dos resultados analíticos, tornando-se parte integrante das boas práticas analíticas, contribuindo para a garantia de qualidade dos processos e dados obtidos (19).

Para o processo de validação do método, é fundamental utilizar equipamentos que estejam dentro das especificações, funcionem corretamente e sejam adequadamente calibrados (18,19). Os métodos analíticos precisam ser validados ou revalidados em diferentes situações: antes da sua implementação em uso de rotina, sempre que ocorrerem alterações nas condições para as quais o método foi validado e sempre que o método sofrer modificações (19).

Na indústria farmacêutica, a validação de métodos adquiriu relevância e tornou-se oficial com a incorporação da secção sobre a validação de métodos nos regulamentos de cGMP. A USP também publicou diretrizes para validação de métodos, tornando obrigatório a

utilização de métodos documentados e validados para registrar e autorizar a comercialização de novos medicamentos. O consenso global sobre a validação de métodos analíticos utilizados na indústria farmacêutica surgiu após a publicação das diretrizes da ICH (16).

As diretrizes da ICH apresentam definições para várias características e metodologias de validação. Essas diretrizes estabelecem uma base geralmente aceita para a validação de métodos analíticos. No entanto, elas também destacam que abordagens diferentes das estabelecidas podem ser aplicáveis e aceitáveis. (20).

Os procedimentos utilizados para avaliar os produtos farmacêuticos asseguram a sua identidade, potência e pureza atendendo aos requisitos legais estabelecidos. (16,17). O processo de validação é aplicado a todos os procedimentos analíticos envolvidos na produção de medicamentos. Isso inclui os métodos usados para analisar diversos materiais, desde matérias-primas, produtos intermediários, excipientes e substâncias ativas até aos produtos formulados.

Na perspectiva da validação, todos os procedimentos analíticos têm uma importância igual, ou seja, todos devem ser validados, quer sejam utilizados para o controlo em processo, para a aceitação ou rejeição de lotes, ou de produtos acabados, quer para ensaios de estabilidade (16).

As categorias de ensaio mais comuns são classificadas pela USP, como detalhado na tabela 2.1. (16,17):

1) Categoria I – Envolve métodos analíticos utilizados para quantificar substâncias ativas presentes na matéria-prima, ou nos produtos farmacêuticos formulados.

2) Categoria II – Abrange métodos analíticos para determinar impurezas, ou produtos de degradação, na matéria-prima ou nos produtos farmacêuticos formulados. São incluídos nestes métodos os testes quantitativos e de limite de impurezas. Embora ambos visem refletir com precisão as características de pureza da amostra, os testes quantitativos requerem validação mais rigorosa.

3) Categoria III – Engloba métodos analíticos destinados a avaliar as características específicas de desempenho, como ensaios de dissolução e de libertação do fármaco. Estes métodos devem ser seletivos e sensíveis, uma vez que precisam determinar pequenas quantidades de analito, mesmo na presença de excipientes, impurezas e compostos de degradação.

4) Categoria IV – Relaciona-se com testes de identificação, os quais confirmam a identidade de um analito numa amostra. Esses testes frequentemente envolvem comparações

apropriadas, como espectros, comportamento cromatográfico e reatividade química, entre uma propriedade da amostra e a mesma propriedade de um padrão de referência.

Tabela 2 – Componentes necessários para a validação de um ensaio

Caraterísticas Analíticas	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Testes Limites		
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Limite de Detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de Quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não

* Pode ser um requisito necessário, dependendo da natureza do teste

Entretanto, quando propostos novos métodos ou revisões de métodos existentes, é imperativo fornecer dados de laboratório que comprovem sua validação (17). Os parâmetros típicos recomendados por órgãos reguladores, como a FDA e a USP são considerados na validação de métodos analíticos (19). Esses parâmetros são os seguintes:

- Identificação do analito;
- Especificidade / Seletividade
- Linearidade e Intervalo;
- Limite de Detecção (LOD)
- Limite de Quantificação (LOQ)
- Precisão
- Exatidão
- Robustez

Em suma, o objetivo da validação de um procedimento analítico é demonstrar que esse procedimento é adequado para a finalidade pretendida, ou seja, garantir que os resultados obtidos por meio do método sejam precisos, reprodutíveis e confiáveis (21).

2.2.1. Seletividade

A seletividade de um método analítico é a sua capacidade de avaliar inequivocamente a substância a analisar na presença de outros componentes esperados. Essa característica também pode ser definida como a capacidade do método para medir com precisão a substância a analisar na presença de interferências, como precursores sintéticos, excipientes, impurezas, enantiômeros e produtos de degradação conhecidos (ou prováveis), que são esperados de estar presentes na matriz da amostra (19,21,22).

2.2.2. Linearidade

A linearidade de um procedimento analítico diz respeito à sua capacidade, dentro de um intervalo específico, de obter resultados de ensaios que são diretamente proporcionais à concentração da substância a analisar na amostra. Deve ser avaliada uma relação linear em toda a gama do procedimento analítico (17). Para verificar a linearidade, é demonstrada diretamente na substância a diluição de uma solução-padrão dos componentes do medicamento, utilizando o procedimento proposto. A linearidade é geralmente expressa como o limite de confiança em torno do declive da linha de regressão obtida. Para estabelecer a linearidade, as diretrizes da ICH recomendam o uso de um mínimo de cinco concentrações. Já a gama de um método analítico é o intervalo entre os níveis superiores e inferiores que foram comprovadamente determinados com precisão, exatidão e linearidade, empregando o método em questão (19).

Os resultados dos testes devem ser avaliados por métodos estatísticos apropriados como o cálculo de uma linha de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. (21)

2.2.3. Limite de Quantificação (LOQ)

O limite de quantificação de um procedimento analítico individual refere-se à concentração mais baixa de analito presente numa amostra que pode ser determinada com

precisão e exatidão adequadas (16,19,22). É um parâmetro utilizado para a determinação quantitativa de compostos de baixas concentrações numa amostra, principalmente para a determinação de impurezas e/ou produtos de degradação (22). Em métodos analíticos, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), que apresentam um ruído de base, o LOQ é geralmente obtido com base na relação Sinal-Ruído (S/N) (10:1) e é posteriormente confirmado pela injeção de padrões que resultam na mesma relação S/N e exibem uma percentagem aceitável de desvio padrão relativo (19,22).

2.2.4. Limite de Detecção (LOD)

O limite de detecção de um procedimento analítico individual corresponde à concentração mais baixa de analito presente numa amostra que pode ser detetada, embora não seja necessariamente quantificada como um valor exato nas condições experimentais estabelecidas (16,19,22). Nos procedimentos analíticos que apresentam ruído de base, o LOD pode ser determinado com base numa relação sinal/ruído (S/N) (3:1), que é normalmente expressa como a concentração da substância a analisar na amostra. O cálculo do rácio sinal/ruído é efetuado pela relação $s = H/h$, onde H representa a altura do pico correspondente ao componente em análise, e h é o valor absoluto da maior flutuação de ruído a partir da linha de base do cromatograma de uma solução em branco (19,21).

2.2.5. Precisão

A precisão de um procedimento analítico é uma medida que expressa o grau de concordância ou dispersão entre uma série de medições obtidas a partir de múltiplas amostragens de uma mesma amostra homogênea, nas condições estabelecidas (19,21).

Existem três níveis diferentes nas quais a precisão pode ser avaliada, como a repetibilidade, a precisão intermediária e a reprodutibilidade. Além disso, ela pode ser definida como o grau de concordância entre os resultados de ensaios individuais através da aplicação do método repetidamente em várias amostras da mesma substância homogênea (16,19).

A avaliação da precisão de um procedimento analítico é normalmente expressa por meio do desvio-padrão ou do desvio-padrão relativo de uma série de medições. A precisão pode abranger a reprodutibilidade ou a repetibilidade do procedimento analítico sob condições normais (19,21). A precisão intermediária (também conhecida como robustez)

aborda as variações entre laboratórios, em diferentes dias, ou com diferentes analistas ou equipamentos dentro do mesmo laboratório. A determinação da precisão de um procedimento analítico requer a realização de um número suficiente de análises em amostras homogêneas, de forma a obter estimativas estatisticamente válidas do desvio-padrão ou do desvio-padrão relativo (19).

A repetibilidade pode ser avaliada de maneira simples através de seis medições repetidas, utilizando uma quantidade representativa de radioatividade. É importante considerar a semi-vida do radionuclídeo usado, bem como o limite de quantificação e a gama linear do radiodetector na determinação do número de repetições viáveis. Em casos de radionuclídeos de vida curta, a correção do decaimento pode ser necessária, e, portanto, a radioatividade medida deve ser recalculada para o tempo inicial t_0 , utilizando a equação do decaimento (20):

$$A_0 = A / e^{-\lambda t}$$

Onde:

A_0 = atividade no tempo 0

A = atividade no tempo t

t = tempo de atraso em minutos

λ = constante de decaimento ($\ln 2/t_{1/2}$)

2.2.6. Exatidão

A exatidão de um procedimento analítico refere-se à proximidade entre os resultados obtidos pelo método e os resultados considerados verdadeiros (16,19).

A avaliação deste parâmetro de validação é uma das tarefas mais complexas de executar, devido à dificuldade em estabelecer um resultado verdadeiro. Na literatura, são consideradas quatro estratégias para avaliar a exatidão de um método de análise de uma substância de concentração conhecida: como a comparação dos resultados com um método de referência, os estudos de recuperação em amostras brancas, o estudo de recuperação através do método de adição padrão e análise de materiais de concentração conhecida (16).

Tabela 3 – Estratégias para demonstrar a exatidão de acordo com as normas propostas pelo ICH

Princípio ativo	Utilização do procedimento analítico em um material de referência. Comparação dos resultados com um segundo procedimento bem estabelecido.
Produto formulado	Aplicação do procedimento analítico a misturas sintéticas de componentes do produto formulado. Fortificação do produto formulado com o analito alvo. Comparação dos resultados com um segundo procedimento bem estabelecido.
Impurezas	Fortificação do princípio ativo ou do produto formulado com impurezas. Comparação dos resultados com um segundo procedimento bem estabelecido.

Para determinar a exatidão, o método é aplicado a amostras às quais são adicionadas quantidades conhecidas da substância a ser analisada. Essas amostras devem ser analisadas juntamente com soluções-padrão e soluções em branco para garantir a ausência de interferências. A exatidão é então calculada a partir dos resultados do teste, frequentemente, a exatidão pode ser expressa como a recuperação do analito, ou seja, a percentagem das quantidades conhecidas do analito que foram recuperadas pelo ensaio (16,19).

A avaliação da exatidão requer um mínimo de nove determinações, distribuídas por pelo menos três níveis de concentração, abrangendo o intervalo especificado pelo método analítico (três concentrações, cada uma repetida três vezes) (21).

2.2.7. Robustez

A robustez é definida como a medida da capacidade de um método analítico se manter estável e produzir resultados consistentes mesmo quando sujeito a variações pequenas, mas deliberadas dos parâmetros do método (como pH, composição da fase móvel, temperatura e definições instrumentais) (16,19).

A determinação da robustez é um procedimento sistemático que envolve a variação controlada de um parâmetro específico e a medição do seu efeito sobre o método, através da

monitorização do desempenho do sistema e/ou da análise de amostras (19). Os ensaios de robustez devem mostrar a fiabilidade de um procedimento analítico em relação a variações deliberadas dos parâmetros (21).

2.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é uma técnica analítica utilizada para identificar, separar e quantificar os componentes da solução como o fármaco, as impurezas e os produtos de degradação relacionados com o fármaco que podem ser gerados na síntese ou no armazenamento (23, 24, 25). Esta técnica é amplamente utilizada em laboratórios químicos, farmacêuticos, alimentícios, entre outros (24).

A análise de fármacos em formas de dosagem multicomponentes é frequentemente realizada através do método HPLC, devido às suas vantagens como, a rapidez, especificidade, exatidão, precisão e a facilidade de automatização. O desenvolvimento e validação de métodos de HPLC desempenham um papel crucial na nova descoberta, desenvolvimento, fabrico de medicamentos e vários outros estudos relacionados com seres humanos e animais (23).

Para a realização da técnica de HPLC é necessário encontrar uma fase móvel, uma coluna, uma temperatura, um comprimento de onda e um gradiente adequados que asseguram a compatibilidade e estabilidade adequadas do fármaco, bem como dos produtos de degradação e das impurezas (23).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é derivada da cromatografia clássica em coluna e é, atualmente, uma das ferramentas mais importantes da química analítica (25). Neste método, uma solução da amostra é injetada em uma coluna contendo material poroso (fase estacionária), enquanto um líquido (fase móvel) é bombeado sob alta pressão e flui através da coluna a uma taxa de fluxo constante (23, 25, 26). A separação dos componentes ocorre com base na afinidade dos mesmos com a fase estacionária e móvel. Consequentemente, a eluição dos componentes ocorre em tempos diferentes, de acordo com seu comportamento de partição. Componentes com maior afinidade pela fase estacionária permanecem retidos na coluna por mais tempo, enquanto aqueles com menor afinidade são eluídos de forma mais rápida (25,26).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é mais versátil do que a cromatografia gasosa, uma vez que não se limita a amostras voláteis e termicamente estáveis e a escolha de fases móveis e estacionárias é mais ampla (23). A Figura 5 apresenta um diagrama esquemático do sistema de HPLC.

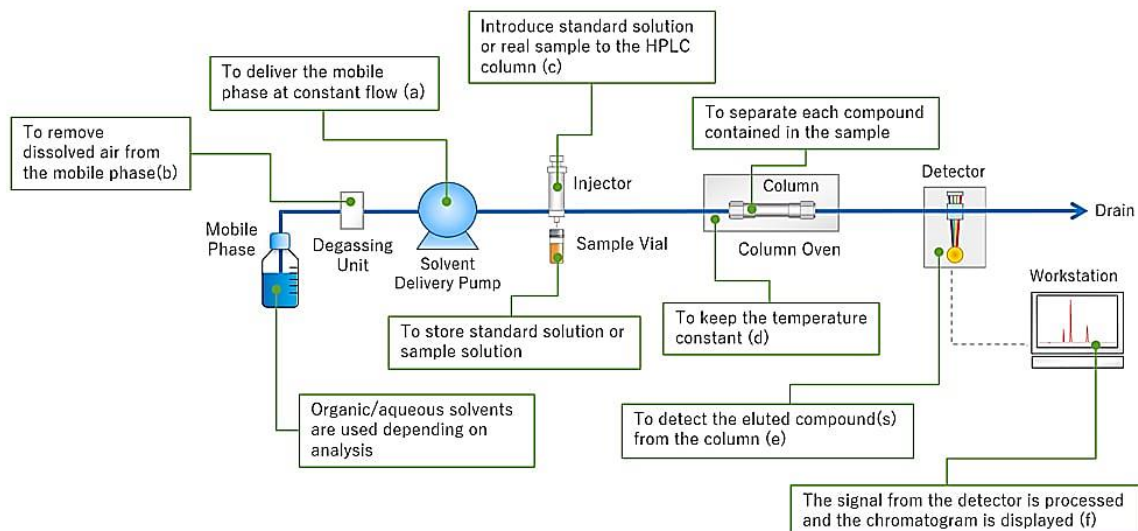


Figura 5: Diagrama do fluxo de HPLC

A HPLC caracteriza-se pelas seguintes características (23):

- Alta resolução.
- Colunas de pequeno diâmetro (4,6 mm), de aço inoxidável, de vidro ou de titânio.
- Enchimento da coluna com partículas muito pequenas (3, 5 e 10 μ m).
- Pressões de entrada relativamente elevadas e fluxo controlado da fase móvel.
- Detetores de fluxo contínuo capazes de detetar quantidades muito pequenas.
- Análise rápida

A classificação da HPLC pode ser efetuada da seguinte forma (25):

- HPLC preparativa e HPLC analítica (com base na escala de operação)
- Cromatografia de afinidade, cromatografia de adsorção, cromatografia de exclusão de tamanho, cromatografia de permuta iónica, cromatografia de fase quiral (com base no princípio de separação)
- Separação por gradiente e separação isocrática, (com base na técnica de eluição)
- Cromatografia de fase normal e cromatografia de fase inversa (com base nos modos de funcionamento).

A validação do método de HPLC, de acordo com as guidelines da ICH, fornece informações sobre as características como a exatidão, a especificidade, a linearidade, o limite de deteção e o limite de quantificação (25).

Em suma, o HPLC é o método analítico mais preciso, amplamente utilizado para a análise quantitativa e qualitativa de medicamentos tendo como objetivo quantificar separadamente o fármaco ativo principal, as impurezas de reação, todos os intermédios sintéticos disponíveis e produtos de degradação que possam existir.

2.4. Cromatografia Gasosa (GC)

A cromatografia gasosa (GC) é a técnica analítica, única e versátil utilizada para a separação direta, a quantificação de amostras gasosas (gases e vapores de componentes muito voláteis), soluções líquidas e sólidos ou compostos voláteis, e a identificação do produto através da observação dos picos no cromatograma (27,28,29).

O princípio fundamental da cromatografia gasosa reside no fato de que quanto maior for a afinidade do composto com a fase estacionária, maior será a retenção do mesmo na coluna, sendo necessário mais tempo para que seja eluído e detetado (27).

O equipamento é composto por uma coluna cromatográfica (onde ocorre a separação dos componentes), um tubo com um adsorvente permeável, no qual um fluxo de gás inerte, como hélio, hidrogênio ou nitrogênio, é utilizado como fase móvel para empurrar a amostra a ser separada através da coluna, um meio de introdução da amostra e um meio de detecção dos componentes à medida que são eluídos da extremidade da coluna (27,29). Uma vez que a temperatura influencia a volatilidade das substâncias a analisar, a coluna é colocada numa estufa com controlo termostático (27).

A velocidade da zona de vapor que se move ao longo da coluna depende do fluxo do gás portador e da medida em que o vapor é adsorvido. Quando dois ou mais componentes estão presentes na amostra, cada um comporta-se normalmente independentemente dos outros e pode ser separado com base nas suas diferentes velocidades de progresso através da coluna. O adsorvente utilizado pode ser um substrato químico como o carbono, alumina ou gel de sílica, mas em mais de 90% das aplicações, é um líquido mantido no lugar por um suporte sólido inerte (29).

Ao contrário da maioria dos outros métodos cromatográficos, a cromatografia gasosa não envolve a interação direta da fase móvel com as moléculas da substância analisada, em vez disso, a fase móvel apenas transporta a substância através da coluna (27). A figura 6 apresenta de forma esquemática um cromatógrafo de gás básico.

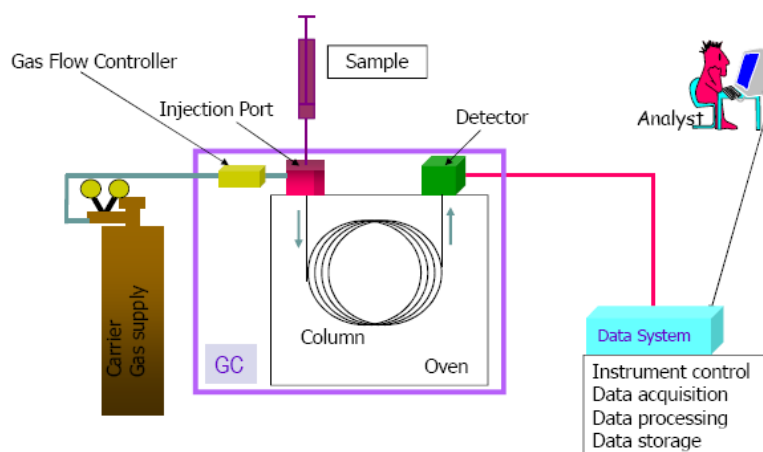


Figura 6: Esquema de um cromatógrafo de gás básico

Vários gases inertes, como hidrogênio, hélio e nitrogênio, podem ser utilizados como gás portador ou fase móvel na cromatografia gasosa (27,29). Cada gás portador tem as suas vantagens e os sistemas para os quais é mais adequado.

A coluna é o componente inicial e central de um cromatógrafo, posicionada dentro de um forno, onde a temperatura exerce uma influência significativa na eficiência da separação cromatográfica, constituindo assim, um fator essencial no controlo do GC. Em muitos casos, a temperatura isotérmica não é o modo de temperatura mais eficaz para a separação de amostras, sendo então utilizado um programa de temperatura. A maioria dos programas de temperatura do GC envolve uma temperatura inicial, uma rampa (aumento de graus por minuto) e uma temperatura fina (27).

A introdução da amostra no sistema GC é um passo crítico na separação. A reprodutibilidade da quantidade de amostra injetada é importante para garantir a consistência dos resultados. A amostra pode ser injetada manualmente (seringa) no sistema ou através de um sistema de amostragem automática (injetor automático) (27,29). Uma técnica de injeção inadequada é uma das principais fontes de erros do GC.

Existe uma variedade de detetores que podem ser utilizados no GC, cada um com as suas próprias limitações e vantagens. O detetor mais utilizado é o Detetor de ionização por Chama (FID). O FID é normalmente utilizado para compostos orgânicos e é aplicado na análise de controlo de qualidade de compostos farmacêuticos (27).

O requisito fundamental para que as amostras sejam analisadas por cromatografia gasosa é que os compostos de interesse na amostra volatilizam sem se decomporem termicamente (28).

3. Objetivo desta Tese

A 6-[18F]FDOPA é um radiofármaco marcado com o isótopo F-18 que desempenha um papel crucial no diagnóstico e monitorização de tumores cerebrais e neuroendócrinos, bem como, na doença de Parkinson.

As múltiplas aplicações clínicas deste radiofármaco estimularam um forte interesse no desenvolvimento de novos e melhorados de métodos síntese.

O Synthera® é um equipamento totalmente automatizado utilizado na produção e purificação de compostos radioativos para aplicações de diagnóstico por Imagem.

Para que este método de síntese promissor pudesse ser usado era necessário desenvolver métodos analíticos que permitissem realizar o controlo de qualidade do produto de forma a garantir que cumpria os padrões de qualidade necessários.

Os métodos analíticos devem ser adequados ao propósito a que destinam, o que requer a execução da validação dos mesmos, avaliando parâmetros como a exatidão, precisão, seletividade/especificidade, linearidade, limites de deteção e quantificação.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho é desenvolver e executar a validação de um método de HPLC, para determinação da pureza química e radioquímica, e de um método de GC, para determinação dos solventes residuais, da 6-[18F]FDOPA obtida pelo método nucleofílico usando o módulo Synthera®.

Para cada um destes métodos serão testados os parâmetros seletividade/especificidade, limites de deteção e quantificação, linearidade, precisão e exatidão. A avaliação destes parâmetros será realizada para diversos analitos cuja deteção e quantificação é necessária e os resultados obtidos serão avaliados de acordo com os requisitos pré-estabelecidos.

O estágio foi realizado no ICNAS Pharma na área responsável pela produção de radiofármacos, onde se encontra o Laboratório de radiofarmácia e o Ciclotrão.

4. Materiais e Métodos

4.1. Validação do método HPLC

A validação do método analítico deste radiofármaco para o novo método de produção é de extrema importância para assegurar a qualidade do mesmo e, por conseguinte, garantir a proteção da Saúde Pública (17). Com este propósito, foram realizados testes necessários para validar o método analítico, incluindo o estudo do limite de impurezas, que abrange critérios como especificidade, exatidão, precisão, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (30,31).

O método analítico em análise pertence à categoria II (secção de validação dos métodos analíticos) e envolve a utilização de cromatografia de alta eficiência. Através desta validação, pretende-se evidenciar que o método analítico HPLC utilizado para controlar a pureza química e radioquímica no radiofármaco 6-[¹⁸F]FDOPA é apropriado para o fim a que se destina.

Na tabela 4 são apresentados os parâmetros analíticos que vão ser validados e os respetivos critérios de aceitação.

Tabela 4: Parâmetros analíticos e critérios de aceitação no detetor de UV-Vis

Detetor UV-Vis																
Parâmetros analíticos	Testes	Critérios de aceitação														
Seletividade / Especificidade	<table border="1"><thead><tr><th>Amostra</th><th>N. de injeções</th></tr></thead><tbody><tr><td>Branco</td><td>1</td></tr><tr><td>Padrão SnCl</td><td>1</td></tr><tr><td>Padrão Levodopa</td><td>1</td></tr><tr><td>Padrão Hidroxidopa</td><td>1</td></tr><tr><td>Padrão 6-Fluoro-L-DOPA</td><td>1</td></tr><tr><td>Amostra</td><td>1</td></tr></tbody></table>	Amostra	N. de injeções	Branco	1	Padrão SnCl	1	Padrão Levodopa	1	Padrão Hidroxidopa	1	Padrão 6-Fluoro-L-DOPA	1	Amostra	1	Nenhuma interferência significativa entre o branco e os picos de interesse.
	Amostra	N. de injeções														
	Branco	1														
	Padrão SnCl	1														
	Padrão Levodopa	1														
	Padrão Hidroxidopa	1														
	Padrão 6-Fluoro-L-DOPA	1														
	Amostra	1														
Nota: Este parâmetro pode ser avaliado através da análise dos cromatogramas obtidos durante a avaliação dos restantes parâmetros analíticos.																

Detetor UV-Vis												
Parâmetros analíticos	Testes	Critérios de aceitação										
LOD	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Amostra</th> <th>N. de injeções</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Padrão SnCl (0,0025mg/mL)</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>Padrão Levodopa (0,0025mg/mL)</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>Padrão Hidroxidopa (0,0005mg/mL)</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>Padrão 6-Fluoro-L-DOPA (0,001mg/mL)</td> <td>3</td> </tr> </tbody> </table>	Amostra	N. de injeções	Padrão SnCl (0,0025mg/mL)	3	Padrão Levodopa (0,0025mg/mL)	3	Padrão Hidroxidopa (0,0005mg/mL)	3	Padrão 6-Fluoro-L-DOPA (0,001mg/mL)	3	S/N ≥ 3
	Amostra	N. de injeções										
	Padrão SnCl (0,0025mg/mL)	3										
	Padrão Levodopa (0,0025mg/mL)	3										
	Padrão Hidroxidopa (0,0005mg/mL)	3										
Padrão 6-Fluoro-L-DOPA (0,001mg/mL)	3											
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Amostra</th> <th>N. de injeções</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Padrão SnCl (0,005mg/mL)</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>Padrão Levodopa (0,005mg/mL)</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>Padrão Hidroxidopa (0,001mg/mL)</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>Padrão 6-Fluoro-L-DOPA (0,002mg/mL)</td> <td>3</td> </tr> </tbody> </table>	Amostra	N. de injeções	Padrão SnCl (0,005mg/mL)	3	Padrão Levodopa (0,005mg/mL)	3	Padrão Hidroxidopa (0,001mg/mL)	3	Padrão 6-Fluoro-L-DOPA (0,002mg/mL)	3	S/N ≥ 10	
Amostra	N. de injeções											
Padrão SnCl (0,005mg/mL)	3											
Padrão Levodopa (0,005mg/mL)	3											
Padrão Hidroxidopa (0,001mg/mL)	3											
Padrão 6-Fluoro-L-DOPA (0,002mg/mL)	3											
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Amostra</th> <th>N. de injeções</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Padrão SnCl (5 concentrações)</td> <td>1 (de cada concentração)</td> </tr> <tr> <td>Padrão Levodopa (5 concentrações)</td> <td>1 (de cada concentração)</td> </tr> <tr> <td>Padrão Hidroxidopa (5 concentrações)</td> <td>1 (de cada concentração)</td> </tr> <tr> <td>Padrão 6-Fluoro-L-DOPA (5 concentrações)</td> <td>1 (de cada concentração)</td> </tr> </tbody> </table>	Amostra	N. de injeções	Padrão SnCl (5 concentrações)	1 (de cada concentração)	Padrão Levodopa (5 concentrações)	1 (de cada concentração)	Padrão Hidroxidopa (5 concentrações)	1 (de cada concentração)	Padrão 6-Fluoro-L-DOPA (5 concentrações)	1 (de cada concentração)	r² ≥ 0.99	
Amostra	N. de injeções											
Padrão SnCl (5 concentrações)	1 (de cada concentração)											
Padrão Levodopa (5 concentrações)	1 (de cada concentração)											
Padrão Hidroxidopa (5 concentrações)	1 (de cada concentração)											
Padrão 6-Fluoro-L-DOPA (5 concentrações)	1 (de cada concentração)											
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Amostra</th> <th>N. de injeções</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Padrão SnCl (5 concentrações)</td> <td>1 (de cada concentração)</td> </tr> <tr> <td>Padrão Levodopa (5 concentrações)</td> <td>1 (de cada concentração)</td> </tr> <tr> <td>Padrão Hidroxidopa (5 concentrações)</td> <td>1 (de cada concentração)</td> </tr> <tr> <td>Padrão 6-Fluoro-L-DOPA (5 concentrações)</td> <td>1 (de cada concentração)</td> </tr> </tbody> </table>	Amostra	N. de injeções	Padrão SnCl (5 concentrações)	1 (de cada concentração)	Padrão Levodopa (5 concentrações)	1 (de cada concentração)	Padrão Hidroxidopa (5 concentrações)	1 (de cada concentração)	Padrão 6-Fluoro-L-DOPA (5 concentrações)	1 (de cada concentração)	r² ≥ 0.99	
Amostra	N. de injeções											
Padrão SnCl (5 concentrações)	1 (de cada concentração)											
Padrão Levodopa (5 concentrações)	1 (de cada concentração)											
Padrão Hidroxidopa (5 concentrações)	1 (de cada concentração)											
Padrão 6-Fluoro-L-DOPA (5 concentrações)	1 (de cada concentração)											
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Amostra</th> <th>N. de injeções</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Padrão SnCl (5 concentrações)</td> <td>1 (de cada concentração)</td> </tr> <tr> <td>Padrão Levodopa (5 concentrações)</td> <td>1 (de cada concentração)</td> </tr> <tr> <td>Padrão Hidroxidopa (5 concentrações)</td> <td>1 (de cada concentração)</td> </tr> <tr> <td>Padrão 6-Fluoro-L-DOPA (5 concentrações)</td> <td>1 (de cada concentração)</td> </tr> </tbody> </table>	Amostra	N. de injeções	Padrão SnCl (5 concentrações)	1 (de cada concentração)	Padrão Levodopa (5 concentrações)	1 (de cada concentração)	Padrão Hidroxidopa (5 concentrações)	1 (de cada concentração)	Padrão 6-Fluoro-L-DOPA (5 concentrações)	1 (de cada concentração)	r² ≥ 0.99	
Amostra	N. de injeções											
Padrão SnCl (5 concentrações)	1 (de cada concentração)											
Padrão Levodopa (5 concentrações)	1 (de cada concentração)											
Padrão Hidroxidopa (5 concentrações)	1 (de cada concentração)											
Padrão 6-Fluoro-L-DOPA (5 concentrações)	1 (de cada concentração)											

Detetor UV-Vis												
Parâmetros analíticos	Testes	Critérios de aceitação										
Precisão	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Amostra</th> <th>N. de injeções</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Padrão SnCl (0,05mg/mL)</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>Padrão Levodopa (0,02mg/mL)</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>Padrão Hidroxidopa (0,0025mg/mL)</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>Padrão 6-Fluoro-L-DOPA (0,00115 mg/mL)</td> <td>6</td> </tr> </tbody> </table>	Amostra	N. de injeções	Padrão SnCl (0,05mg/mL)	6	Padrão Levodopa (0,02mg/mL)	6	Padrão Hidroxidopa (0,0025mg/mL)	6	Padrão 6-Fluoro-L-DOPA (0,00115 mg/mL)	6	% RSD ≤ 2,5 %
	Amostra	N. de injeções										
	Padrão SnCl (0,05mg/mL)	6										
	Padrão Levodopa (0,02mg/mL)	6										
	Padrão Hidroxidopa (0,0025mg/mL)	6										
Padrão 6-Fluoro-L-DOPA (0,00115 mg/mL)	6											

Tabela 5: Parâmetros analíticos e critérios de aceitação no detetor de atividade

Detetor Atividade														
Parâmetros analíticos	Testes	Critérios de aceitação												
LOQ	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Amostra</th> <th>N. de injeções</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Solução diluída 400 vezes (Solução B5)</td> <td>3</td> </tr> </tbody> </table>	Amostra	N. de injeções	Solução diluída 400 vezes (Solução B5)	3	A mais baixa atividade corrigida pelo decaimento com S/N ≥ 10								
Amostra	N. de injeções													
Solução diluída 400 vezes (Solução B5)	3													
Lineariedade	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Amostra</th> <th>N. de injeções</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Solução diluída 400 vezes (Solução B5)</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Solução diluída 200 vezes (Solução B4)</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Solução diluída 20 vezes (Solução B3)</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Solução diluída 2 vezes (Solução B2)</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Solução as is (Solução B1)</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table>	Amostra	N. de injeções	Solução diluída 400 vezes (Solução B5)	1	Solução diluída 200 vezes (Solução B4)	1	Solução diluída 20 vezes (Solução B3)	1	Solução diluída 2 vezes (Solução B2)	1	Solução as is (Solução B1)	1	r² ≥ 0.99 (represente a área vs a atividade corrigida)
Amostra	N. de injeções													
Solução diluída 400 vezes (Solução B5)	1													
Solução diluída 200 vezes (Solução B4)	1													
Solução diluída 20 vezes (Solução B3)	1													
Solução diluída 2 vezes (Solução B2)	1													
Solução as is (Solução B1)	1													

Detetor Atividade						
Parâmetros analíticos	Testes	Critérios de aceitação				
Precisão	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Amostra</th> <th>N. de injeções</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Solução as is (Solução BI)</td> <td>6</td> </tr> </tbody> </table>	Amostra	N. de injeções	Solução as is (Solução BI)	6	% RSD de RF <10 %
	Amostra	N. de injeções				
Solução as is (Solução BI)	6					

4.1.1. Padrões, amostras e reagentes

Utilizou-se o material enumerado na Tabela 6 para esta validação do método.

Tabela 6: Lista de materiais

Nome	Lote	Marca	Abreviaturas
Água para HPLC	–	MilliQ	–
Fosfato de Sódio Monobásico Di-Hidratado	BCBV3964	Sigma Aldrich	–
Ácido Fosfórico	S2BDO37OV	Sigma Aldrich	–
Cloreto de Estanho	EZFJE-UP	TGI	–
Levodopa	LRAC2957	Sigma Aldrich	–
6-Hidroxi-dopa	BCCH3250	Sigma Aldrich	–
6-Fluoro-L-DOPA	20230101	ABX	6-F-DOPA

4.1.2. Equipamento

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, modelo Agilent 1260 Infinity II (HPLC 3), equipado com (Tabela 7):

Tabela 7: Componentes do cromatógrafo líquido de alta eficiência, Agilent Technologies, modelo Agilent 1260 Infinity II (HPLC3)

Coluna	XTERRA® RPI8 5µM, 4,6 x 250mm
Detetor	VWD 1260 Infinity II G7114A
Software de aquisição de dados	Gina X

4.1.3. Condições Operacionais

As condições de operação do método estão descritas abaixo na Tabela 8:

Tabela 8: Condições de operação do método

Detetor	Comprimento de onda	:	200 e 283 nm
	Cintilação	:	Detetor com sensibilidade LOQ ≤ 0,5 MBq/mL)
Temperatura	Temperatura da Coluna	:	Temperatura ambiente (não controlada)
Outros	Fluxo	:	1.0 mL/min
	Volume de injeção	:	20 µl
	Tempo de corrida	:	15 min
	Programa	:	Isocrático
	Fase Móvel	:	NaH ₂ PO ₄ 6,9g/L
	Diluyente	:	Água para HPLC

4.2. Validação do método GC

O método analítico em análise pertence à categoria II (secção de validação dos métodos analíticos) e envolve a utilização de cromatografia gasosa. Através desta validação, pretende-se evidenciar que o método analítico GC utilizado para controlar o teor de Etanol (EtOH), Acetonitrilo (ACN), e Dimetilacetamida (DMA) no radiofármaco 6-[¹⁸F]FDOPA é apropriado para o fim a que se destina.

Foram realizados testes necessários para validar o método analítico, incluindo o estudo do limite de impurezas, que abrange critérios como especificidade, exatidão, precisão, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

Na tabela 9 são apresentados os parâmetros analíticos que vão ser validados e os respectivos critérios de aceitação.

Tabela 9: Parâmetros analíticos e critérios de aceitação

Parâmetros analíticos	Testes	Critérios de aceitação												
Seletividade / Especificidade	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Amostra</th> <th>N. de injeções</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Branco</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Padrão EtOH</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Padrão ACN</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Padrão DMA</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Amostra</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table>	Amostra	N. de injeções	Branco	1	Padrão EtOH	1	Padrão ACN	1	Padrão DMA	1	Amostra	1	Nenhuma interferência significativa entre o branco e os picos de interesse.
	Amostra	N. de injeções												
	Branco	1												
	Padrão EtOH	1												
	Padrão ACN	1												
	Padrão DMA	1												
Amostra	1													
Nota: Este parâmetro pode ser avaliado através da análise dos cromatogramas obtidos durante a avaliação dos restantes parâmetros analíticos.														
LOD	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Amostra</th> <th>N. de injeções</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Padrão EtOH (25 ppm)</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>Padrão ACN (25 ppm)</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>Padrão DMA (25 ppm)</td> <td>3</td> </tr> </tbody> </table>	Amostra	N. de injeções	Padrão EtOH (25 ppm)	3	Padrão ACN (25 ppm)	3	Padrão DMA (25 ppm)	3	S/N ≥ 3				
	Amostra	N. de injeções												
	Padrão EtOH (25 ppm)	3												
	Padrão ACN (25 ppm)	3												
Padrão DMA (25 ppm)	3													
LOQ	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Amostra</th> <th>N. de injeções</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Padrão EtOH (50 ppm)</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>Padrão ACN (50 ppm)</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>Padrão DMA (50 ppm)</td> <td>3</td> </tr> </tbody> </table>	Amostra	N. de injeções	Padrão EtOH (50 ppm)	3	Padrão ACN (50 ppm)	3	Padrão DMA (50 ppm)	3	S/N ≥ 10				
	Amostra	N. de injeções												
	Padrão EtOH (50 ppm)	3												
Padrão ACN (50 ppm)	3													
Padrão DMA (50 ppm)	3													

Parâmetros analíticos	Testes	Critérios de aceitação												
Linearidade	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Amostra</th> <th>N. de injeções</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Padrão EtOH (5 concentrações)</td> <td>1 (de cada concentração)</td> </tr> <tr> <td>Padrão ACN (5 concentrações)</td> <td>1 (de cada concentração)</td> </tr> <tr> <td>Padrão DMA (5 concentrações)</td> <td>1 (de cada concentração)</td> </tr> </tbody> </table>	Amostra	N. de injeções	Padrão EtOH (5 concentrações)	1 (de cada concentração)	Padrão ACN (5 concentrações)	1 (de cada concentração)	Padrão DMA (5 concentrações)	1 (de cada concentração)	$r^2 \geq 0.99$				
Amostra	N. de injeções													
Padrão EtOH (5 concentrações)	1 (de cada concentração)													
Padrão ACN (5 concentrações)	1 (de cada concentração)													
Padrão DMA (5 concentrações)	1 (de cada concentração)													
Precisão	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Amostra</th> <th>N. de injeções</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Padrão EtOH (0,05mg/mL)</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>Padrão ACN (0,02mg/mL)</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>Padrão DMA (0,0025mg/mL)</td> <td>6</td> </tr> </tbody> </table>	Amostra	N. de injeções	Padrão EtOH (0,05mg/mL)	6	Padrão ACN (0,02mg/mL)	6	Padrão DMA (0,0025mg/mL)	6	% RSD $\leq 2,5$ %				
Amostra	N. de injeções													
Padrão EtOH (0,05mg/mL)	6													
Padrão ACN (0,02mg/mL)	6													
Padrão DMA (0,0025mg/mL)	6													
Exatidão	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Amostra</th> <th>N. de injeções</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Padrão EtOH (100mg/mL)</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>Padrão ACN (8,2mg/mL)</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>Padrão DMA (21,8mg/mL)</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>0,75 mL FDOPA+0,25mL padrão</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>0,5 mL FDOPA+0,5mL padrão</td> <td>3</td> </tr> </tbody> </table>	Amostra	N. de injeções	Padrão EtOH (100mg/mL)	6	Padrão ACN (8,2mg/mL)	6	Padrão DMA (21,8mg/mL)	6	0,75 mL FDOPA+0,25mL padrão	3	0,5 mL FDOPA+0,5mL padrão	3	Recuperação: $100 \pm 30\%$
Amostra	N. de injeções													
Padrão EtOH (100mg/mL)	6													
Padrão ACN (8,2mg/mL)	6													
Padrão DMA (21,8mg/mL)	6													
0,75 mL FDOPA+0,25mL padrão	3													
0,5 mL FDOPA+0,5mL padrão	3													

4.2.1. Padrões, amostras e reagentes

Utilizou-se o material enumerado na Tabela 10 para esta validação do método.

Tabela 10: Lista de materiais

Nome	Lote	Marca	Abreviações
Água	—	MilliQ	—
Etanol	2178083	Fisher	EtOH
Acetonitrilo	2208913	Fisher	ACN
Dimetilacetamida	STBH5263	Fisher	DMA

4.2.2. Equipamento

Cromatógrafo de gás Agilent Technologies, modelo Agilent 6850 (GC01) equipado com (Tabela 11):

Tabela 11: Componentes do cromatógrafo de gás Agilent Technologies, modelo Agilent 6850 (GC01)

Liner	Liner 4 mm com lâ de vidro (PN #5183-4647 ou equivalente)
Coluna	RES-SOLV (30m x 0,53mm x 1,0 μ m; PN #190095V-420 ou equivalente)
Detetor	Detetor de ionização de chamas (FID)
Software de aquisição de dados	Software Gina Star, versão 4.8

4.2.3. Condições Operacionais

As condições de operação do método estão descritas abaixo na Tabela 12:

Tabela 12: Condições de operação do método

Injetor				
Modo	<i>Split</i>			
Temperatura	250 °C			
Razão Split	15:1			
Gás	Hélio			
Liner	<i>Liner cônico com lã de vidro, 4.0 mm ID, PN#5183-4647.</i>			
Forno				
Tempo de equilíbrio	0.00 min			
Tempo de corrida	15.0 min			
	Tempo total (min)	Temperatura (°C)	Rampa (°C/min)	Tempo de espera (min)
	2	30	0	2
	5	50	6,666	0
	15	110	50	9
Detetor				
Temperatura	260 °C			
Modo	Constante			
Fluxo gás de arreste	30 mL/min (He)			
Fluxo hidrogênio	40 mL/min			
Fluxo Ar	300 mL/min			
Coluna				
HP-Fast Residual Solvent; PN#1095V-420E				
Modo	Fluxo constante			
Fluxo	3.0 mL/min			
Comprimento	30 m			
Diâmetro interno	530 µm			
Espessura do filme	1.0 µm			

5. Resultados e Discussão

5.1. Resultados de HPLC com o detetor UV-VIS

Inicialmente foi utilizado o método Fluorodopa (^{18}F) (preparado por substituição nucleofílica) que se encontra descrito na monografia 2481 Fluorodopa (^{18}F) (preparado por substituição nucleofílica) da Farmacopeia Europeia, utilizando como fase móvel A água com ácido trifluoroacético (TFA) (0,08%) e como fase móvel B Acetonitrilo 100% como fase móvel, e um fluxo de 1 ml/min (Tabela 13) (30).

Tabela 13: Gradiente de concentração

Tempo (min)	Fase móvel A (per cent V/V)	Fase móvel B (per cent V/V)
0 – 10	98	2
10 – 13	98 → 95	2 → 5
13 – 20	95	5
20 – 35	95 → 5	5 → 95
35 – 37	5	95

O resultado deste método demonstrou uma sobreposição dos picos de SnCl e 6-hidroxi-dopa (figura 7). Por essa razão, o fluxo foi reduzido para 0,6 ml/min com o intuito de melhorar a separação dos compostos, porém foi observado que a 6-hidroxi-dopa sofria degradação, formando um pico sobreposto ao do SnCl, o que inviabilizou o método (figura 8 e 9).

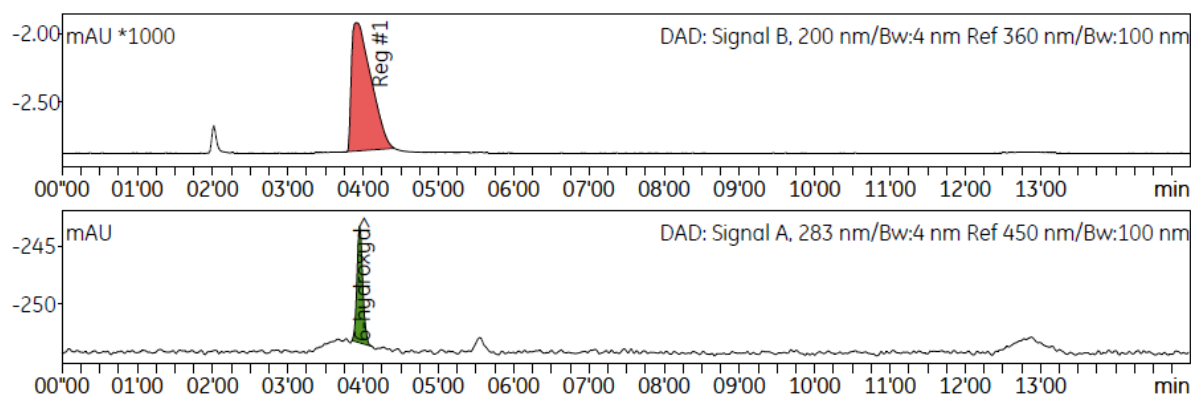


Figura 7: Cromatograma do resultado do método nucleofílico com fluxo de 1 mL/mL

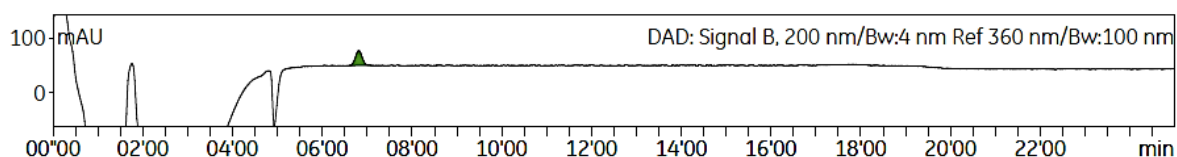


Figura 8: Cromatograma da injeção de 0,15 mg/ml de SnCl

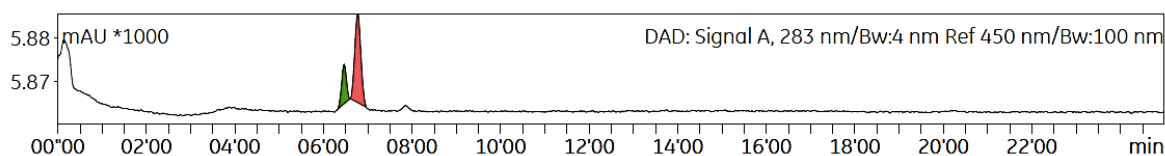


Figura 9: Cromatograma da injeção de 0,01 mg/ml de 6-hydroxydopa

Devido à co-eluição dos picos de degradação da 6-hidroxi-dopa com o pico do SnCl, optou-se por adotar um método alternativo, descrito na monografia 2481 Fluorodopa (^{18}F) (preparado por substituição eletrofílica) da Farmacopeia Europeia (31).

Realizou-se uma substituição da coluna XTERRA® RP18 5 μM , 4,6 x 250mm pela coluna Luna® 5 μm C18 (2) 100, 250 x 4mm e a fase móvel foi alterada para NaH₂PO₄ 6,9g/L. Inicialmente, utilizou-se um fluxo de 1.0 mL/min, conforme especificado na farmacopeia, no entanto, não foi observada separação dos compostos SnCl e 6-hidroxi-dopa. Para tentar melhorar a separação, reduziu-se o fluxo para 0,8 mL/min, mas sem sucesso. Posteriormente, optou-se por retornar à coluna inicial (XTERRA® RP18 5 μM , 4,6 x 250mm), mantendo a fase móvel utilizada na outra coluna, e o fluxo foi ajustado para 1,0 mL/min, o que permitiu a observação da separação dos compostos (Figura 10).

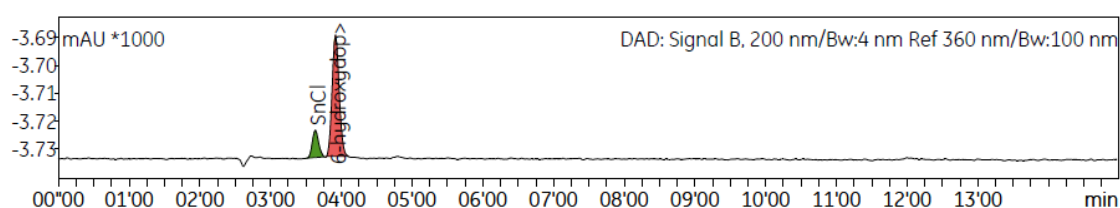


Figura 10: Cromatograma do resultado do método eletrofílico com fluxo de 1 mL/mL

É importante mencionar que, além do SnCl e da 6-Hidroxi-dopa, também foram validadas a Levodopa e a 6-FDOPA neste método analítico. O resultado mais importante desta validação foi que este método demonstrou ter a melhor capacidade de separação entre os picos, com um valor de resolução de 1,6. Isso significa que o método conseguiu separar de forma eficaz e precisa os diferentes componentes do radiofármaco. Portanto, esta modificação

do método provou ser particularmente eficaz na separação e quantificação desses compostos, tornando-o a escolha preferencial para essa finalidade.

Posto isto avançou-se com este método para validação dos métodos analíticos das impurezas referidas anteriormente.

5.1.1. Seletividade

A seletividade foi realizada para garantir que o método é capaz de resolver os picos de Cloreto de estanho, Levodopa, 6-hidroxiydopa e 6-F-DOPA e que não haja interferência significativa entre o branco e o pico de interesse.

Este parâmetro foi avaliado através da injeção de cada uma das seguintes soluções uma vez:

- Um branco;
- Solução padrão de referência com concentração de 0,05 mg/mL de SnCl;
- Solução padrão de referência com concentração de 0,02 mg/mL de Levodopa;
- Solução padrão de referência com concentração de 0,0025 mg/mL de 6-Hidroxidopa;
- Solução padrão de referência com concentração de 0,0115 mg/m de 6-Fluoro-L-DOPA;
- Amostra de F-DOPA

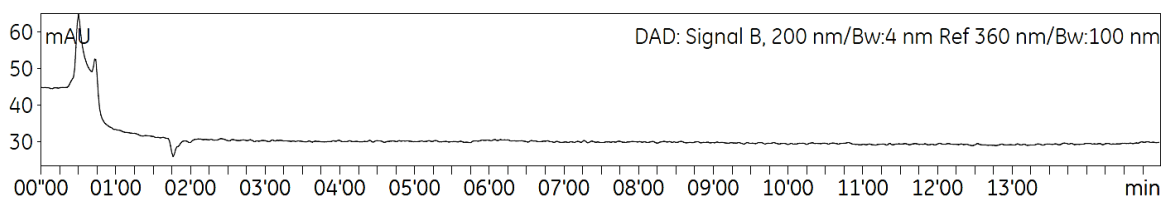


Figura 11: Branco

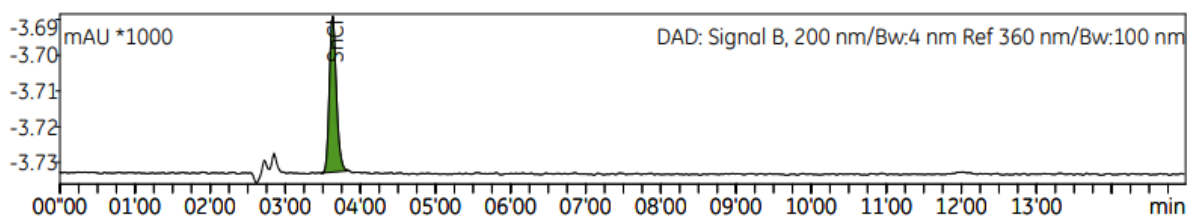


Figura 12: Solução Referência de SnCl (0,05 mg/ml)

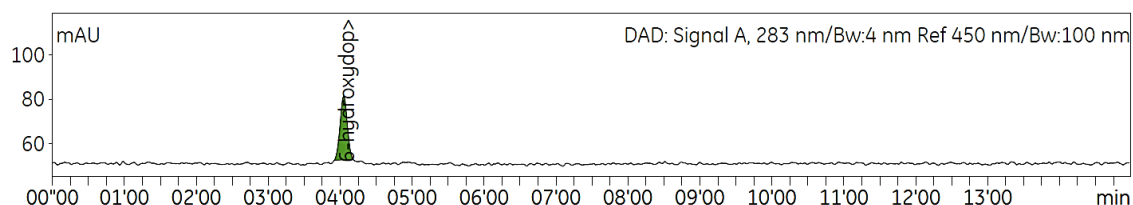


Figura 13: Solução Referência de Levodopa (0,02 mg/ml)

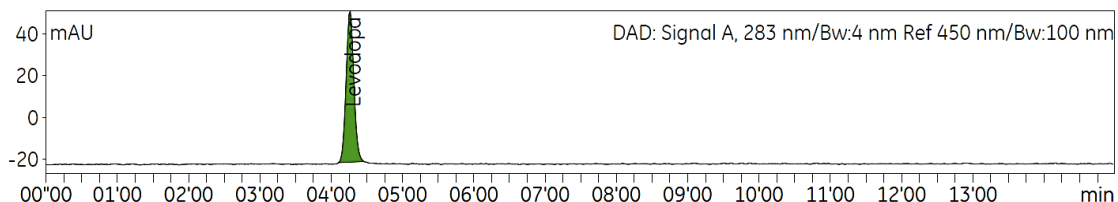


Figura 14: Solução Referência de 6-Hydroxydopa (0,0025 mg/ml)

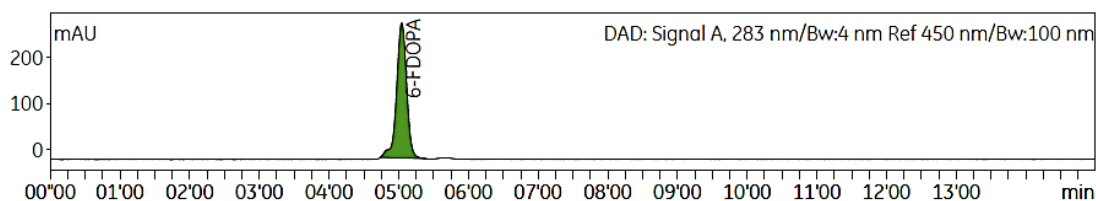


Figura 15: Solução Referência de 6-Fluoro-L-DOPA (0,0115 mg/ml)

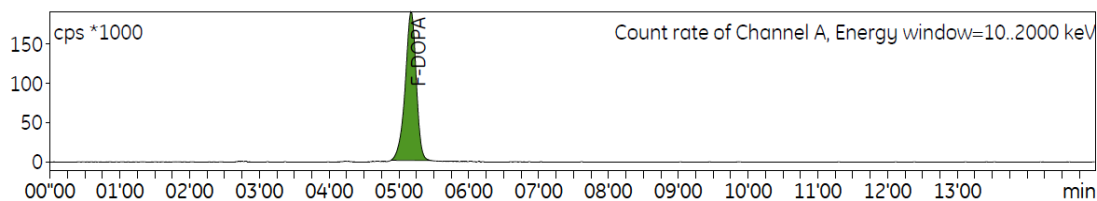


Figura 16: Amostra de F-DOPA

Com base nos resultados obtidos, verificou-se que os compostos em estudo estão separados de quaisquer outros picos, e a amostra em branco não apresentou interferência nos tempos de retenção dos picos de interesse. Dessa forma, pode-se concluir que a seletividade do método analítico atendeu a todos os critérios de aceitação estabelecidos no protocolo de validação, validando assim, o método analítico como seletivo.

5.1.2. Limite de Detecção (LOD)

5.1.2.1. Cloreto de Estanho (SnCl)

O limite de detecção foi determinado pela injeção em triplicado da solução de concentração de 0,0025mg/mL. Foi avaliado o parâmetro sinal-ruído do pico em análise cujo critério de aceitação é $S/N \geq 3$. A Tabela 14 mostra os resultados obtidos nesta avaliação. A Figura 17 apresenta um cromatograma LOD representativo.

Tabela 14: Resultados LOD para SnCl

Injeção	Concentração (mg/ml)	Área	S/N
1	0,0025	31,16	15
2		42,18	12
3		47,33	18
Critérios de Aceitação			$S/N \geq 3$
Conformidade			Cumpre

Dado que as três injeções cumpriam com o critério de aceitação estabelecido, o limite de detecção para o cloreto de estanho foi estabelecido para a concentração de 0,0025mg/mL.

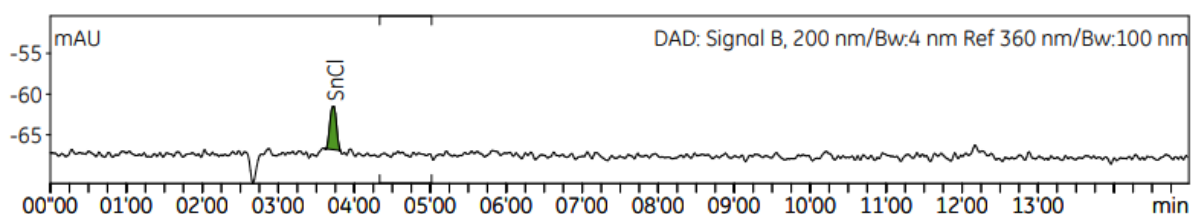


Figura 17: Cromatograma LOD para SnCl

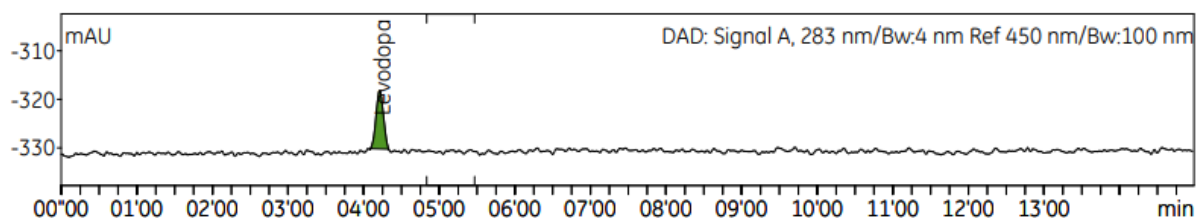
5.1.2.2. Levodopa

O mesmo tipo de estudo foi realizado para o composto levodopa, para a concentração de 0,0025mg/mL. Os resultados são apresentados na Tabela 15. A Figura 18 apresenta um cromatograma LOD representativo.

Tabela 15: Resultados LOD para Levodopa

Injeção	Concentração (mg/mL)	Área	S/N
1	0,0025	82,07	26
2		92,59	26
3		105,08	28
Critérios de Aceitação			S/N ≥ 3
Conformidade			Cumpre

Para as três injeções obtiveram-se valores de S/N de 26, 26 e 28. Assim foi determinada o limite de detecção para a levodopa.

**Figura 18:** Cromatograma LOD para Levodopa

5.1.2.3. 6-Hidroxi-dopa

Uma vez mais, injetou-se em triplicado uma solução de concentração de 0,0005mg/mL da 6-hidroxi-dopa para determinar o limite de detecção. A Figura 19 apresenta um cromatograma LOD representativo. Os resultados encontram-se na Tabela 16.

Tabela 16: Resultados LOD de 6-hidroxi-dopa

Injeção	Concentração (mg/ml)	Área	S/N
1	0,0005	19,11	6
2		18,65	5
3		18,71	6
Critérios de Aceitação			S/N ≥ 3
Conformidade			Cumpre

A partir dos resultados obtidos verificou-se que os critérios de aceitação para o LOD foram atendidos, uma vez que S/N para as três injeções é superior a 3. Assim, a concentração de LOD foi definida para a concentração de 0,0005 mg/mL.

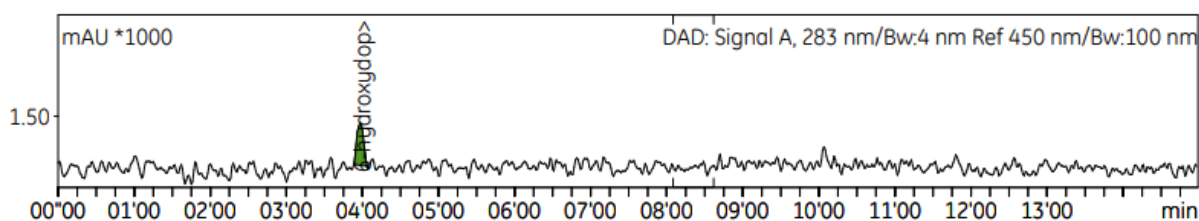


Figura 19: Cromatograma LOD para 6-hidroxi-dopa

5.1.2.4. 6-Fluoro-L-DOPA

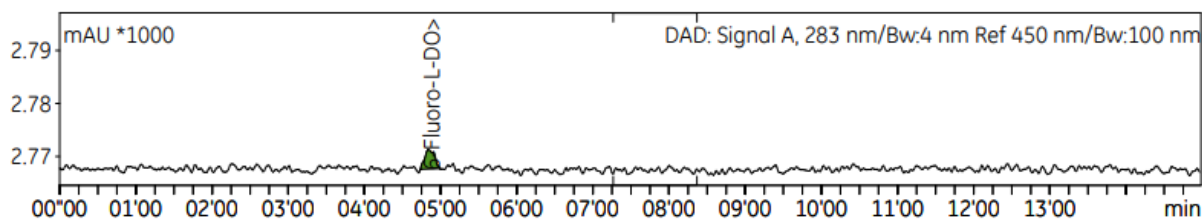
Finalmente, o limite de detecção para o produto principal foi avaliado, para uma concentração 0,001 mg/mL. A solução foi novamente injetada três vezes. Os resultados de LOD são apresentados na Tabela 17. A Figura 20 apresenta um cromatograma LOD representativo.

Tabela 17: Resultados LOD de 6-Fluoro-L-DOPA

Injeção	Concentração (mg/ml)	Área	S/N
1	0,001	32,11	4
2		23,36	3
3		27,99	5
Critérios de Aceitação			S/N ≥ 3
Conformidade			Cumpre

Os resultados obtidos demonstram que o limite de detecção foi estabelecido para a concentração de 0,001 mg/mL.

Figura 20: Cromatograma LOD para 6-Fluoro-L-DOPA



5.1.3. Limite de Quantificação (LOQ)

5.1.3.1. Cloreto de Estanho (SnCl)

O limite de quantificação para o cloreto de estanho foi avaliado pela preparação e injeção, em triplicado, de uma solução de 0,005 mg/mL, no HPLC, e avaliou-se o parâmetro sinal-ruído do pico em análise. Este procedimento foi repetido 3 vezes.

Os resultados de LOQ são mostrados na Tabela 18. A Figura 21 mostra um cromatograma LOQ representativo para o pico do cloreto de estanho.

Tabela 18: Resultados LOQ do SnCl

Injeção	Concentração (mg/mL)	Área	S/N
1	0,005	45,83	17
2		50,73	18
3		52,06	21
Critérios de Aceitação			S/N ≥ 10
Conformidade			Cumpre

A partir dos resultados obtidos verificou-se que os critérios de aceitação para o LOQ foram atendidos, uma vez que S/N para as três injeções é superior a 10. Assim, a concentração de LOQ foi definida para a concentração de 0,005 mg/mL de cloreto de estanho.

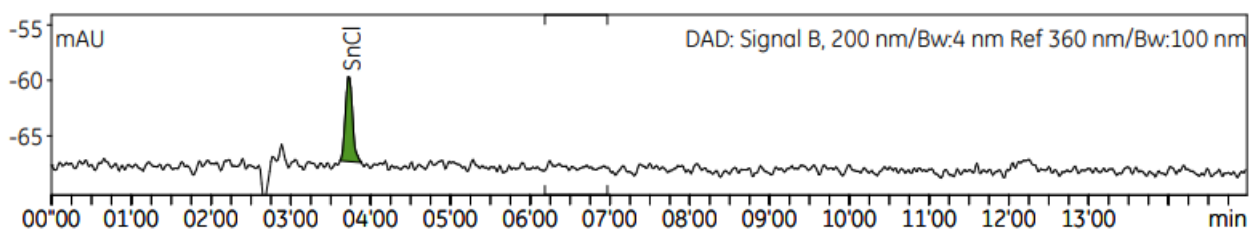


Figura 21: Cromatograma LOQ para SnCl

5.1.3.2. Levodopa

O mesmo procedimento foi utilizado para determinação do LOQ da levodopa. Foi injetada em triplicado uma solução de 0,005 mg/mL. A Figura 22 apresenta um cromatograma LOQ representativo. Os resultados são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19: Resultados LOQ da Levodopa

Injeção	Concentração (mg/mL)	Área	S/N
1	0,005	115,55	36
2		131,77	31
3		139,24	39
Critérios de Aceitação			S/N ≥ 10
Conformidade			Cumpre

As três injeções apresentaram valores de S/N superior a 10, pelo que o LOQ foi estabelecido para esta concentração.

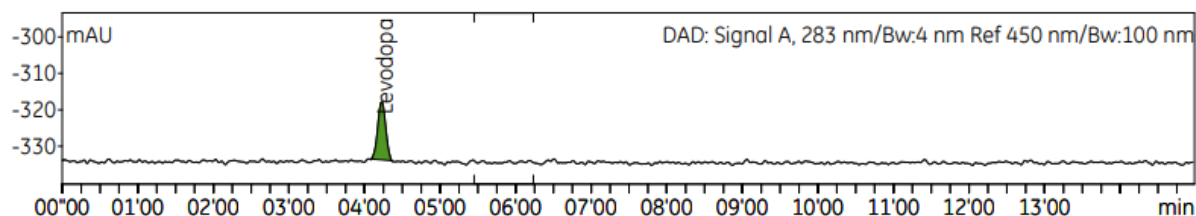


Figura 22: Cromatograma LOQ para Levodopa

5.1.3.3. 6-Hidroxi-dopa

Para determinar o LOQ, injetaram-se 20µl da solução de 6-hidroxi-dopa com a concentração 0,001 mg/mL e verificou-se o resultado. Este procedimento foi repetido 3 vezes. A Figura 23 apresenta um cromatograma LOQ representativo.

Tabela 20: Resultados LOQ de 6-Hydroxydopa

Injeção	Concentração (mg/mL)	Área	S/N
1	0,001	51,33	15
2		52,62	14
3		48,92	14
Critérios de Aceitação			S/N ≥ 10
Conformidade			Cumpre

Mais uma vez, dado que para as três injeções o critério de S/N foi cumprido, a concentração de 0,001 mg/mL da 6-hidroxi-dopa foi estabelecida como limite de quantificação.

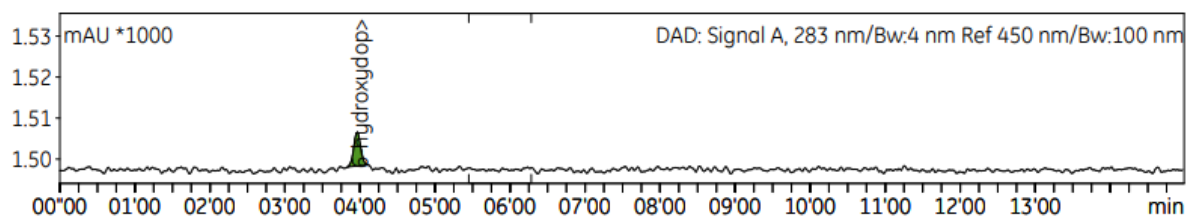


Figura 23: Cromatograma LOQ para 6-Hidroxi-dopa

5.1.3.4. 6-Fluoro-L-DOPA

Por fim, o limite de quantificação para o produto principal foi avaliado, para uma concentração 0,0025 mg/mL. A solução foi novamente injetada três vezes. Os resultados de LOQ são apresentados na Tabela 21. A Figura 24 apresenta um cromatograma LOQ representativo.

Tabela 21: Resultados LOQ de 6-Fluoro-L-DOPA

Injeção	Concentração (mg/ml)	Área	S/N
1	0,0025	77,65	12
2		77,68	15
3		94,32	11
Critérios de Aceitação			S/N ≥ 10
Conformidade			Cumpre

A partir dos resultados obtidos verificou-se que os critérios de aceitação para o LOQ foram cumpridos, uma vez que S/N para as três injeções é superior a 10. Assim, a concentração de LOQ foi definida para a concentração de 0,0025 mg/mL de 6-Fluoro-L-DOPA.

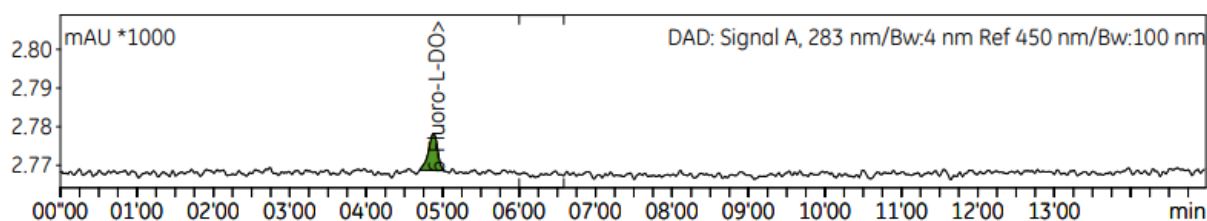


Figura 24: Cromatograma LOQ para 6-Fluoro-L-DOPA

5.1.4. Linearidade

5.1.4.1. Cloreto de Estanho (SnCl)

A linearidade para o cloreto de estanho foi avaliada preparando e injetando uma vez seis soluções com as seguintes concentrações: 0,06 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,04 mg/mL, 0,02 mg/mL, 0,01 mg/mL e 0,005 mg/mL. As preparações e resultados para a linearidade são apresentados na Tabela 22. A Figura 25 apresenta o gráfico de linearidade.

Tabela 22: Resultados da linearidade do Cloreto de Estanho

Solução stock	Esquema de diluição	Concentração (mg/mL)	Área	r ²
100 mg /10 mL	0,05 mL / 100 mL	0,005	47,7	0.99
	0,05 mL / 50 mL	0,01	101,57	
	0,1 mL / 50 mL	0,02	151,3	
	0,2 mL / 50 mL	0,04	388,12	
	0,25 mL / 50 mL	0,05	488,73	
	0,3 mL / 50 mL	0,06	559,81	
Critérios de Aceitação				≥ 0.99
Conformidade				Cumpre

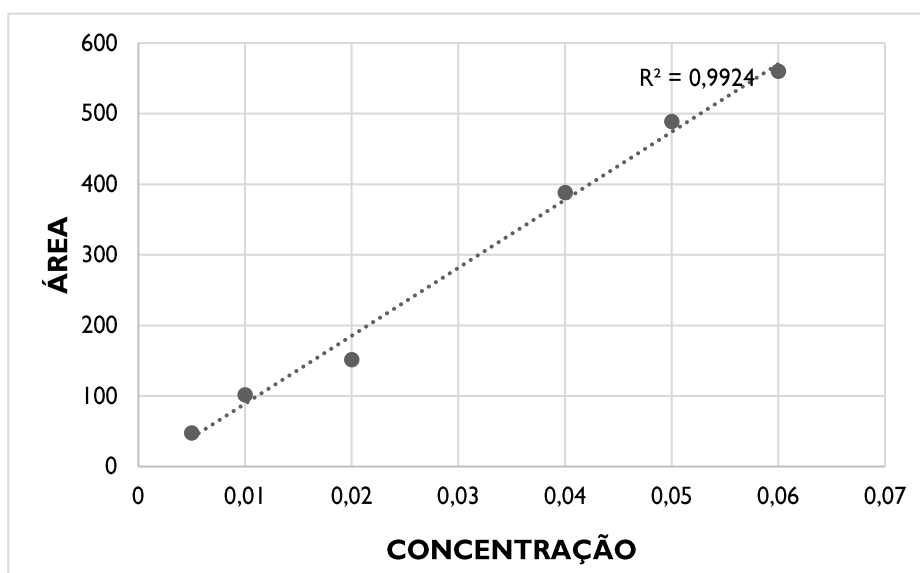


Figura 25: Gráfico de linearidade do Cloreto de Estanho

A linearidade para cloreto de estanho foi comprovada desde LOQ (0,05 mg/mL) até 120% da concentração alvo (0,05 mg/mL) após avaliar que o critério de r² é cumprido.

5.1.4.2. Levodopa

A linearidade para a levodopa foi também avaliada através da injeção de seis soluções com as seguintes concentrações: 0,005 mg/mL, 0,0075 mg/mL, 0,01 mg/mL, 0,015 mg/mL, 0,02 mg/mL e 0,024 mg/mL. As preparações e resultados para a linearidade estão apresentados na Tabela 23. A Figura 26 apresenta o gráfico de linearidade.

Tabela 23: Resultados da linearidade da Levodopa

Solução stock	Esquema de diluição	Concentração (mg/mL)	Área	r ²
50 mg / 10 mL	0,05 mL / 100 mL	0,005	119,75	0.99
	0,075 mL / 50 mL	0,0075	178,69	
	0,1 mL / 50 mL	0,01	229,65	
	0,15 mL / 50 mL	0,015	292,02	
	0,2 mL / 50 mL	0,02	412,38	
	0,24 mL / 50 mL	0,024	461,51	
Critérios de Aceitação				≥ 0.99
Conformidade				Cumpre

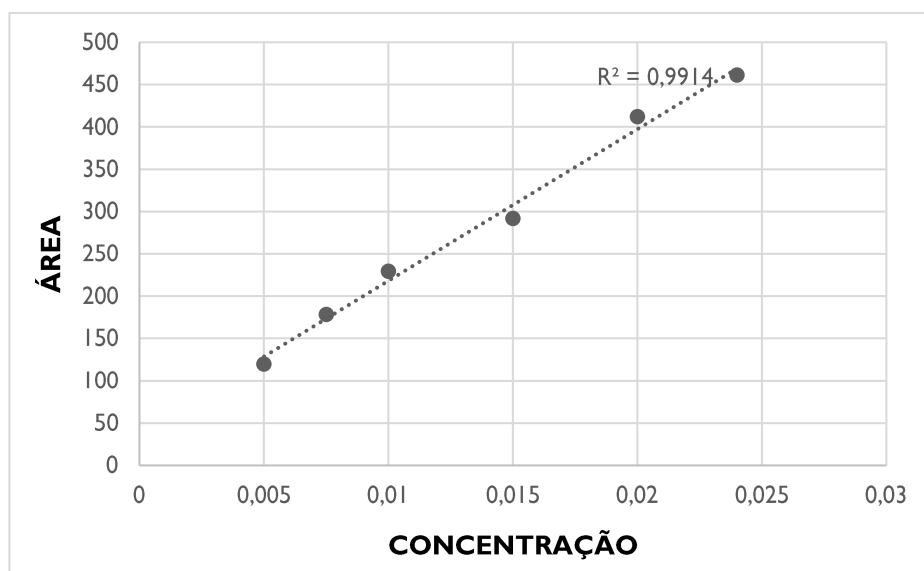


Figura 26: Gráfico da linearidade da Levodopa

Através do cálculo da linearidade obtivemos o resultado apresentado no gráfico, com um valor de $r^2 = 0,99$. Este valor encontra-se dentro dos parâmetros pretendidos pelo que a linearidade foi comprovada.

5.1.4.3. 6-Hidroxicidopa

No caso da 6-hidroxicidopa a linearidade foi testada por injeção das soluções 0,003 mg/mL, 0,0025 mg/mL, 0,0015 mg/mL, 0,0013 mg/mL e 0,001 mg/mL por preparadas a partir da solução stock com concentração 0,1 mg /mL. Os resultados estão apresentados abaixo.

Tabela 24: Resultados da linearidade de 6-Hidroxicidopa

Solução stock	Esquema de diluição	Concentração (mg/ml)	Área	r ²
1 mg /10 mL	0,03 mL / 1 mL	0,003	248,60	0,99
	0,025 mL / 1 mL	0,0025	198,00	
	0,015 mL / 1 mL	0,0015	87,58	
	0,013 mL / 1 mL	0,0013	67,10	
	0,01 mL / 1 mL	0,001	54,70	
Critérios de Aceitação				≥ 0.99
Conformidade				Cumpre

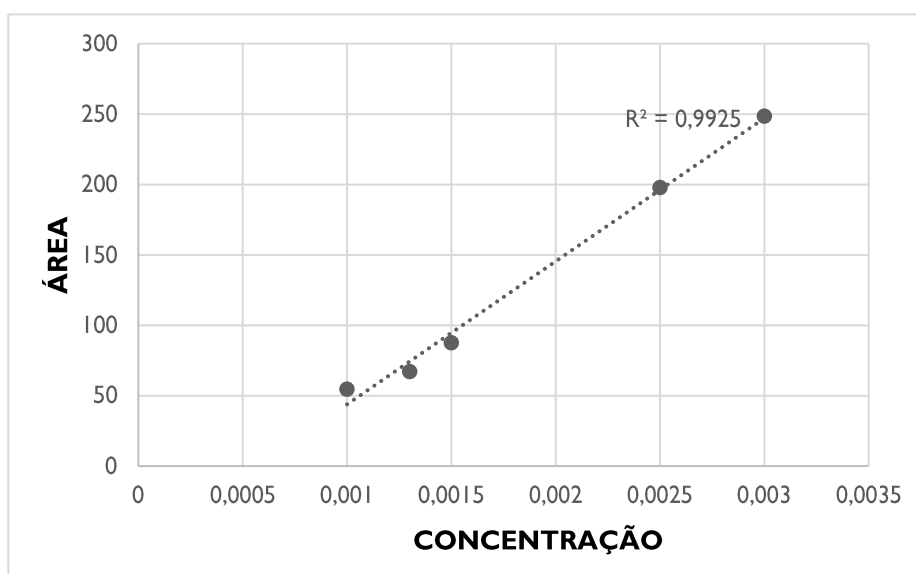


Figura 27: Gráfico da linearidade da 6-Hidroxicidopa

Através do cálculo da linearidade obtivemos o resultado apresentado no gráfico, com um valor de $r^2 = 0,9925$. Este valor encontra-se dentro dos parâmetros pretendidos.

5.1.4.4. 6-Fluoro-L-DOPA

A linearidade do produto principal foi também estudada para as seguintes concentrações: 0,0025 mg/mL, 0,005 mg/mL, 0,0075 mg/mL, 0,01 mg/mL, 0,0115 mg/mL e 0,0138 mg/mL. Os resultados para a linearidade estão apresentados na Tabela 25 e Figura 28.

Tabela 25: Resultados da linearidade de 6-Fluoro-L-DOPA

Solução stock	Esquema de diluição	Concentração (mg/ml)	Área	r ²
100 mg / 10 mL	0,0125 mL / 1 mL	0,0025	63,54	1,0
	0,025 mL / 1 mL	0,005	115,91	
	0,0375 mL / 1 mL	0,0075	168,29	
	0,05 mL / 1 mL	0,01	222,38	
	0,0575 mL / 1 mL	0,0115	255,88	
	0,069 mL / 1 mL	0,0138	290,37	
Critérios de Aceitação				≥ 0.99
Conformidade				Cumpre

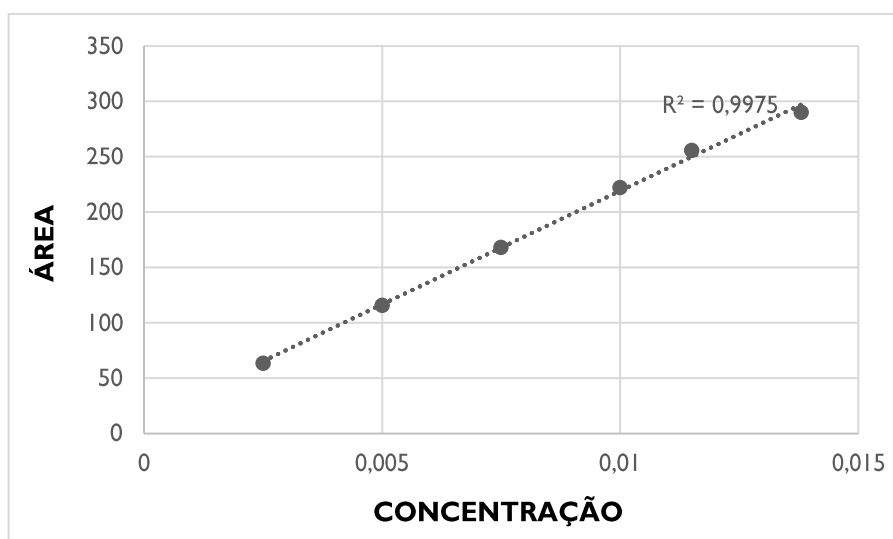


Figura 28: Gráfico de linearidade da 6-Fluoro-L-DOPA

Os resultados provam linearidade para 6-Fluoro-L-DOPA dado que apresenta um valor de r² de 1,0, valor este que cumpre os requisitos pré-estabelecidos.

5.1.5. Precisão

Para a validação da precisão temos de calcular a %RSD através do cálculo da média e do desvio-padrão. Para isso injetaram-se 20µl da solução SnCl de concentração 0,05 mg/mL de Levodopa de concentração 0,02 mg/ml, da solução 6-Hidroxi-dopa de concentração 0,0025 mg/ml e da solução 6-Fluoro-L-DOPA de concentração 0,00115 mg/ml e repetiu-se o procedimento 6 vezes. A % RSD (razão do desvio padrão e a média) das áreas dos picos nas seis injeções foi calculada para demonstrar que o sistema cromatográfico apresenta precisão. Os resultados são apresentados na Tabela 26.

Tabela 26: Resultados da precisão

Injeção	Área SnCl	Área Levodopa	Área 6-Hidroxi-dopa	Área 6-Fluoro-L-DOPA
1	531,67	440,76	175,78	238,99
2	517,56	454,54	176,28	238,73
3	518,12	441,19	173,88	237,27
4	518,87	433,53	176,94	241,49
5	521,7	440,14	180,95	239,89
6	526,09	434,19	172,85	235,60
% RSD	1,1%	1,7%	1,6%	0,86%
Critério de Aceitação	%RSD ≤ 2,5			
Conformidade	Cumprido			

Nota:

$$(1) \%RSD = \frac{\text{Desvio-padrão}}{\text{Média}} \times 100$$

A partir dos resultados obtidos, pode-se verificar que a % RSD das áreas dos picos da solução padrão atendeu ao critério de aceitação. Portanto, a precisão do método foi comprovada.

5.2. Resultados de HPLC com o detetor de atividade

Para realizar a validação da metodologia de HPLC com o detetor de atividade foram preparadas as soluções apresentadas na Tabela 27.

Tabela 27: Lista de soluções

Nome	Diluição	Concentração
Solução B1	1	Solução de 243 MBq/mL
Solução B2	2	Solução B1 diluída 2 vezes
Solução B3	20	Solução B2 diluída 10 vezes
Solução B4	200	Solução B3 diluída 10 vezes
Solução B5	400	Solução B4 diluída 2 vezes

5.2.1. LOQ

O limite de quantificação do detetor foi avaliado injetando três vezes, em diferentes momentos, uma solução diluída 400 vezes de F-DOPA (Referência B5) a partir de uma solução inicial com uma atividade inicial de 243 MBq/mL (Referência B1).

Determinou-se a atividade corrigida pelo decaimento, cujo $S/N \geq 10$ foi determinado. A mais baixa dessas atividades corrigidas pelo decaimento corresponde ao limite de quantificação. Os resultados do LOQ são apresentados na Tabela 28.

Tabela 28: Resultados LOQ de F-DOPA

Sample	Corr.Act. /mL (MBq/mL)	S/N
Ref B5_01	0,225	11
Ref B5_02	0,201	10
Ref B5_03	0,181	13
Critério de Aceitação		S/N ≥ 10 (LOQ ≤ 0,5 MBq/mL)
Conformidade		Cumpre

5.2.2. Linearidade

A linearidade foi avaliada através da preparação e injeção de cinco soluções diferentes de F-DOPA cuja diluição varia entre 2 e 400 vezes (Referências B2 a B5) a partir de uma solução de iniciação com atividade inicial de 243 MBq/mL (Referência B1) em diferentes momentos. As preparações de linearidade e os resultados são apresentados na Tabela 29. A Figura 29 apresenta o gráfico de linearidade.

Tabela 29: Resultados da linearidade de F-DOPA

Linearidade								
Amostra	Fator Dil.	Atividade (MBq)	Tempo	Tempo Inj.	Δt (min)	Atividade Corr.	Área	r ²
Ref B1_01	1	243	15:13:00	15:13:00	0	4,8600	694986,0000	0,99
Ref B2_01	2			15:32:00	19	2,1551	353974,3000	
Ref B3_01	20			15:48:00	35	0,1948	41381,3300	
Ref B4_01	200			16:06:00	53	0,0174	3457,6670	
Ref B5_01	400			17:50:00	157	0,0045	743,0000	
Ref B5_02	400			18:08:00	175	0,0040	722,7000	
Ref B5_03	400			18:25:00	192	0,0036	609,0000	
Critério de Aceitação								
Conformidade								Cumpre

Nota:

$$(I) \text{ dcA [kBq]} = \frac{V \times A \times 0,5^{\Delta t/109,7}}{f}$$

onde:

V = Volume de injeção (mL)

A = Concentração de atividade (Referência B1) (MBq/mL)

Δt = Diferença de tempo entre a medição da concentração de atividade (Referência B1) e o tempo de injeção por HPLC (min)

f = Fator de diluição (por exemplo, 1, 2, 20, 200, 400)

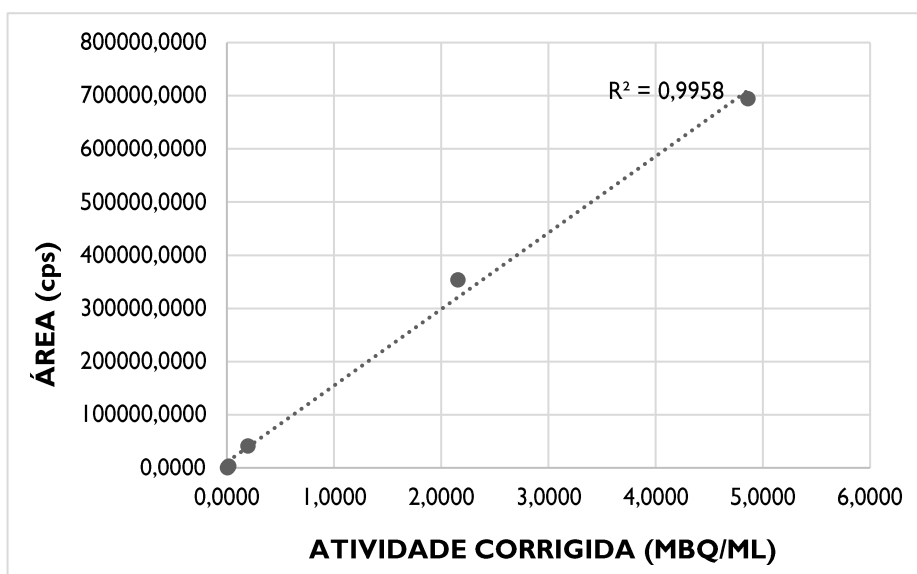


Figura 29: Gráfico de linearidade da F-DOPA

A linearidade do detetor (uma vez que o detetor de cintilação não depende do produto) foi comprovada de LOQ (0,181 MBq/mL) a 243 MBq/mL.

5.2.3. Repetibilidade

A repetibilidade da F-DOPA foi avaliada efetuando seis injeções consecutivas de F-DOPA a partir de uma solução de partida com uma atividade inicial de 2684,8 MBq/mL.

A % RSD da razão entre a área do pico da F-DOPA e as atividades corrigidas correspondentes foi calculada para demonstrar a repetibilidade do método analítico.

Os resultados são apresentados na Tabela 30.

Tabela 30: Resultados da precisão de F-DOPA

Repetibilidade DOPA								
Amostra	Fator Dil.	Atividade (MBq)	Tempo	Inj. Time	Δt (min)	Atividade Corr.	Area	DOPA RF
Ref BI_01	1	2684,8	08:13:00	11:15:00	182	17,00247098	2148377,000	126356,7515
Ref BI_02				11:31:00	198	15,36760247	2122449,00	138111,9146
Ref BI_03				11:48:00	215	13,80244651	2073633,800	150236,6844
Ref BI_04				12:04:00	231	12,47527558	1904395,700	152653,5977
Ref BI_05				12:21:00	248	11,20469665	1726708,800	154105,8052
Ref BI_06				13:06:00	293	8,431691153	1149617,00	136344,7711
Desvio-padrão								11082,2
Média								142968,3
%RS								8%
Critério de Aceitação								%RSD \leq 10
Conformidade								Cumpre

Nota:

$$(1) RF = \frac{\text{Área do Pico}}{\text{Tempo de Injeção da Radioatividade}}$$

Com base nos resultados obtidos, observou-se que o critério de aceitação o foi cumprido. Por conseguinte, pode concluir-se que foi demonstrada a repetibilidade do método analítico para F-DOPA.

5.2.4. Exatidão

O parâmetro da exatidão não foi avaliado porque o detetor de atividade não depende do produto e da matriz, mas apenas do radionuclídeo. Neste método analítico o detetor UV-Vis é utilizado exclusivamente para comprovar a identidade. As impurezas são avaliadas com o detetor de atividade e, como o detetor depende apenas do radionuclídeo em estudo e não de produto e matriz, optou-se, com base neste racional, por não avaliar este parâmetro.

5.3. Resultados do GC

5.3.1. Seletividade / Especificidade

A seletividade foi realizada para garantir que o método é capaz de resolver os picos de EtOH, ACN e DMA e que não haja interferência significativa entre o branco e o pico de interesse.

Este parâmetro foi avaliado através da injeção de cada uma das seguintes soluções uma vez:

- Um branco;
- Solução padrão de referência de EtOH 5000 ppm;
- Solução padrão de referência de ACN 410 ppm;
- Solução padrão de referência de DMA 1090 ppm;
- Amostra de F-DOPA

Os cromatogramas representativos são apresentados nas Figuras 30 à 33.

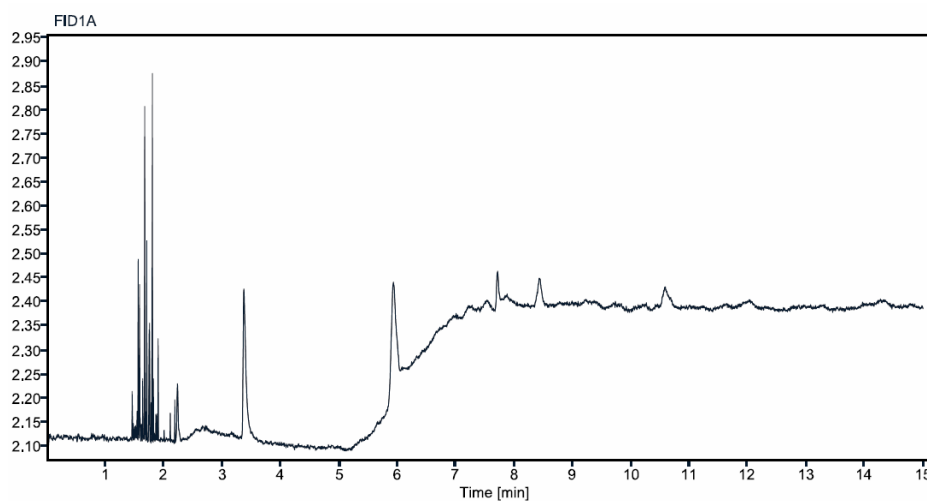


Figura 30: Cromatograma do Branco

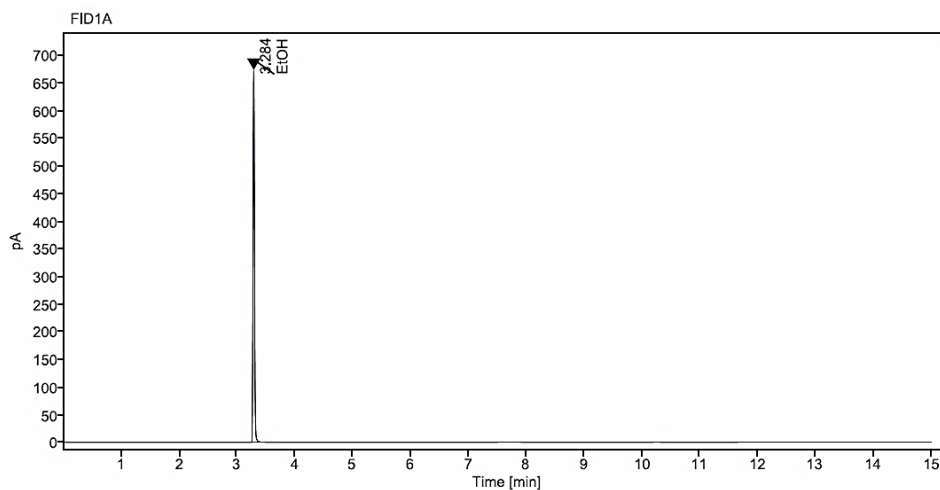


Figura 31: Cromatograma de referência do EtOH 5000 ppm

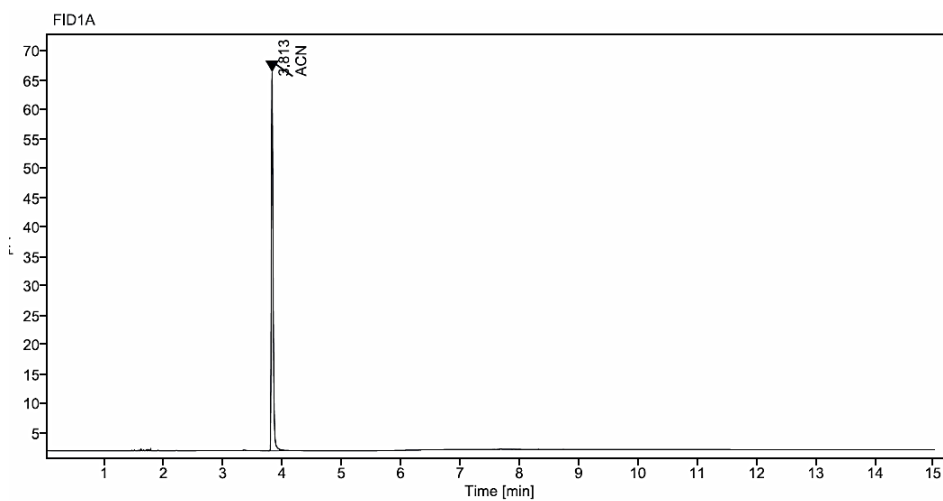


Figura 32: Cromatograma de referência do ACN 410 ppm

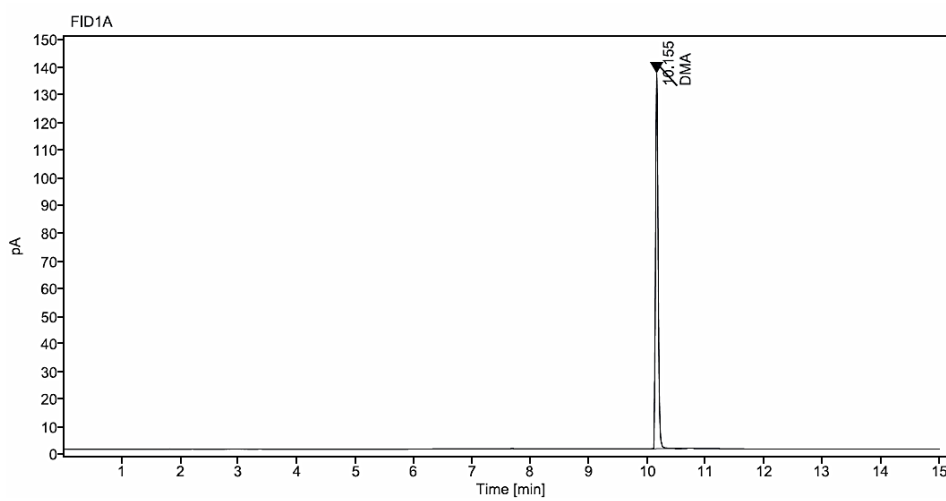


Figura 33: Cromatograma de referência do DMA 1090 ppm

5.3.2. Limite de Detecção (LOD)

O limite de detecção foi avaliado através da injeção repetida três vezes em diferentes pontos de tempo soluções com metade da concentração de LOQ de EtOH, ACN e DMA, ou seja, com concentração de 25ppm.

Os resultados do LOD são apresentados nas Tabelas 31, 32 e 33.

Tabela 31: Resultados de LOD de EtOH

Injeção	Concentração (ppm)	Área	S/N
1	25	10.6	536
2		10.24	567
3		10.83	600
Critérios de Aceitação			S/N ≥ 3
Conformidade			Cumpre

Tabela 32: Resultados de LOD de ACN

Injeção	Concentração (ppm)	Área	S/N
1	25	11.28	848
2		11.57	888
3		12.18	935
Critérios de Aceitação			S/N ≥ 3
Conformidade			Cumpre

Tabela 33: Resultados de LOD de DMA

Injeção	Concentração (ppm)	Área	S/N
1	25	11.72	553
2		11.72	546
3		12.1	561
Critérios de Aceitação			S/N ≥ 3
Conformidade			Cumpre

Os resultados obtidos tiveram os valores superiores ao estabelecido, uma vez que os valores de LOD têm de ser superiores a 3, estas soluções encontram-se dentro dos parâmetros.

5.3.3. Limite de Quantificação (LOQ)

O limite de quantificação foi avaliado através da injeção repetida três vezes em diferentes pontos de tempo soluções diluídas com concentração de 50 ppm de EtOH, ACN e DMA a partir de soluções iniciais de 5000 ppm, 410 ppm e 1090 ppm respetivamente.

Os resultados do LOQ são apresentados nas Tabela 34, 35 e 36.

Tabela 34: Resultados de LOQ de EtOH

Injeção	Concentração (ppm)	Área	S/N
1	50	40.96	2507
2		42.78	2741
3		37.78	2403
Critérios de Aceitação			S/N ≥ 10
Conformidade			Passa

Tabela 35: Resultados de LOQ de ACN

Injeção	Concentração (ppm)	Área	S/N
1	50	24.7	1947
2		25.62	2068
3		22.64	1811
Critérios de Aceitação			S/N ≥ 10
Conformidade			Passa

Tabela 36: Resultados de LOQ de DMA

Injeção	Concentração (ppm)	Área	S/N
1	50	17.36	827
2		16.93	791
3		15.27	719
Critérios de Aceitação			S/N ≥ 10
Conformidade			Passa

Os resultados obtidos tiveram os valores superiores ao estabelecido, uma vez que os valores de LOQ têm de ser superiores a 10, estas soluções encontram-se dentro dos parâmetros.

5.3.4. Linearidade

A linearidade do EtOH foi avaliada através de preparação e injeção de sete soluções diferentes cuja diluição varia entre 50 ppm e 6000 ppm a partir de uma solução inicial com 5000 ppm.

As preparações de linearidade e os resultados são apresentados na Tabela 37. A figura 34 apresenta o gráfico de linearidade.

Tabela 37: Resultados de linearidade EtOH

Injeção	Concentração (ppm)	Área	r ²
1	50	41.88	0.99
2	500	175.51	
3	1000	287.38	
4	2500	766.04	
5	4000	1101.65	
6	5000	1377.28	
7	6000	1708.59	
Critérios de Aceitação			≥ 0.99
Conformidade			Cumpre

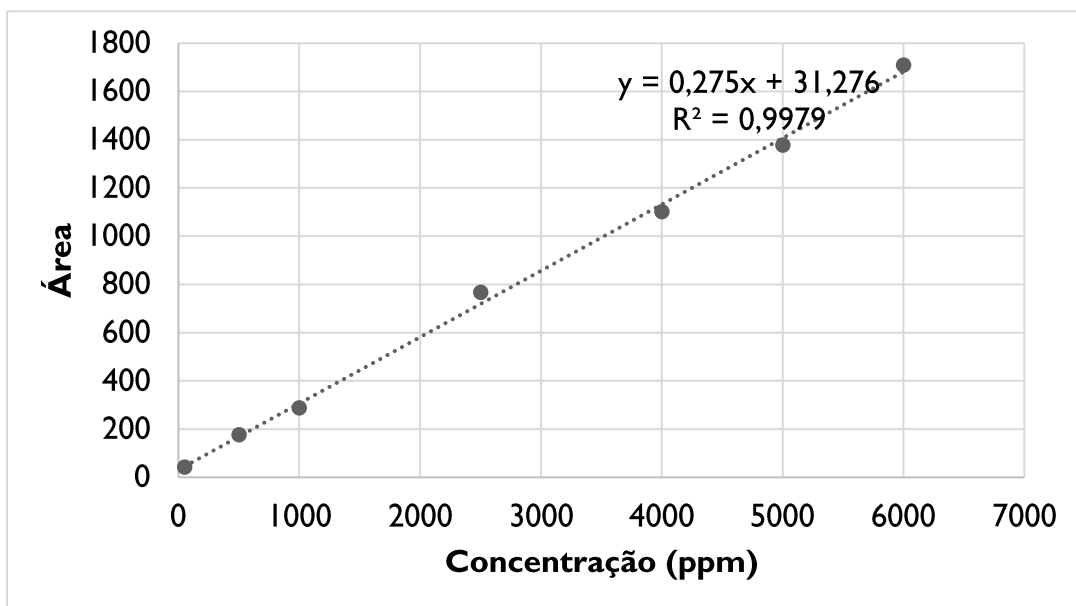


Figura 34: Regressão linear para EtOH desde LOQ (50 ppm) até 6000 ppm.

A linearidade do ACN foi avaliada através de preparação e injeção de sete soluções diferentes cuja diluição varia entre 50 ppm e 492 ppm partir de uma solução inicial com 410 ppm.

As preparações de linearidade e os resultados são apresentados na Tabela 38. A figura 35 apresenta o gráfico de linearidade.

Tabela 38: Resultados de linearidade ACN

Injeção	Concentração (ppm)	Área	r ²
1	50	24.61	0.99
2	100	49.54	
3	200	94.02	
4	300	140.13	
5	350	158.87	
6	410	171.23	
7	492	215.84	
Critérios de Aceitação			≥ 0.99
Conformidade			Cumpre

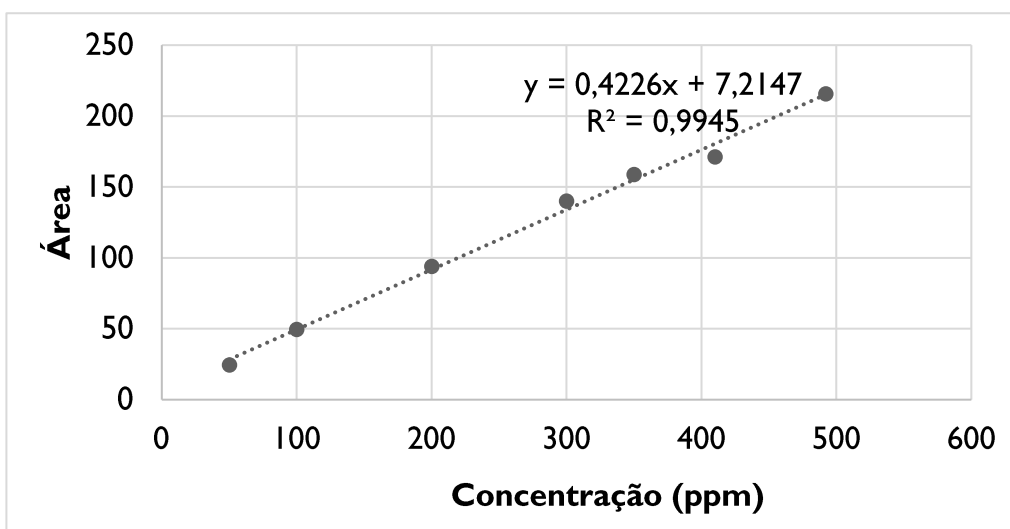


Figura 35: Regressão linear para ACN desde LOQ (50 ppm) até 492 ppm.

A linearidade do DMA foi avaliada através de preparação e injeção de sete soluções diferentes cuja diluição varia entre 50 ppm e 1308 ppm a partir de uma solução inicial com 1090 ppm.

As preparações de linearidade e os resultados são apresentados na Tabela 39. A figura 36 apresenta o gráfico de linearidade.

Tabela 39: Resultados de linearidade DMA

Injeção	Concentração (ppm)	Área	r ²
1	50	17,71	1,00
2	100	32,33	
3	250	68,9	
4	500	147,51	
5	750	222,87	
6	1090	288,00	
7	1308	369,39	
Critérios de Aceitação			≥ 0.99
Conformidade			Cumpre

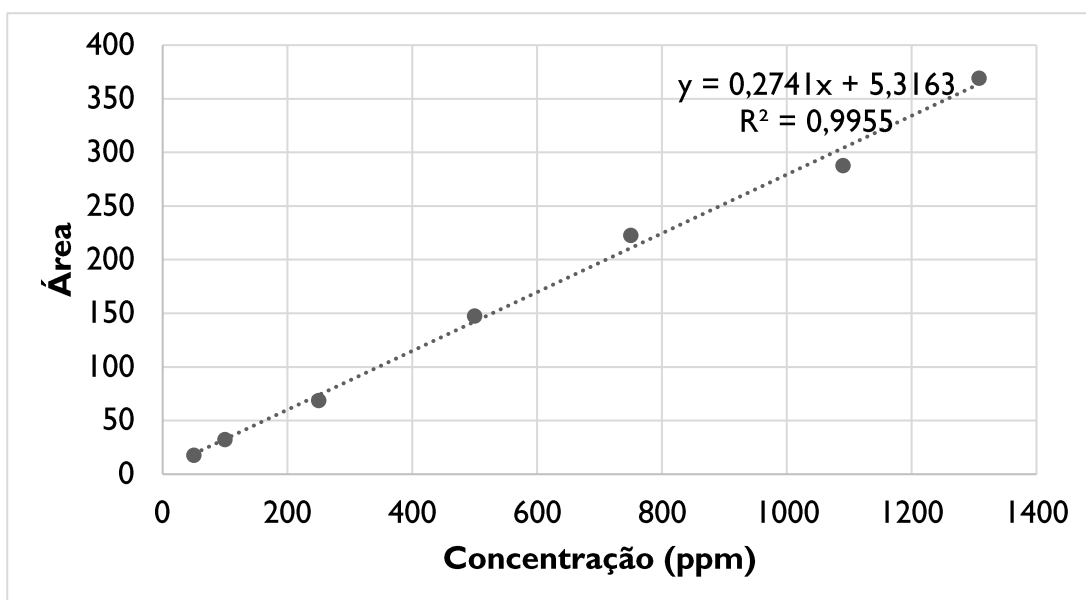


Figura 36: Regressão linear para DMA desde LOQ (50 ppm) até 1308 ppm.

Através do cálculo da linearidade obtivemos os resultados apresentados nos gráficos anteriores, com valores de $r^2 = 0,9979$, $r^2 = 0,9945$ e $r^2 = 0,9955$. Este valor encontra-se dentro dos parâmetros pretendidos.

5.3.5. Precisão

A repetibilidade para EtOh, ACN e DMA foi avaliada através da realização de seis injeções consecutivas a partir de cada uma das soluções iniciais com concentrações de 5000 ppm, 410 ppm e 1090 ppm, respetivamente.

A % RSD das áreas dos picos principais foi avaliada através do cálculo da média e do desvio-padrão e os resultados são apresentados na Tabela 40, 41 e 42.

Tabela 40: Resultados de repetibilidade para EtOH

Injeção	Área
1	1127.58
2	1279.52
3	1056.13
4	1268.40
5	1348
6	1283.28
% RSD	8.70
Critério de Aceitação	%RSD ≤ 10
Conformidade	Cumpre

Tabela 41: Resultados de repetibilidade para ACN

Injeção	Área
1	140.79
2	158.18
3	130
4	155.9
5	167.22
6	159.51
% RSD	8.78
Critério de Aceitação	%RSD ≤ 10
Conformidade	Cumpre

Tabela 42: Resultados de repetibilidade para DMA

Injeção	Área
1	244.65
2	219.54
3	228.98
4	232.35
5	222.15
6	233.76
% RSD	3.91
Critério de Aceitação	%RSD ≤ 10
Conformidade	Cumpre

Com base nos resultados obtidos, verificou-se que o critério de aceitação estabelecido no protocolo de validação foi cumprido. Dessa forma, pode concluir-se que a repetibilidade do método analítico para EtOH, ACN e DMA foi comprovada.

5.3.6. Exatidão

As diretrizes do ICH referem que a validação da exatidão deve ser feita através de três níveis e três injeções de cada. A exatidão do método para o Etanol, ACN e DMA foi avaliada através da prova de conceito com um nível e uma injeção de uma amostra 6-[¹⁸F]FDOPA contaminada com os solventes em análise (etanol, ACN e DMA). Os resultados são apresentados na Tabela 43, 44 e 45.

Tabela 43: Resultados de exatidão para o etanol

Preparação	Área de amostras contaminadas	Conc. Teórica	Média Área Precisão	Conc. Obtida ⁽¹⁾	Recuperação ⁽²⁾
I	493,48	2500	1227,15	2011	80
Critério de Aceitação					100 ± 30
Conformidade					Passa

Legenda: Conc- concentração;

Tabela 44: Resultados de exatidão para o ACN

Preparação	Área de amostras contaminadas	Conc. Teórica	Média Área Precisão	Conc. Obtida ⁽¹⁾	Recuperação ⁽²⁾
I	98,82	205	151,93	261	127
Critério de Aceitação					100 ± 30
Conformidade					Passa

Legenda: Conc. – concentração.

Tabela 45: Resultados de exatidão para o DMA

Preparação	Área de amostras contaminadas	Conc. Teórica	Média Área Precisão	Conc. Obtida ⁽¹⁾	Recuperação ⁽²⁾
I	127,12	545	230,24	602	110
Critério de Aceitação					100 ± 30
Conformidade					Passa

Legenda: Conc. – concentração.

$$(1) (A_{\text{obtida}} \times C_{\text{precisão}}) / A_{\text{precisão}}$$

$$(2) C_{\text{obtida}} / C_{\text{teórica}} \times 100$$

A prova de conceito realizada evidencia que método analítico é exato, embora tivessem de ser realizadas mais injeções para o nível de contaminação em estudo e, também, estudados outros níveis de contaminação.

6. Conclusões

Em conclusão, a validação destes métodos analíticos HPLC e GC é muito importante para garantir a qualidade do radiofármaco 6-[¹⁸F]FDOPA. Através de uma série de ensaios com critérios de aceitação bem estabelecidos, foi possível verificar que ambos os métodos são apropriados para o fim a que se destinam, ou seja, a determinação precisa e confiável dos componentes e impurezas no radiofármaco.

No método HPLC, após algumas otimizações, como a troca da coluna cromatográfica e ajustes na fase móvel o método demonstrou ter a melhor capacidade de separação entre os picos de cloreto de estanho e 6-hidroxiclofenil-L-DOPA, com uma resolução de 1,6. Isso evidencia a seletividade apresentada pelo método para cloreto de estanho, levodopa, 6-hidroxiclofenil-L-DOPA e 6-Fluoro-L-DOPA, garantindo que não havia interferência significativa entre o branco e cada um dos picos de interesse. Os limites de detecção e quantificação para cada um dos componentes foram estabelecidos em níveis que nos permitem detetar e quantificar cada um dos compostos em análise. Além disso, a linearidade foi comprovada para cada componente, tendo o método apresentado uma relação linear entre a concentração do analito e a resposta em toda a faixa de trabalho, quer para o detetor UV-Vis quer com o detetor de atividade. A precisão e a repetibilidade do método foram demonstradas com base na %RSD das áreas dos picos.

No método GC, também foi demonstrada a seletividade adequada e os limites de detecção e quantificação atenderam aos requisitos estabelecidos. A linearidade foi comprovada para o etanol, acetonitrilo e dimetilacetamida, e a repetibilidade do método foi verificada com base na %RSD das áreas dos picos que foram 9%, 9% e 4%, respetivamente, valores estes inferiores a 10%, critério de aceitação previamente estabelecido. Para a exatidão, foi realizada uma prova de conceito que mostra que o método é exato, embora mais estudos fossem necessários.

Portanto, a validação completa destes métodos analíticos assegura a identidade e qualidade do radiofármaco 6-[¹⁸F]FDOPA, demonstrando que está de acordo com as diretrizes estabelecidas e que é seguro para ser usado em procedimentos médicos. Essa validação desempenha um papel fundamental na proteção da saúde pública e ao garantir que os doentes recebem tratamentos seguros e eficazes.

7. Bibliografia

- (1) Coimbra U. Repositório de Regulamentos Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde [Internet]. Available from: <https://www.uc.pt/icnas/sobre-o-icnas/>
- (2) Coimbra U de. ICNAS Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde [Internet]. Available from: <https://www.uc.pt/icnas/icnaspharma/?q=icnas%20p>
- (3) Coimbra U De. ICNAS Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde, Equipa [Internet]. Available from: <https://www.uc.pt/icnas/sobre-o-icnas/equipa/>
- (4) Coimbra U De. ICNAS Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde [Internet]. Available from: <https://www.uc.pt/icnas/icnaspharma/apresentacao/?q=icnas%20p>
- (5) Coimbra U. Repositório de Regulamentos Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde [Internet]. Available from: <https://www.uc.pt/regulamentos/uo/ui/icnas>
- (6) **CRİŞAN G, MOLDOVEAN-CIOROIANU NS, TIMARU DG, ANDRIEŞ G, CĂINAP C, CHIŞ V.** Radiopharmaceuticals for PET and SPECT Imaging: A Literature Review over the Last Decade. *Int J Mol Sci.* 2022 Apr 30;23(9):5023. doi: 10.3390/ijms23095023. PMID: 35563414; PMCID: PMC9103893.
- (7) RadiologyInfo.org for patients, PET/CT [Internet]. Available from: https://www.radiologyinfo.org/en/info/pet#part_nine
- (8) Saúde A-Z: Doenças, Sintomas e Tratamentos, PET [Internet]. Available from: <https://www.cuf.pt/saude-a-z/pet>
- (9) **MARTÍNEZ, M. J.; ZIEGLER, S. I.; BEYER, T.** - PET and PET/CT: basic principles and instrumentation. ISBN 9786021018187.
- (10) **GUHLKE, S., VERBRUGGEN, A.M., VALLABHAJOSULA, S. (2007).** Radiochemistry and Radiopharmacy. In: Biersack, HJ., Freeman, L.M. (eds) *Clinical Nuclear Medicine*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-28026-2_2
- (11) **MOSSINE, Andrew V. et al.** - One-pot synthesis of high molar activity 6-[18F]fluoro-L-DOPA by Cu-mediated fluorination of a BPin precursor. *Organic and Biomolecular Chemistry.* . ISSN 14770520. 17:38 (2019) 8701–8705. doi: 10.1039/c9ob01758e.
- (12) **JIANG, Huailei; JAIN, Manoj K.; CAI, Hancheng** - HPLC-free and cassette-based nucleophilic production of [18F]FDOPA for clinical use. *American journal of nuclear medicine and molecular imaging.* . ISSN 2160-8407. 11:4 (2021) 290–299.

- (13) **NEVES, Ângela C. B. et al.** - Advances in the automated synthesis of 6-[18F]Fluoro-L-DOPA. *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry*. ISSN 2365421X. 6:1 (2021). doi: 10.1186/s41181-021-00126-z.
- (14) **IBA. RADIO PHARMA SOLUTIONS.** Synthera® + Platform. Available from: <https://www.iba-radiopharmasolutions.com/synthera-family>
- (15) **TRASIS. PET TRACER SYNTHESIZER,** AllInOne. Available from: <https://www.trasis.com/en/product/allinone/>
- (16) **PIMENTA, Adriana M.** - Controlo de Formulações Farmacêuticas baseado em Sistemas de Exactidão aferida. 2003).
- (17) **PROVIS, Apontamentos; CURRICULAR,** Unidade - Instituto politécnico de lisboa instituto superior de engenharia de lisboa. 2007).
- (18) **GILLINGS, Nic et al.** - Guideline on current good radiopharmacy practice (cGRPP) for the small-scale preparation of radiopharmaceuticals. *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry*. ISSN 2365421X. 6:1 (2021). doi: 10.1186/s41181-021-00123-2.
- (19) **BHARDWAJA, Santosh Kumar; DWIVEDIA, K.; AGARWAL, D. D. - A Review: GC Method Development and validation** Santosh. *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 6:1 (2016) 1–7.
- (20) **GILLINGS, Nic et al.** - EANM guideline on the validation of analytical methods for radiopharmaceuticals. *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry*. ISSN 2365421X. 5:1 (2020). doi: 10.1186/s41181-019-0086-z.
- (21) **STEFANINI-ORESIC, L.** - Validation of analytical procedures: ICH guidelines Q2(R2). *Farmaceutski Glasnik*. ISSN 00148202. 2:0 (2022) 1–34.
- (22) **RAO, TENTU NAGESWARA.** ‘Validation of Analytical Methods’. *Calibration and Validation of Analytical Methods - A Sampling of Current Approaches*, InTech, Apr. 2018. Crossref, doi:10.5772/intechopen.72087.
- (23) **PATEL, Miral et al.** - A Review: Development and validation of HPLC method Citation. *J Pharm Sci Bioscientific Res*. 2019. ISSN 2271-3681. 9:3 (2019) 173–182.
- (24) *Chemistry Views. What is HPLC?* Available from: https://www.chemistryviews.org/details/education/9464911/What_is_HPLC/
- (25) **SABIR, Azim Md; MOLOY, Mitra; BHASIN, Parminder S.** - Hplc Method Development and Validation: a Review. *International Research Journal of Pharmacy*. 4:4 (2016) 39–46. doi: 10.7897/2230-8407.04407.

- (26) **SHIMADZU** Excellence in Science. What is HPLC (High Performance Liquid Chromatography)? Available from: https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/what_is_hplc.html#l
- (27) **BHARDWAJA, Santosh Kumar; DWIVEDIA, K.; AGARWAL, D. D. - A Review: GC** Method Development and validation Santosh. International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry. 6:1 (2016) 1–7.
- (28) Agilent. Gas Chromatography Fundamentals. Available from: <https://www.agilent.com/en/product/gas-chromatography/what-is-gas-chromatography>
- (29) **A. B. LITTLEWOOD.** Gas Chromatography: Principles, Techniques, and Applications. Available from: <https://books.google.pt/books?id=DiYSBQAAQBAJ&lpg=PPI&ots=yRi9nymzdb&dq=gas%20chromatography%20principle&lr&hl=pt-PT&pg=PA3#v=onepage&q=gas%20chromatography%20principle&f=false>
- (30) **FLUORODOPA (18F) (PREPARED BY ELECTROPHILIC SUBSTITUTION) INJECTION** Fluorodopae (18F) ab electrophila substitutione solutio iniectionis - d ([s.d.]) 3–5.
- (31) **EUROPEAN PHARMACOPOEIA** - Flumazenili (N-[C] methyl) solutio iniectionis FLUORODOPA (18F) (PREPARED BY ELECTROPHILIC SUBSTITUTION) INJECTION Fluorodopae (18F) ab electrophila substitutione solutio iniectionis. European Pharmacopoeia. I (2008) 5–6.