

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Heliana Martins Pereira

**ETAPA BIOANALÍTICA DE ESTUDOS DE BD/BE: UM NOVO OLHAR DA
GARANTIA DA QUALIDADE EM BUSCA DA QUALIDADE TOTAL.**

Rio de Janeiro

2014

Heliana Martins Pereira

**ETAPA BIOANALÍTICA DE ESTUDOS DE BD/BE: UM NOVO OLHAR DA
GARANTIA DA QUALIDADE EM BUSCA DA QUALIDADE TOTAL.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária.

Orientador: Fábio Coelho Amendoeira

Rio de Janeiro
2014

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Pereira, Heliana Martins

Etapa bioanalítica de estudos de BD/BE: um novo olhar da garantia da qualidade em busca da qualidade total / Heliana Martins Pereira. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2014.

98 f.: il.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2014.

Orientadores: Fábio Coelho Amendoeira

1. Medicamentos Genéricos. 2. Equivalência Terapêutica. 3. Controle de Qualidade. 4. Vigilância Sanitária. I Título

Heliana Martins Pereira

**ETAPA BIOANALÍTICA DE ESTUDOS DE BD/BE: UM NOVO OLHAR DA
GARANTIA DA QUALIDADE EM BUSCA DA QUALIDADE TOTAL.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária.

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira (Pós-Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - FIOCRUZ

Marlice Aparecida Sipoli Marques (Pós-Doutora)
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Jorge Carlos Santos da Costa (Doutor)
Presidência - FIOCRUZ

Fábio Coelho Amendoeira (Doutor) - Orientador
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – FIOCRUZ

Dedico este trabalho ao Mestre e Doutor da vida, Jesus Cristo, o autor da minha fé.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, a quem pertence tudo o que sou e tenho. Quem tornou possível todas as coisas. À Ele toda honra e glória para sempre.

Aos meus pais, pelo apoio material e espiritual, tendo um papel fundamental na minha formação, financiando meus estudos e apoiando minha carreira. Com toda oração e súplica, me tornaram o que eu sou hoje. Família é porto seguro e bênção de Deus.

À minha irmã e sobrinha querida, Juliana e Luana, pelo amor em família, que nos torna sempre fortes.

Ao meu orientador, Fábio Coelho Amendoeira, por toda a dedicação e incentivo, fundamentais para a realização deste trabalho. Suas palavras sempre me davam confiança: "... Eu sei que você consegue!".

Aos doutores da minha banca avaliadora, Jorge Costa, Marlice Marques e Ana Cristina, por todas as correções e acompanhamento do projeto, fundamentais para um trabalho final de qualidade.

Aos professores e demais profissionais do INCQS, pela convivência amistosa e pelo aprendizado, na pessoa da coordenadora Dra. Kátia Christina Leandro.

Aos profissionais e amigos do LAB-SEFAR, objeto deste trabalho, onde pude aprender e evoluir durante esses anos de muito trabalho, mas também de grandes alegrias. À minha equipe de Qualidade, hoje representada por Ana Paula, Aline, Tatiane e Valéria e também as que já passaram por lá e contribuíram com este trabalho, obrigada por todo o apoio, meninas, vocês são demais. A construção deste trabalho não seria possível sem vocês! À equipe de analistas, técnicos e do administrativo, obrigada por todo o incentivo. Em especial ao analista Diego, que sempre torceu muito por mim, obrigada pela sua amizade. E à analista Viviane, que participou da etapa de desenvolvimento do método, essencial para o estudo. Ninguém trabalha sozinho e o mérito deste trabalho é de todo o SEFAR!

À minha chefe e amiga, Laís Bastos da Fonseca, por toda a compreensão e abdicação de horas do meu trabalho para as disciplinas e desenvolvimento do projeto, que permitiram eu concluir esta etapa. A que me ouvia todos os dias, obrigada pelo seu apoio e amizade.

Aos membros e pastores da Igreja Evangélica Congregacional do Encantado, por todas as orações e apoio em todas as fases de minha vida, me fornecendo o suporte espiritual necessário para a caminhada.

Aos amigos, que tornam a nossa vida mais leve e torcem pela nossa vitória, os quais destaco os que me acompanharam de perto na realização deste trabalho durante os quatro anos: Carol e Samir, Jorge e Dayane, Paulo e Karen, Wanessa, Clarinha, Carol Guedes, Sandro e Ana Carolina, Elaine, Ana Paula e Celinha. Obrigada por serem amigos tão especiais!

Aos meus amores, Douglas e Luiza, esposo e filha maravilhosa. Por quem vale a pena todo esforço para se tornar uma pessoa melhor e a quem dedico essa tese com toda a minha gratidão. Amo vocês!

“Os olhos enxergam mais belezas quando pertencem a uma pessoa de coração grato.”

Sérgio A. Rosa

“A qualidade nunca é um acidente, é sempre o resultado da intenção elevada, esforço sincero, direção inteligente e execução hábil. Ela representa a sábia escolha de muitas alternativas.”

Abigail Van Buren

RESUMO

Para que um medicamento possa ser registrado como genérico ou para obter seu registro como similar no Brasil é necessária a execução de uma série de testes bioanalíticos regulamentados por legislações e resoluções do Ministério da Saúde. Estes ensaios são chamados de estudos de bioequivalência/biodisponibilidade relativa (BD/BE) e só podem ser realizados por centros de pesquisa devidamente habilitados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Ministério da Saúde (ANVISA/MS). Os estudos de BD/BE são realizados em seres humanos e devem assegurar a identidade dos produtos em relação à velocidade da absorção e quantidade do fármaco absorvido. De relevância considerável para a saúde pública e de interesses sócio-econômicos, torna-se importante criar mecanismos e ferramentas que possam dar garantias de que os medicamentos a serem lançados no mercado apresentem as mesmas características e propriedades físico-químicas que o medicamento reconhecido como de referência. Sendo assim, faz-se necessário o desenvolvimento de metodologias seguras e dinâmicas de avaliação da garantia da qualidade e dos processos referentes aos estudos realizados. Neste contexto, este trabalho tem como objetivo apresentar uma nova abordagem da garantia da qualidade, referente à etapa bioanalítica de estudos de BD/BE, com enfoque na Qualidade Total, utilizando o estudo de Levodopa + benserazida como piloto. A proposta é de uma avaliação da qualidade que não se limita às avaliações descritas nas normas e legislações específicas, mas avaliar a qualidade do todo. Nosso trabalho demonstrou um modelo de Sistema de Gestão, que proporcionou o aumento da qualidade dos estudos realizados, diminuindo a visão dicotomista entre Qualidade e Laboratório e, conseqüentemente, a comercialização dos medicamentos genéricos com qualidade assegurada, após avaliação pelo estudo de BD/BE.

ABSTRACT

For a drug to be registered as generic or to obtain its registration as similar medication in Brazil, a series of bioanalytical tests regulated by laws and resolutions of the Ministry of Health are required. These tests are called bioequivalence studies / relative bioavailability (BE/BA) and can only be carried out by research centers accredited by the National Health Surveillance Agency - Ministry of Health (ANVISA / MS). Studies BE/BA are performed in humans and should ensure the identity of the products relative to the rate of absorption and amount of drug absorbed. Of considerable relevance to public health and socio-economic interests, it is important to create mechanisms and tools that can provide assurance that the drugs to be launched in the market have the same characteristics and physicochemical properties of the drug known as a reference. Therefore, it is necessary to develop secure, dynamic assessment methodologies and quality assurance processes related to the studies performed. In this context, the present work aims to present a new approach to quality assurance regarding the bioanalytical phase of studies BE/BA, with a focus on Total Quality Control, using the study of levodopa + benserazide as a pilot study. The proposal is of a quality assessment that is not limited to the assessments described in the specific rules and laws, but to evaluate the quality of the whole. Our study demonstrated a model management system, which provided the increase in the quality of studies, reducing the dichotomous view between Quality and Laboratory and hence the marketing of generic drugs with assured quality, after evaluation by the study BE/BA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Número de registros de medicamentos genéricos no Brasil, por país de origem.....	18
Figura 2	Distribuição da doença de Parkinson por dezenas de idade.....	22
Figura 3	Prevalência da doença de Parkinson por sexo.....	23
Figura 4	Apresentação do ciclo PDCA.....	28

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANVISA/MS	Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Ministério da Saúde
ASC_{0-t}	Área sob a curva
BD/BE	Biodisponibilidade Relativa/Bioequivalência
BPC	Boas Práticas Clínicas
BPL	Boas Práticas de Laboratório
CQ	Controle de Qualidade
CCQ	Círculos de Controle da Qualidade
CLAE-EM/EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, acoplada a espectrômetro de massas
C_{max}	Concentração máxima obtida
DCB	Denominação Comum Brasileira
DOPAC	Ácido dihidroxifenilacético
FDA	Food and Drug Administration
GQ	Garantia da Qualidade
HVA	Ácido homovanílico
K_{el}	Constante de eliminação
LAB-SEFAR	Laboratório de Farmacocinética
LIQ	Limite inferior de quantificação
MS	Ministério da Saúde
NCM	Nomenclatura Comum do Mercosul
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORPC	Organizações Representativas para Pesquisa Clínica
PDCA	Ferramenta de gestão, também conhecida como Ciclo de Deming ou Shewart
PNC	Preço do não cumprimento
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução
SGQ	Sistema de Gestão da Qualidade
T_{max}	Tempo de coleta correspondente a maior concentração obtida
$T_{1/2}$	Tempo de meia vida de eliminação

TQC

Total Quality Control

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO:	15
1.1	MEDICAMENTOS GENÉRICOS: PANORAMA HISTÓRICO E LEGISLAÇÃO.....	15
1.2	BIOEQUIVALÊNCIA/BIODISPONIBILIDADE RELATIVA	17
1.3	MEDICAMENTO DO ESTUDO	21
1.4	DOENÇA DE PARKINSON	22
1.5	GESTÃO DA QUALIDADE	23
1.6	CONTROLE DA QUALIDADE TOTAL – TQC	26
1.7	GARANTIA DA QUALIDADE X CONTROLE DA QUALIDADE.....	29
2	OBJETIVOS:	30
2.1	OBJETIVO GERAL:.....	30
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	30
2.2.1	Desenvolver, definir e validar as metodologias bioanalíticas de Levodopa e 3-O-Metildopa, para a quantificação das amostras constituintes do estudo;	30
2.2.2	Analisar as amostras de plasma de voluntários provenientes da etapa clínica do estudo, segundo os métodos bioanalíticos validados, para a geração dos valores de concentração plasmática de levodopa e 3-O-Metildopa de cada voluntário para cada fase (medicamento teste <i>versus</i> medicamento referência).	30
2.2.3	Avaliar os resultados obtidos do medicamento analisado durante as etapas de preparação, extração e análise das amostras do estudo;	30
2.2.4	Estabelecer os requisitos necessários para a implementação, manutenção e melhoria contínua do sistema de garantia da qualidade em busca da qualidade total.....	30
2.2.5	Desenvolver métodos de controle para a condução de estudos de BD/BE, utilizando o estudo de Levodopa + Benserazida como piloto;.....	30
2.2.6	Avaliar os dados constituintes do estudo de BD/BE com os métodos desenvolvidos, a partir da distribuição da qualidade em seis núcleos de atividade; .	30
2.2.7	Apresentar os indicadores da qualidade desenvolvidos para o estudo de BD/BE.....	30
3	RESULTADOS	31
3.1	ARTIGO 1: "DETERMINATION OF LEVODOPA IN HUMAN PLASMA BY LIQUID CHROMATOGRAPHY–TANDEM MASS SPECTROMETRY (LC–MS/MS): APPLICATION TO A BIOEQUIVALENCE STUDY " – QUÍM. NOVA VOL.36 NO.1 SÃO PAULO 2013.....	31
3.2	ARTIGO 2: "DEVELOPMENT OF A HPLC/MS/MS METHOD FOR DETERMINATION OF 3-O-METHYLDOPA IN HUMAN PLASMA AND ITS APPLICATION IN A BIOEQUIVALENCE STUDY" - REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ (NO PRELO).....	40
3.3	ARTIGO 3:.....	61
3.4	INDICADORES DA QUALIDADE	74

3.4.1	Resultados relativos a clientes e mercado	74
3.4.2	Resultados econômico-financeiros para a Instituição	74
3.4.3	Resultados relativos às pessoas – Recursos Humanos.....	74
3.4.4	Resultados relativos aos fornecedores	75
3.4.5	Resultados dos processos relativos aos estudos/projetos	75
3.4.6	Resultados relativos à sociedade – Responsabilidade Social.....	75
4	DISCUSSÃO	77
5	CONCLUSÃO:.....	83
	REFERÊNCIAS.....	84
	ANEXO A	89
	ANEXO B	92
	ANEXO C	93
	APÊNDICE A.....	94

1 INTRODUÇÃO:

1.1 MEDICAMENTOS GENÉRICOS: PANORAMA HISTÓRICO E LEGISLAÇÃO

A indústria de genéricos teve origem na década de 60, por iniciativa do governo dos Estados Unidos. Mas foi em 1984 que os norte-americanos estabeleceram os critérios que viriam a ser adotados internacionalmente para o registro deste tipo de medicamento. O objetivo do governo dos EUA, ao criar os genéricos, foi buscar uma alternativa legal para reduzir os custos dos tratamentos de saúde e ampliar o acesso da população aos medicamentos. Por serem cópias de patentes expiradas e não arcarem com os custos de pesquisa e desenvolvimento, os genéricos se mostraram, desde o primeiro momento, efetivamente mais baratos que os medicamentos de referência.¹

No Brasil, o reconhecimento de que a utilização das denominações genéricas constitui um dos mecanismos de regulação de preços dos medicamentos levou, em 1993, à adoção dos medicamentos genéricos como política do setor de saúde e de economia do governo brasileiro. A partir de então, tornou-se obrigatório o uso da Denominação Comum Brasileira (DCB) para todos os medicamentos e da Nomenclatura Comum do Mercosul (NCM) no caso da importação de produtos e insumos farmacêuticos. O programa de medicamentos genéricos, criado no Brasil em 10 de fevereiro de 1999 com a promulgação da Lei 9787, se deu três anos após o país voltar a respeitar o direito de patentes, em 1996, sendo o marco da efetiva implementação da política.²

Logo após o lançamento do Programa Nacional de Política de Medicamentos houve a criação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da Lei nº 9782 de 26 de janeiro de 1999. A Agência foi criada em nível federal como uma autarquia, sob regime especial, vinculada ao Ministério da Saúde (MS) e tem como missão “Proteger e promover a saúde da população garantindo a segurança sanitária de produtos, serviços e participando da construção de seu acesso”.³ Segundo a Política Nacional de Medicamentos, a criação da ANVISA representa o início de implementação desta política, e busca garantir condições para a segurança e qualidade dos medicamentos consumidos no país.⁴

Para garantir o acesso da população a medicamentos seguros, eficazes e de qualidade torna-se evidente a necessidade de aumentar a oferta de medicamentos, a fim de minimizar o domínio da produção por parte das empresas multinacionais, contribuindo, principalmente, para a queda de preços, a partir da concorrência de mercado, favorecendo assim, o acesso por parte da população menos favorecida. Com a introdução dos medicamentos genéricos no mercado, houve também uma preocupação com a garantia da intercambialidade desses produtos com o produto inovador, ou seja, a possibilidade de substituição de um medicamento de referência por outro equivalente terapêutico. Sendo assim, fez-se necessário comprovar e comparar a qualidade, eficácia e segurança dos medicamentos genéricos com os produtos inovadores.⁴

A primeira resolução publicada sobre o tema foi a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC 391, de 9 de agosto de 1999, que aprovou o Regulamento técnico para medicamentos genéricos. Esse regulamento apresentou critérios e condições para o registro e o controle de qualidade desses medicamentos, para provas de biodisponibilidade de medicamentos em geral, provas de bioequivalência de medicamentos genéricos, bem como para a prescrição e a dispensação dos mesmos. Também foram apresentados os mesmos conceitos da Lei dos Genéricos, acrescentados os conceitos de equivalente farmacêutico, alternativa farmacêutica, medicamento bioequivalente e inovador. Cerca de 1 ano e meio após sua publicação, a Resolução - RE 391 foi revisada, sendo revogada pela RDC 10, de 2 de janeiro de 2001.^{5, 6} Em 19 de março de 2002, foi publicada a RDC 84, que revogou a RDC 10. O Regulamento técnico para medicamentos genéricos descrito na RDC 84 determinou as medidas antecedentes ao seu registro, bem como os aspectos legais e técnicos, as medidas pós-registro e os critérios para prescrição e dispensação dos medicamentos genéricos. Foram citados, ainda, os casos onde há exigência de novos ensaios de bioequivalência, sendo reapresentada a lista dos medicamentos não aceitos como genéricos. A RDC 84 foi revogada pela RDC 135, de 29 de maio de 2003. Em 2 de março de 2007 foi aprovada a RDC 16, revogando-se a RDC 135. Sua inovação foi a permissão para que os contraceptivos orais e os hormônios endógenos de uso oral fossem registrados como genéricos.^{7,8,9}

Em 28 de abril de 2000, foi publicada a Resolução - RDC nº 41, considerando a necessidade de serem estabelecidos critérios mínimos para aceitação de unidades

que realizam ensaios de equivalência farmacêutica, biodisponibilidade e bioequivalência em medicamentos. Foi nesse momento que a Anvisa começou a habilitar unidades interessadas em realizar os testes para Medicamentos Genéricos. As Auditorias iniciaram no início do ano 2000. A ANVISA habilitou um total de 20 Centros de Bioequivalência. Porém, em 2003 observou-se a necessidade de se criar regras mais rígidas para garantir a qualidade dos ensaios analíticos nos centros de equivalência e bioequivalência relativa e, para tanto, foi publicada a Resolução – RDC nº 103, de 08 de maio de 2003, que regulamenta os procedimentos a serem observados pelos Centros nacionais e internacionais interessados em realizar ensaios de Biodisponibilidade / Bioequivalência (BD/BE) para fins de registro de medicamentos e trata da certificação de boas práticas em biodisponibilidade / bioequivalência de medicamentos. A partir deste período, os estudos de BD/BE só poderiam ser aceitos para o registro de medicamentos se realizados em Centros certificados pela ANVISA.¹⁰

O ANEXO A relaciona as legislações referentes aos medicamentos genéricos publicadas pela ANVISA no período de 1999 a 2010, em ordem cronológica, de forma a permitir a visualização das resoluções revogadas e das que estão em vigor até o período citado.

1.2 BIOEQUIVALÊNCIA/BIODISPONIBILIDADE RELATIVA

Para que um medicamento possa ser registrado como genérico ou para obter seu registro como similar no Brasil é necessária a execução de uma série de testes analíticos regulamentados por legislações e resoluções do Ministério da Saúde. Estes ensaios só podem ser realizados por centros de pesquisa devidamente habilitados pela ANVISA/MS). Um dos testes mais importantes é o estudo de biodisponibilidade relativa / bioequivalência, onde são comparados dois medicamentos de mesma forma farmacêutica e composição química, sendo um destes o medicamento de referência, também conhecido como inovador, utilizado como comparador e o outro medicamento chamado de teste, que corresponderá àquele medicamento objeto da investigação farmacêutica para estabelecimento de sua intercambialidade. Na figura 1, observamos o número de registros de medicamentos genéricos no Brasil, por país de origem.

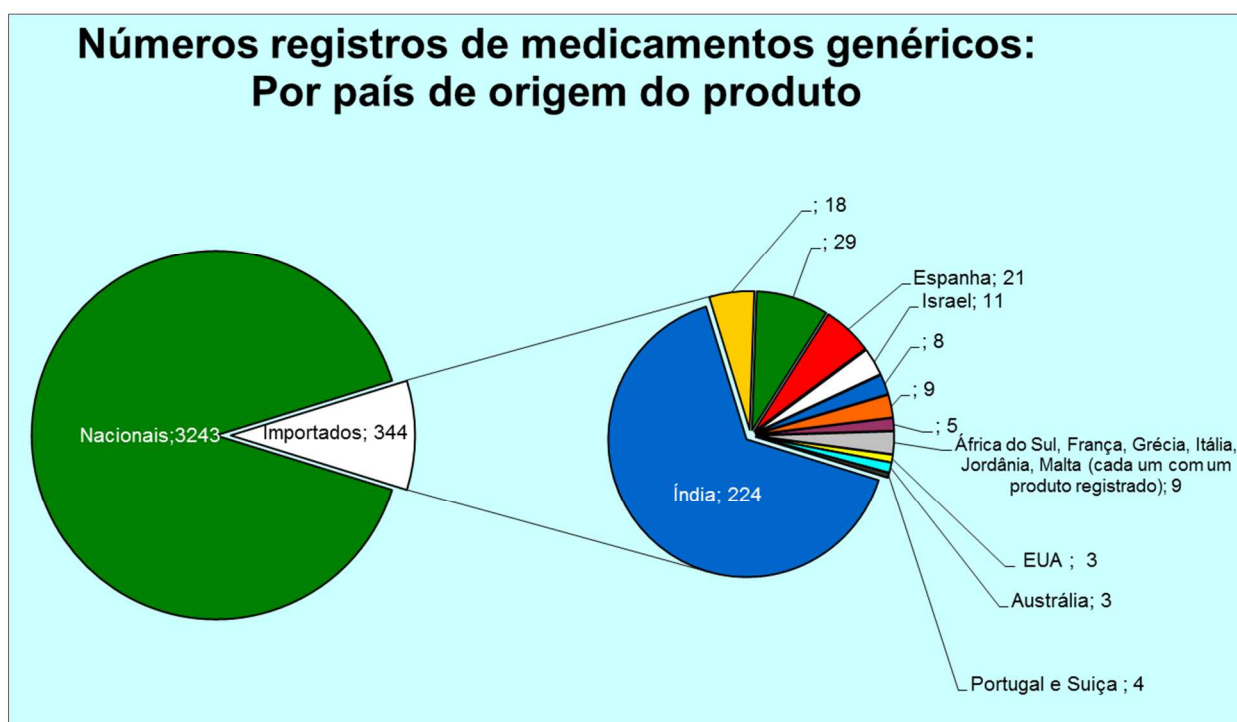
A Organização Mundial da Saúde (OMS) define biodisponibilidade como sendo a velocidade e a extensão de absorção de um fármaco em uma forma de dosagem, a

partir de sua curva concentração/tempo na circulação sistêmica ou sua excreção na urina; a mesma definição é adotada pela ANVISA.¹¹

Considerando-se que a quantidade do fármaco contida no fluido biológico está em equilíbrio com o sítio de ação, a biodisponibilidade é determinada por meio da medida da concentração do princípio ativo da droga em sangue total, soro ou outro fluido biológico apropriado, em função do tempo.

Segundo o Food and Drug Administration (FDA) (2002), bioequivalência é a ausência de diferença significativa na velocidade e extensão pelas quais o fármaco presente em equivalentes ou alternativas farmacêuticas torna-se disponível no sítio de ação quando administrado na mesma dose molar e nas mesmas condições, em ensaio apropriadamente planejado.¹²

Figura 1 – Número de registros de medicamentos genéricos no Brasil, por país de origem.



Fonte: ANVISA

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Medicamentos/Assunto+de+Interesse/Medicamentos+genericos/Medicamento+Generico>

No Brasil, a ANVISA define bioequivalência como sendo a demonstração de equivalência farmacêutica entre produtos apresentados sob a mesma forma farmacêutica, contendo idêntica composição qualitativa e quantitativa de princípios ativos, e que tenham comparável biodisponibilidade, quando estudados sob um mesmo desenho experimental.¹³

Um estudo de bioequivalência tem por objetivo comparar as biodisponibilidades de duas ou mais formulações de um mesmo fármaco, considerados equivalentes farmacêuticos e que tenham sido administrados na mesma dose molar de maneira que as formulações possam ser consideradas intercambiáveis. Em farmacologia o termo intercambialidade indica a possibilidade de substituição de um medicamento por outro equivalente terapêutico receitado pelo prescritor.¹³

Os estudos de BD/BE são realizados em voluntários sadios e devem assegurar a identidade dos produtos (teste e referência) em relação à velocidade da absorção e quantidade do fármaco absorvido. Segundo a resolução - RE nº 1.170, de 19 de abril de 2006 - GUIA PARA PROVAS DE BIODISPONIBILIDADE RELATIVA/BIOEQUIVALÊNCIA DE MEDICAMENTOS, o estudo de bioequivalência se desenvolve em três etapas: Clínica, Analítica e Estatística.¹⁴ A etapa clínica compreende o recrutamento e a seleção de voluntários, a administração dos medicamentos e a coleta de amostras para análises referentes ao estudo e de monitoramento clínico dos voluntários durante as etapas pré e pós-estudo. A etapa analítica compreende a análise das amostras coletadas na etapa clínica com a quantificação do fármaco inalterado e/ou seu metabólito ativo estudado, utilizando para isso métodos bioanalíticos validados, desenvolvidos no laboratório ou obtidos de compêndios e literatura adequada, conforme a legislação e normatização vigente. A etapa estatística compreende a análise dos dados obtidos na etapa analítica com o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos como ASC_{0-t} (Área sob a curva), C_{max} (concentração máxima obtida), T_{max} (tempo de coleta correspondente a maior concentração obtida) além dos demais parâmetros como $T_{1/2}$ (tempo de meia vida de eliminação), K_{el} (constante de eliminação), a avaliação da bioequivalência e biodisponibilidade, por intermédio de intervalos de confiança e testes de hipóteses, utilizando-se para isso ferramentas como planilhas e softwares devidamente validados. Todas as atividades realizadas nas três etapas devem apresentar

ferramentas de comprovação da rastreabilidade, de forma a permitir a recuperação segura e confiável dos dados do estudo.¹⁵

Com a publicação da RDC nº 56, de 8 de outubro de 2014, revogando a RDC nº 103, de 08 de maio de 2003, a certificação dos centros será concedida para duas etapas apenas, a etapa clínica (que compreenderá adicionalmente a etapa estatística) e a etapa analítica, chamada a partir desta resolução, de etapa bioanalítica.¹⁶

Neste estudo foi dada a ênfase na etapa bioanalítica, onde o fármaco e seu metabólito ativo serão identificados e quantificados a partir de amostras biológicas, devendo assim, ser realizado de forma unívoca e sequencial, sem deixar dúvidas sobre os resultados analíticos obtidos. Durante o planejamento da etapa analítica, serão estabelecidos o analito e o metabólito a serem quantificados, a matriz biológica utilizada e o método analítico adequado. O método de quantificação deverá ser específico para analito e metabólito, sendo exato e relativamente simples, de modo a minimizar desvios e erros sistemáticos durante as análises. Toda a metodologia deve estar devidamente validada antes da realização do estudo, apresentando todos os parâmetros de validação e de estabilidade previamente definidos.^{17, 18}

O tema validação de metodologia analítica foi introduzido na legislação brasileira a partir dos medicamentos genéricos, com a publicação da Resolução (RE) nº 391 de agosto de 1999, que aprovou o regulamento técnico para medicamentos genéricos, determinando validação dos métodos analíticos e do processo de fabricação, como critérios a serem seguidos para o registro e o controle da qualidade dos medicamentos genéricos. Conforme a publicação da resolução nº 899 de 29 de maio de 2003, deve ser realizada validação total antes da implementação de um método bioanalítico para a quantificação de um fármaco e/ou metabólitos.¹⁹ A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Portanto os estudos de validação viabilizam o desenvolvimento de novos processos, ainda não relacionados nas normas escritas dos compêndios oficiais, como as duas metodologias bioanalíticas propostas pelo presente estudo, favorecendo a pesquisa de novas tecnologias e assegurando a qualidade das mesmas.

A resolução - RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012, dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos e revoga a Seção Métodos Bioanalíticos

da RE 899.²⁰ Atualmente, a validação é parte integrante do Sistema de Qualidade que visa atingir o nível de excelência, tornando-se assim uma das principais ferramentas da Garantia da Qualidade.

1.3 MEDICAMENTO DO ESTUDO

O medicamento analisado em nosso estudo foi a levodopa, um conhecido antiparkinsoniano, sob a forma farmacêutica comprimido simples, associada à benserazida. A biodisponibilidade comparativa de cada princípio ativo das formulações em seguida à administração oral foi avaliada com base em comparações estatísticas de parâmetros farmacocinéticos relevantes para o fármaco Levodopa e seu metabólito 3-O-Metildopa, obtidas das amostras de sangue a serem coletadas. O medicamento candidato à genérico é enviado pela indústria farmacêutica, patrocinadora do estudo, com a finalidade de testar a intercambialidade com o medicamento de referência por meio dos estudos de bioequivalência/biodisponibilidade.

A levodopa (L-3,4-diidroxifenilalanina) é utilizada para o tratamento da doença de Parkinson, sendo rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal por um sistema de transporte ativo. A maior parte da absorção ocorre no intestino delgado sendo que absorção é muito limitada no estômago. As concentrações plasmáticas máximas ocorrem dentro de 2 horas em doses orais e a taxa de ligação da levodopa às proteínas plasmáticas é de cerca de 10 a 30%. A levodopa é rapidamente descarboxilada pela enzima descarboxilase do ácido L-aminoácido aromático, principalmente no intestino, fígado e rim. A dopamina é metabolizada, por sua vez, em ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA) .

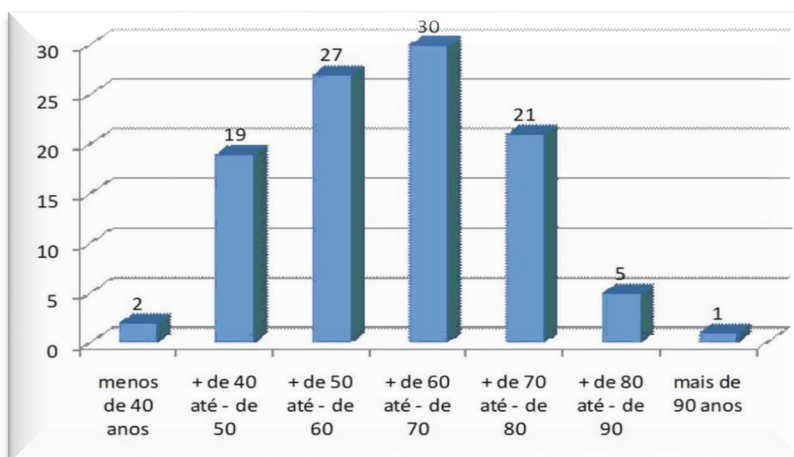
Outras vias do metabolismo incluem metilação, transaminação e oxidação, produzindo uma variedade de metabólitos menores, incluindo a noradrenalina e 3-O-metildopa, este último podendo acumular-se no sistema nervoso central (SNC), devido ao seu tempo de meia-vida elevado. Ao contrário da dopamina, a levodopa é transportada ativamente através da barreira hemato-encefálica, mas por causa da extensão da descarboxilação periférica, uma fração muito pequena estará disponível para entrar no Sistema Nervoso Central - SNC a menos que a mesma seja administrada com um inibidor da enzima catecol-O-metil-transferase.²¹

O fármaco Benserazida não será dosado uma vez que sua finalidade é apenas exercer esta função farmacológica de inibição da enzima catecol-O-metil-transferase de ação periférica. Esta ação reduz o metabolismo sistêmico da levodopa e aumenta seus níveis plasmáticos, o tempo de meia vida plasmática e a concentração de levodopa, proporcionando um aumento dos efeitos terapêuticos sobre a doença de Parkinson.²²

1.4 DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson é uma doença crônica e degenerativa do sistema nervoso central que acomete os gânglios da base. É caracterizada pela redução de dopamina na via nigro-estriatal, resultante da morte de neurônios da substância negra cerebral. É uma doença lentamente progressiva, pois afeta um em cada mil indivíduos acima de 65 anos e um em cada cem após os 75 anos. Embora a probabilidade de desenvolver a doença de Parkinson aumente conforme a idade, a maior

Figura 2 – Distribuição da doença de Parkinson por dezenas de idade.



Fonte: Site Parkinson'sCure.Org

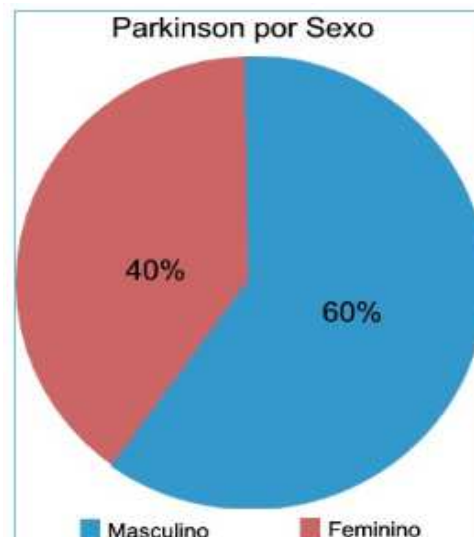
<http://www.parkinsoncure.org/pt/informacoes-epidemiologicas>

incidência dos casos se manifestará entre 50-70 anos. Entretanto, indivíduos com idade inferior a quarenta anos podem ser acometidos pela síndrome, comprometendo assim uma grande fatia da população em idade produtiva.²²

Há grande carência de informações epidemiológicas sobre o Mal de Parkinson. Em estudo realizado em 2009, foram coletados dados prestados pelos pacientes acometidos pela doença de Parkinson. Em termos de idade, temos informações prestadas por 105 parkinsonianos, onde das três medidas de tendência central utilizadas, a média, a moda e a mediana, correspondem à idade de 60 anos, universalmente aceita como a idade padrão para ocorrência do Mal de Parkinson. Agrupando estes dados por dezenas de idade, encontramos a distribuição apresentada na figura 2.

Quanto ao sexo, há uma significativa prevalência do sexo masculino, conforme apresentado na figura 3.

Figura 3: Prevalência da doença de Parkinson por sexo.



Fonte: Site Parkinson'sCure.Org
<http://www.parkinsoncure.org/pt/informacoes-epidemiologicas>

1.5 GESTÃO DA QUALIDADE

De relevância considerável para a saúde pública e de interesses sócio-econômicos, torna-se importante criar mecanismos e ferramentas que possam dar garantias de que os medicamentos a serem lançados no mercado apresentem as mesmas características e propriedades físico-químicas que o medicamento reconhecido como de referência. Sendo assim, faz-se necessário o desenvolvimento de metodologias seguras e dinâmicas de avaliação da garantia da qualidade e dos processos referentes aos estudos realizados. Torna-se evidente a necessidade de melhor entender a eficácia e segurança dos medicamentos, de modo a permitir uma avaliação crítica da qualidade dos métodos utilizados nos estudos e nos relatórios gerados, considerando as ações da vigilância sanitária de proteção à saúde da população, baseando-se nas legislações vigentes, bem como verificando se os parâmetros / limites estabelecidos estão sendo observados, para viabilizar o registro do medicamento na ANVISA.

As referências analíticas descrevem trabalhos relacionados ao desenvolvimento de metodologias analíticas e bioanalíticas para a indústria farmacêutica, referentes a estudos de bioequivalência e estabilidade analítica, utilizando-se métodos e equipamentos específicos, porém, observa-se de forma notória a ausência de trabalhos que apresentem modelos ou ferramentas de aplicação da garantia da qualidade sobre a etapa bioanalítica destes estudos, fato este de caráter imprescindível para que o estudo seja aceito pela ANVISA e atinja seu maior objetivo que é o registro e a disponibilização do medicamentos genérico para a população, não apenas por menor preço, mas com a qualidade assegurada por métodos e modelos rígidos de controle.

Para ABNT (2000), a qualidade é definida como “grau no qual um conjunto de características inerentes satisfaz um requisito”, ou seja, qualidade é o grau com que uma “propriedade diferenciadora” atende a uma “necessidade ou expectativa que é expressa, geralmente de forma implícita ou obrigatória”. Já a Gestão da Qualidade é definida como “atividades coordenadas para dirigir e controlar uma organização no que diz respeito à qualidade”.²³

A garantia da qualidade aplicada a estudos de BD/BE refere-se à qualidade em serviços. O conceito de qualidade em serviços é abordado por JURAN (1988) através de sua conhecida definição de qualidade como "adequação ao uso". Em se tratando de serviços, a adequação ao uso deve ser entendida como a capacidade de um serviço corresponder satisfatoriamente às necessidades do cliente quando o serviço é prestado. As características principais da qualidade em serviços podem ser classificadas em psicológicas, baseadas no tempo, éticas, contratuais (garantia), e tecnológicas, sendo as três primeiras consideradas mais importantes.^{24, 25}

Os autores Joseph Juran, Edwards Deming, Armand Feigenbaum, Philip Crosby e Kaoru Ishikawa são especialistas reconhecidos internacionalmente na área de controle, garantia e/ou gestão da qualidade. Suas abordagens têm, entretanto, sido largamente utilizadas em manufatura. Torna-se satisfatório a apresentação das abordagens de cada especialista quanto à qualidade em serviços, que poderão ser aplicadas nos estudos que pretendem implementar um sistema da qualidade voltado para a entrega de um serviço.²⁵

JURAN (1990) dá ênfase muito forte ao planejamento da qualidade, estabelecendo a fase de projeto como etapa crítica para a obtenção da qualidade

desejada. O programa de qualidade em serviços proposto por JURAN constitui-se das etapas de projeto e especificação do serviço, estabelecimento de pontos durante o processo para efetivação de seu controle, sistema para identificação e correção de desvios, coleta de dados estatísticos, correção, feedback e aperfeiçoamento da qualidade. A padronização representa etapa imprescindível para a obtenção da adequação ao uso. É proposta ainda uma estrutura de auditorias da qualidade para o acompanhamento e melhoria contínua da qualidade dos sistemas.²⁶

DEMING, que é de formação técnica em matemática e estatística, propõe uma abordagem sistêmica e fortemente comportamental como processo para alcançar o saber profundo. Esta abordagem está representada pelos 14 princípios de DEMING (1990), apresentados no ANEXO B. Propõe também uma abordagem através de indicadores da qualidade. Para o autor, não se gerencia o que não se mede, não se mede o que não se define, não se define o que não se entende, não há sucesso no que não se gerencia.²⁷

Para FEIGENBAUM (1986), princípios, abordagem e tecnologias do Sistema de Qualidade Total são perfeitamente aplicáveis, e estão sendo aplicados a várias áreas de serviços. A qualidade dos serviços passa por características importantes como confiabilidade e garantia. A grande ênfase da abordagem do autor prende-se às fases de estabelecimento de padrões, avaliação da conformidade com os padrões, estabelecimento de ações corretivas e melhoria dos padrões, de forma documentada.²⁸

CROSBY (1985) tem uma abordagem fortemente baseada em aspectos motivacionais, com um sistema de comunicação e liderança da alta administração. A abordagem do autor fundamenta-se na identificação de não-conformidades, quantificadas financeiramente. O processo de melhoria da qualidade está calcado na identificação dos PNCs (preço do não cumprimento), sendo estes não cumprimentos tudo aquilo que não acarretaria custo de perda se fosse feito certo da primeira vez. São recomendados 14 passos para a implantação da abordagem por toda a empresa, que estão apresentados no ANEXO C. Os tópicos principais da abordagem de CROSBY são baseados na prevenção de falhas, nos aspectos de constituição de equipes para melhoria da qualidade, no acompanhamento dos projetos através de um forte esquema de comunicação via cálculo do custo da falta de qualidade e o conceito do zero defeito.²⁹

A abordagem de ISHIKAWA (1985) com foco na garantia da qualidade, fundamenta-se numa forte mudança de postura das pessoas e das empresas. Como Ishikawa costumava colocar, o Controle da Qualidade Total é uma revolução na mentalidade gerencial. Há um conjunto de princípios que resume razoavelmente a abordagem sugerida pelo autor:

- ✚ Qualidade em primeiro lugar;
- ✚ Orientação voltada para o consumidor;
- ✚ O próximo processo é o cliente;
- ✚ Fatos e dados;
- ✚ Respeito à natureza humana;
- ✚ Interfuncionalidade;
- ✚ Controle de qualidade integrado.

Para isto, ISHIKAWA apoia-se em mecanismos de valorização das pessoas, administração participativa, metodologias de solução de problemas, planejamento da qualidade e padronização. O autor propõe fortemente a padronização para se praticar o controle da qualidade.³⁰

1.6 CONTROLE DA QUALIDADE TOTAL – TQC

O TQC é um sistema administrativo aperfeiçoado no Japão, a partir de ideias americanas ali introduzidas logo após a segunda guerra mundial. Este sistema é conhecido no Japão pela sigla TQC (Total Quality Control). O TQC, como praticado no Japão, é baseado na participação de todos os setores da empresa e de todos os empregados no estudo e condução da qualidade.³¹

O significado do TQC poderia ser melhor entendido se fizéssemos uma apresentação estratificada de Controle Total e Qualidade Total. Controle Total é o controle exercido por todas as pessoas da empresa, de forma sistêmica e metódica, baseado no Ciclo PDCA (ferramenta de gestão, também conhecida como Ciclo de DEMING). Qualidade Total é o verdadeiro objetivo de toda a organização humana: satisfação das necessidades de todas as pessoas. Portanto, se o objetivo é atingir a Qualidade Total, devemos medir os resultados para saber se este objetivo foi alcançado ou não.

“TQC é o controle exercido por todas as pessoas para a satisfação das necessidades de todas as pessoas.”

CAMPOS, 2004.

Dessa forma, temos a verdadeira definição de TQC: “TQC é o controle exercido por todas as pessoas para a satisfação das necessidades de todas as pessoas.” (CAMPOS, 2004).

Na era da Qualidade Total a ênfase está no sistema da qualidade. Neste enfoque, a qualidade não diz respeito apenas ao produto ou ao serviço, nem é uma responsabilidade apenas do departamento de qualidade. Qualidade é um problema de todos os funcionários e abrange todos os aspectos da operação da empresa. Ou seja, qualidade é uma questão sistêmica. Garantindo-se a qualidade do sistema, garante-se a Qualidade Total.³¹

Na década de 80, os Círculos de Controle da Qualidade (CCQ's) foram difundidos nas empresas brasileiras por meio dos programas de gestão pela qualidade total como alternativas de gestão participativa e de melhoria contínua. No início da década de 90, muitas empresas abandonaram o CCQ, outras, porém, os mantiveram como meios para sua sustentação e desenvolvimento.³²

Campos (2004) enfatiza que os CCQ's são a extensão da prática do controle da qualidade ao nível de operadores. Por meio dos grupos de CCQ é possível aos operadores exercerem o controle, propondo alterações aos procedimentos operacionais por meio do método de solução de problemas. Sendo assim, a finalização, o acabamento do Gerenciamento da Qualidade Total é parte inseparável desta.³¹

A participação dos CCQ's dar-se-á inicialmente, resolvendo pequenos problemas da área de trabalho utilizando o ciclo PDCA (ciclo de DEMING) e, com o tempo, depois que as pessoas ganham experiências nas atividades dos círculos, os

problemas resolvidos podem ser aqueles advindos da alta direção ou da própria unidade gerencial.³²

O Ciclo PDCA, também conhecido como Ciclo de Shewhart ou Ciclo de Deming, é uma ferramenta de gestão muito utilizada pelas empresas do mundo todo. Este sistema foi concebido por Walter A. Shewhart e amplamente divulgado por Willian E. Deming. O Ciclo PDCA tem como estágio inicial o planejamento da ação, em seguida tudo o que foi planejado é executado, gerando, posteriormente, a necessidade de checagem constante destas ações implementadas. Com base nesta análise e comparação das ações com aquilo que foi planejado, o gestor começa então a implantar medidas para correção das falhas que surgiram no processo ou produto, propondo melhorias continuamente. A metodologia do PDCA está descrita na figura 4.

Figura 4 – Apresentação do ciclo PDCA.



fonte: Gustavo Periard, 2011

<http://www.sobreadministracao.com/o-ciclo-pdca-deming-e-a-melhoria-continua/>

1.7 GARANTIA DA QUALIDADE X CONTROLE DA QUALIDADE

Nos princípios da Qualidade Total, modelo japonês, a Garantia da Qualidade é uma função da empresa que tem como finalidade confirmar que todas as atividades da Qualidade estão sendo conduzidas da forma requerida. A garantia da qualidade é conseguida pelo gerenciamento correto e obstinado (via PDCA) de todas as atividades da qualidade em cada projeto e cada processo, buscando sistematicamente eliminar totalmente as falhas, pela constante preocupação com a satisfação total das necessidades do consumidor e pela participação e responsabilidade de todos da empresa. É um processo sistemático de verificação para certificar-se de que a inspeção da qualidade e as operações de controle da qualidade estão sendo conduzidas de forma correta.³¹

Juran, 1979, define a garantia da qualidade como a atividade de prover às partes interessadas a evidência necessária para estabelecer a confiança de que a função qualidade está sendo conduzida adequadamente.³³

O Controle da Qualidade, no contexto do TQC, é exercer o controle sobre as dimensões da qualidade, centrado no controle de processo, com o objetivo de garantir a qualidade do seu produto final (seja ele qual for) para o seu cliente interno e externo. A prática consciente do controle da qualidade por todas as pessoas da empresa, assumindo a responsabilidade sobre os seus próprios resultados de processo, é a base do gerenciamento participativo e o pilar de sustentação do TQC. Não se pode conceber Controle da Qualidade Total e nem imaginar Garantia da Qualidade no estilo japonês sem que haja a participação dedicada e metódica de todos os setores e pessoas da empresa praticando o Controle da Qualidade.³¹

Neste contexto, nosso trabalho propõe uma avaliação da qualidade que não se limita às avaliações descritas nas normas de Boas práticas de Laboratório, necessárias para a condução dos estudos de bioequivalência, assim como as legislações específicas, anteriormente citadas, mas propõe avaliar a qualidade do todo, que é compreendida desde um bom desenvolvimento de metodologia bioanalítica até a auditoria dos relatórios finais do estudo e disponibilização do medicamento bioequivalente à população.

2 OBJETIVOS:

2.1 OBJETIVO GERAL:

Apresentar uma nova abordagem da garantia da qualidade, referente à etapa analítica de estudos de BD/BE, com enfoque na Qualidade total.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 2.2.1 Desenvolver, definir e validar as metodologias bioanalíticas de Levodopa e 3-O-Metildopa, para a quantificação das amostras constituintes do estudo;
- 2.2.2 Analisar as amostras de plasma de voluntários provenientes da etapa clínica do estudo, segundo os métodos bioanalíticos validados, para a geração dos valores de concentração plasmática de levodopa e 3-O-Metildopa de cada voluntário para cada fase (medicamento teste *versus* medicamento referência).
- 2.2.3 Avaliar os resultados obtidos do medicamento analisado durante as etapas de preparação, extração e análise das amostras do estudo;
- 2.2.4 Estabelecer os requisitos necessários para a implementação, manutenção e melhoria contínua do sistema de garantia da qualidade em busca da qualidade total.
- 2.2.5 Desenvolver métodos de controle para a condução de estudos de BD/BE, utilizando o estudo de Levodopa + Benserazida como piloto;
- 2.2.6 Avaliar os dados constituintes do estudo de BD/BE com os métodos desenvolvidos, a partir da distribuição da qualidade em seis núcleos de atividade;
- 2.2.7 Apresentar os indicadores da qualidade desenvolvidos para o estudo de BD/BE.

3 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram a elaboração de três artigos científicos, dois publicados em revistas indexadas e um submetido à avaliação dos revisores. Os métodos bioanalíticos propostos foram desenvolvidos e validados, de acordo com a legislação vigente, e ambos foram aplicados na condução do estudo de BD/BE do medicamento Levodopa + Benserazida, apresentados nos artigos 1 e 2. O artigo 3 demonstra os resultados da implementação do Sistema da Qualidade, baseado nos princípios da Qualidade Total, com a definição dos níveis de Controle da Qualidade necessários para a Garantia da Qualidade aplicada aos estudos de BD/BE. Como etapa final do trabalho, foram apresentados os indicadores da Qualidade, que serão utilizados como forma de medição do Sistema da Qualidade em busca da melhoria contínua.

3.1 ARTIGO 1: "DETERMINATION OF LEVODOPA IN HUMAN PLASMA BY LIQUID CHROMATOGRAPHY–TANDEM MASS SPECTROMETRY (LC–MS/MS): APPLICATION TO A BIOEQUIVALENCE STUDY " – QUÍM. NOVA VOL.36 NO.1 SÃO PAULO 2013.

O presente artigo, apresenta um método simples, sensível e preciso, utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, acoplada a espectrômetro de massas – CLAE-EM/EM. O método foi desenvolvido e validado para quantificação de levodopa em plasma humano. A análise foi conseguida através de uma coluna analítica C18 Pursuit (5 µm; 150 x 4,6 mm ID), usando uma fase móvel (água e metanol, 90:10, v / v) contendo ácido fórmico a 0,5% v / v, depois de extrair as amostras usando uma simples precipitação de proteína no plasma com ácido perclórico. O método desenvolvido foi validado de acordo com as diretrizes da ANVISA e foi aplicado com sucesso em um estudo de bioequivalência em 60 voluntários saudáveis, demonstrando a viabilidade e confiabilidade do método proposto.

DETERMINATION OF LEVODOPA IN HUMAN PLASMA BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY (HPLC-MS/MS): APPLICATION TO A BIOEQUIVALENCE STUDY

Heliana F. Martins, Douglas P. Pinto e Viviane de A. Nascimento

Laboratório de Farmacocinética, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, 21040-900 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

Marlice A. S. Marques

Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Athos da Silveira Ramos, 149, 21949-900 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

Fábio C. Amendoeira*

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, 21040-900 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

Recebido em 26/3/12; aceito em 17/7/12; publicado na web em 7/12/12

A sensitive, accurate and simple method using HPLC-MS/MS was developed and validated for levodopa quantitation in human plasma. Analysis was achieved on a pursuit® C18 analytical column (5 µm; 150 x 4.6 mm i.d.) using a mobile phase (methanol and water, 90:10, v/v) containing formic acid 0.5% v/v, after extracting the samples using a simple protein plasma precipitation with perchloric acid. The developed method was validated in accordance with ANVISA guidelines and was successfully applied to a bioequivalence study in 60 healthy volunteers demonstrating the feasibility and reliability of the proposed method.

Keywords: levodopa; HPLC-ESI-MS/MS; bioequivalence.

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder whose pathological feature is basically related to abnormalities of cerebral dopaminergic pathways and progressive degradation of dopamine (DA) production in substantia nigra.^{1,2} The motor features, such as bradykinesia, resting tremor, rigidity, gait and postural changes, are the major features of PD.³

Levodopa (LVP) provides rapid and effective control of motor symptoms in virtually all PD patients and since its introduction has dramatically improved survival and quality of life for people with PD and is considered the gold standard of PD pharmacotherapy.⁴

LVP, is the precursor of dopamine and crosses the blood-brain barrier, unlike DA.⁵ LVP is principally metabolized by an aromatic amino acid decarboxylase (AADC) to its active metabolite, DA, and by catechol O-methyltransferase (COMT) into 3-O-methyldopa (3OMD).⁶

Combination therapy of LVP with peripheral AADC inhibitors, such as benserazide, reduces peripheral decarboxylation of LVP in DA, increasing the availability of LVP to the brain and thereby potentially prolongs motor benefit from individual doses of LVP and reduces DA-related peripheral side effects such as nausea, or vomiting.^{4,7,8}

Measurements of LVP and its metabolites in blood have been crucial for development of these strategies by clarifying the role of systemic pharmacokinetics in clinical response.¹

Several methods have been developed to determine LVP and its major metabolite 3-O-methyl dopa in biological fluids. However, most methods of LVP and 3OMD quantitation were carried out by using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-EC).^{6,9} Other methods including fluorimetric and ultraviolet detection and high performance liquid chromatography coupled to diode array detector (HPLC-DAD) have also been

developed.¹⁰⁻¹² Recently, the literature reports a large number of studies performed using high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) for the determination of drugs in biological fluids.¹³⁻¹⁵ However, few methods for determining LVP in plasma using HPLC-MS/MS have been developed and validated.¹² Therefore, further studies are necessary to further improve quantitation techniques allowing the measurement of low concentrations of LVP and 3OMD in human plasma with high selectivity and sensitivity.⁹

Some points to be considered when developing a method for quantification of these analytes is the extraction procedure to be adopted, since both analytes are highly polarized and unstable due to oxidation. This makes the analytes difficult to extract by solid-phase extraction (SPE) or liquid-liquid extraction with high recoveries and it has proved challenging to develop a sensitive and rapid method using HPLC-MS/MS.¹⁵⁻¹⁷

In this work, a new simple, accurate and stable method using HPLC-ESI-MS/MS for the quantitation of LVP in human plasma was developed and validated and was successfully applied to a bioequivalence study in healthy volunteers.

EXPERIMENTAL

Chemicals and reagents

The standard of levodopa (Batch No. J0H244) was obtained from the United States Pharmacopeia (Rockville, MD, USA) and carbidopa (internal standard, IS) was purchased from the United States Pharmacopeia (Rockville, MD, USA) with claimed purity of 99.8 and 92.6%, respectively. HPLC grade Methanol was bought from Tedia (Fairfield, OH, United States) and ultra-pure water was produced in-house using a Millipore system (Bedford, MA, USA). Formic acid 96% was purchased from Tedia Company (Fairfield, OH, USA). All other chemicals and solvents were of the analytical grade available.

*e-mail: fabio.amendoeira@incqs.fiocruz.br

Liquid chromatography

Chromatographic separation was carried out on a Varian system (Walnut Creek, California, USA), equipped with two analytical pumps. A Varian 212-LC. HTS CTC Analytics auto-injector was used.

The chromatographic analysis was performed on a Pursuit® C18 analytical column (5 μ m, 150 x 4.6 mm i.d.), which was maintained at 25 °C. The mobile phase consisted of 0.5% formic acid in water and methanol (90:10, v/v), at a flow rate of 1 mL/min, with flow divider split 1:1. The run time was 6.0 min, and the injection volume was 10 μ L at 7 °C autosampler temperature.

Mass spectrometry

The analysis was performed using a Varian 1200 L quadrupole HPLC-MS/MS system (Walnut Creek, California, USA) equipped with an electrospray ion source and operated in the positive ionization mode. The ion spray voltage and source temperature were 5500 V and 400 °C, respectively. The other parameters for the gas source were set as follows: drying gas (N_2): 25 psi, nebulizer gas (N_2): 50 psi, collision-induced dissociation (Argon) 2.25 mTorr. Mass spectrometric detection was performed using multiple reaction monitoring (MRM) of the fragmentation transitions m/z 198.1 @ 181.0 for levodopa (Figure 1a) and 227.1 @ 181.0 for carbidopa (Figure 1b). The collision energy for the levodopa and carbidopa were 8.5 and 11.5 V, respectively. The voltage capillary applied was 35 V for analyte and internal standard. Data acquisition and analysis were achieved using Varian MS Workstation software (version 6.6, Walnut Creek, USA).

Preparation of stock and working solutions

Standard stock solutions of levodopa and carbidopa (IS) were prepared by dissolving the analytical standard in methanol containing 0.04% v/v of perchloric acid at a concentration of 1 mg/mL. Both solutions were treated in an ultrasonic bath (Branson 2210 ultrasonic cleaner, Branson Ultrasonic Corporation, Danbury, CO, USA) for 5 min.

The standard working solutions of levodopa at the concentrations of 40, 30, 15, 10, 5, 2, 1 and 0.5 μ g/mL were obtained by serial diluting the stock solution with methanol/water (1:1 v/v).

Quality control (QC) working solutions with concentrations of 0.5, 1, 15 and 30 μ g/mL were prepared as the standard working solution. The working internal standard solution containing 4 μ g/mL of carbidopa was also prepared in methanol and water 50% (v/v) by diluting the stock solution. All solutions were stored at -25 °C in amber glass bottles when not in use.

Plasma sample preparation

The IS solution (50 μ L, 4 μ g/mL of carbidopa in methanol/water 1/1 – v/v) was added to 200 μ L of plasma sample which was stored in a 2 mL polypropylene tube. After that, the protein precipitation was performed by adding 240 μ L and 0.4 M of perchloric acid. The mixture was stirred with a vortex for approximately 1 min followed by centrifugation at 20093 g for 15 min, at -5 °C. Subsequently, the full supernatant was transferred to an autosampler vial containing 100 μ L of water and was mixed with the vortex for 20 s. Aliquots (20 μ L) from the final extract were injected into the HPLC-MS/MS system.

Calibration curves and quality control (QC) samples

An eight-point standard curve (each concentration prepared in duplicate) of peak areas versus plasma concentrations for levodopa,

covering each of the ranges from 25 to 2000 ng/mL, was established daily by using a weighted [$1/x^2$] least-squares linear regression analysis method.

Calibration standards were prepared by spiking 950 μ L drug-free human plasma with 50 μ L of levodopa standard working solutions. A volume of 200 μ L of spiked plasma was then transferred to a 2 mL vial and processed as per the plasma samples described above.

The QC samples were prepared according to the same procedure described for the calibration standards using blank plasma, fortified at 25, 50, 750, 1500 ng/mL of levodopa and 1000 ng/mL of IS. The calibration curves and QC samples were freshly prepared and analyzed with each batch of human plasma.

Method validation

The validation process was carried out according to the guidelines for the Industry – Bioanalytical Method Validation, recommended by US Food Drug Administration and according to resolution 899 of May 23, 2003 by ANVISA, Brazil.¹⁸

Specificity and carryover

The specificity of the method was evaluated by analyzing blank plasma samples from 6 different sources, including one lipemic, one hemolysate and 4 normal plasmas from different sources. The chromatograms were compared with those obtained from the analysis of the mobile phase fortified with levodopa (25 ng/mL) and carbidopa (1000 ng/mL) to ensure no interference in the analyte analysis occurred. The carryover was measured by comparing the peak areas of drug-free plasma injected after the sampling of levodopa (1500 ng/mL) three consecutive times. The endogenous interference of the anticoagulant (heparin) in plasma samples was also evaluated.

Linearity and lower limit of quantification (LLOQ)

The linearity of the method was assessed by analyzing calibration standard plasma samples containing levodopa at 8 different concentrations of 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1500 and 2000 ng/mL. The calibration curve was constructed by plotting peak-area ratios of levodopa to the IS against spiked concentration, using weighted ($1/x^2$) least squares linear regression.

The LLOQ was defined as the lowest concentration on the calibration curve, and was established by analysis of 8 replicates of plasma samples spiked with analyte at a concentration of 25 and 1000 ng/mL of carbidopa. Furthermore, to accept the LLOQ value, the peak of the analyte at this concentration had to be at least 5 times the baseline noise. In addition, each LLOQ sample should be obtained with an acceptable accuracy (RE) within $\pm 20\%$ and a precision (RSD) not exceeding 20%.¹⁸

Precision and accuracy

Intra-batch, inter-batch precision and accuracy were determined by eight replicate analyses ($n = 8$) of QC samples at three different concentrations (50, 750 and 1500 ng/mL) on 3 consecutive days. The concentration of each sample was determined using freshly prepared calibration standards. Precision was expressed as RSD and accuracy as RE, with an acceptable accuracy and precision within $\pm 15\%$.¹⁸

Recovery

The recovery of levodopa was determined by comparing the peak areas obtained from analysis of 8 replicates of plasma samples,

prepared according to the method at 3 different QC concentrations (50, 750 and 1500 ng/mL), with those observed from the analysis of spiking deproteinized blank plasma samples at the same amounts of analyte. The recovery of IS was determined in a similar way, at the working concentration (1000 ng/mL of carbidopa).

Stability

All of the assays used for stability testing of levodopa were evaluated by analysis of QC samples at 2 concentrations of 50 and 1500 ng/mL in 8 replicates. The autosampler's stability was also determined by analyzing extracted QC samples kept under autosampler conditions (7 °C) for 125 h. Room temperature stability and long-term stability were assessed using untreated QC samples kept at room temperature for 7 h and stored at -70 °C for 570 days, respectively. After 5 freezing/thaw cycles (-70 °C/room temperature) on consecutive days, QC samples were processed and analyzed to determine the freeze-thaw stability. Samples were considered to be stable if their assay values were within the range of 15% of the nominal values.¹⁸

Bioequivalence study

The validated method was applied to a single-dose, randomized with 2-periods, crossover study of two formulations of test and reference of levodopa + benserazide (200 + 50 mg) in 60 healthy volunteers.

The clinical study was conducted by a collaborative laboratory and the clinical protocol was approved by the institutional Ethics Committee (license: 892/2008, Unicamp, Campinas - São Paulo, Brazil). All subjects involved in the clinical study provided informed consent. After an overnight fast, all participating volunteers took a single oral dose of a test or reference levodopa + benserazide tablet (200 + 50 mg) along with 200 mL of water per period. The washout time between two periods was 9 days (216 h). The blood samples were collected into amber tubes, using heparin as anticoagulant at pre-dose, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.33, 2.66, 3, 3.5, 4, 5, 6, 8 and 10 h post-dosing. Samples were centrifuged at 4884 g for 10 min at 4 °C and the plasma separated and stored at -70 °C until analysis.

Pharmacokinetic parameters were calculated using the WinNonlin™ program (version 5.3, Microsoft Excel, 2003). The maximum plasma concentrations (C_{max}) and the time to reach these (T_{max}) were obtained directly from the experimental data. The terminal elimination rate constant (K_e) was calculated from the plot of logarithms of plasma concentration against time using least square regression.

RESULTS AND DISCUSSION

Chromatography and mass spectrum

Tandem mass parameters were optimized for best response by directly infusing standard solutions of levodopa and carbidopa at a flow rate of 20 μ L/min through a syringe pump. MS scanning was carried out in positive ion mode. From the product ion scan (MS^2), it could be identified that the signal of fragment ions with m/z 181.0 for levodopa and m/z 181.0 for carbidopa (IS) were the most abundant. Therefore, the transitions m/z 198.1 $\rightarrow$ 181.0 for levodopa (Figure 1S, supplementary material) and 227.1 $\rightarrow$ 181.0 for carbidopa (Figure 2S, supplementary material) were selected for determination. The results obtained from the analysis of spiked plasma samples demonstrated that the signal-to-noise ratio of the ion selected for levodopa was greater than 5:1 at the LLOQ (Figure 1b), which confirmed the higher specificity of the ion selected.

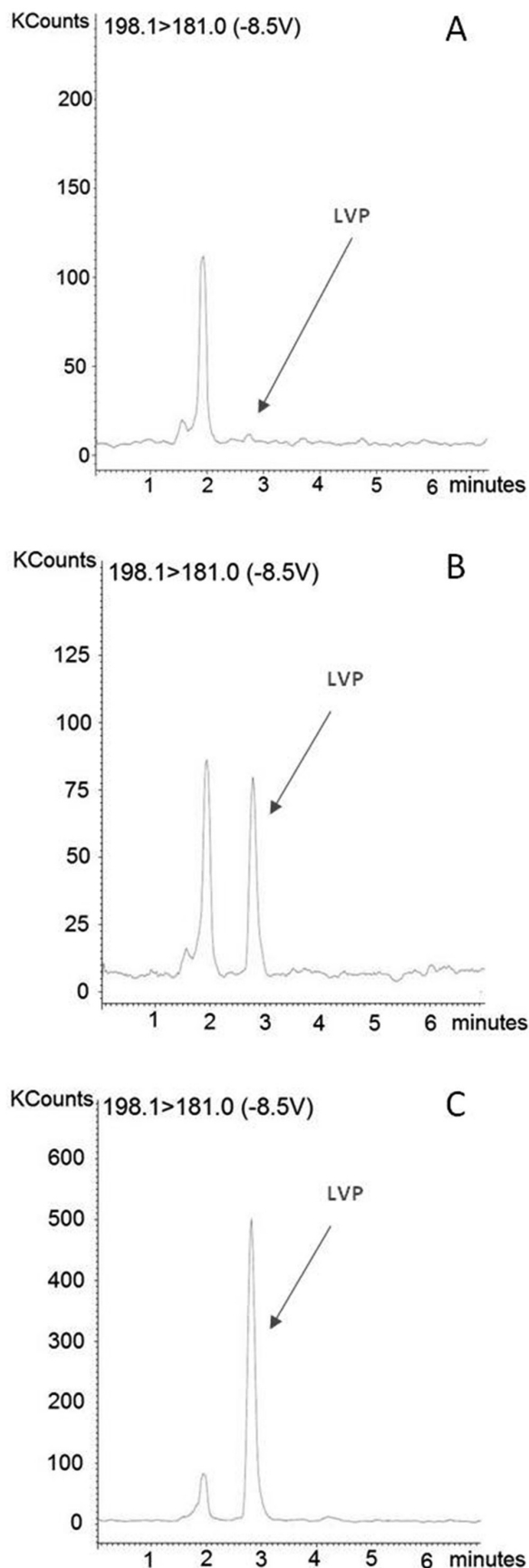


Figure 1. SRM chromatograms of (A) blank plasma sample, (B) blank plasma spiked with levodopa (25 ng/mL) and (C) volunteer plasma collected 2 h after the oral administration of levodopa (200 mg)

In order to select the optimum mobile phase composition that provides the most rapid and best overall separation of the analyte and IS from the matrix interference, the mobile phase containing acetonitrile and/or methanol and water were mixed at different ratios with and without adding modifiers or buffers (ammonium acetate, ammonium formate or formic acid). The best conditions revealed from these experiments were achieved using a mixture of water/methanol/formic acid at a ratio of 90:10:0.5% (v/v/v). This acidic mobile phase is an important factor for significant reduction of the matrix effect. In addition, the short retention time and good resolution of the analyte and internal standard under HPLC-MS/MS conditions have the advantage of high-throughput in the analysis compared to recent studies in the literature using a similar extraction method.^{1,6,9,19,20} The extraction method used was considered satisfactory since higher peak symmetry and sharper signals by acid amount added were achieved and short analysis time, without decreasing the signal intensity of levodopa (Figure 1b) or of the internal standard carbidopa (Figure 2b).

Different types of columns (Pursuit® C18, OmniSpher C18, monoChrom 5 u MS) were tested and the Pursuit® C18 column was chosen because it presented the best chromatographic separation from endogenous compounds under our specific conditions. The pH of the plasma samples treated with perchloric acid in the extraction step, contributed to the choice of a Pursuit® C18 column.²¹ In this method, no additive was used for pH adjustment (neutralization) or for the precipitation of perchlorate in the extraction stage, in contrast to findings in the literature.^{1,11} Therefore, the choice of the column was based on its strength, according to the analytical chromatographic method used and the ability to tolerate the injection of samples processed with perchloric acid.

Selection of IS

As is known, the use of an internal standard whose chemical properties are very similar to those of the analyte can minimize variations that may occur during the analytical process. In this study, methyldopa and carbidopa were evaluated as internal standards (IS). Firstly, due to their structural similarity with levodopa and also because they had been used in the literature for this purpose.⁹ Under the selected chromatographic conditions, carbidopa was chosen as the IS given its high sensitivity, similar chromatographic and mass spectrometric behavior in relation to the analyte. The levodopa and carbidopa were eluted and well resolved chromatographically at retention times of 2.61 and 5.05 min, respectively (Figures 1b and 2b).

Pretreatment of plasma samples

Many precipitation extraction methods have been reported using extraction solvents such as perchloric acid or methanol at different molar ratios or with addition of buffer or modifiers.^{1,11,19-22} Protein precipitation with perchloric acid 0.4 M was applied to prepare plasma samples because it was simple to perform, fast, easily reproducible and provides a high recovery of the analyte under our experimental conditions (Table 2).

Method validation

The specificity was examined by analyzing 6 different human blank plasma samples (one hemolysate, one lipemic and 4 normal). No interfering peaks from endogenous compounds were observed at the retention time of the analyte or IS (Figures 1a and 2a). The retention times of levodopa and carbidopa were about 2.61 min and 5.05 min, respectively, and total run time was 7 min, which represents a

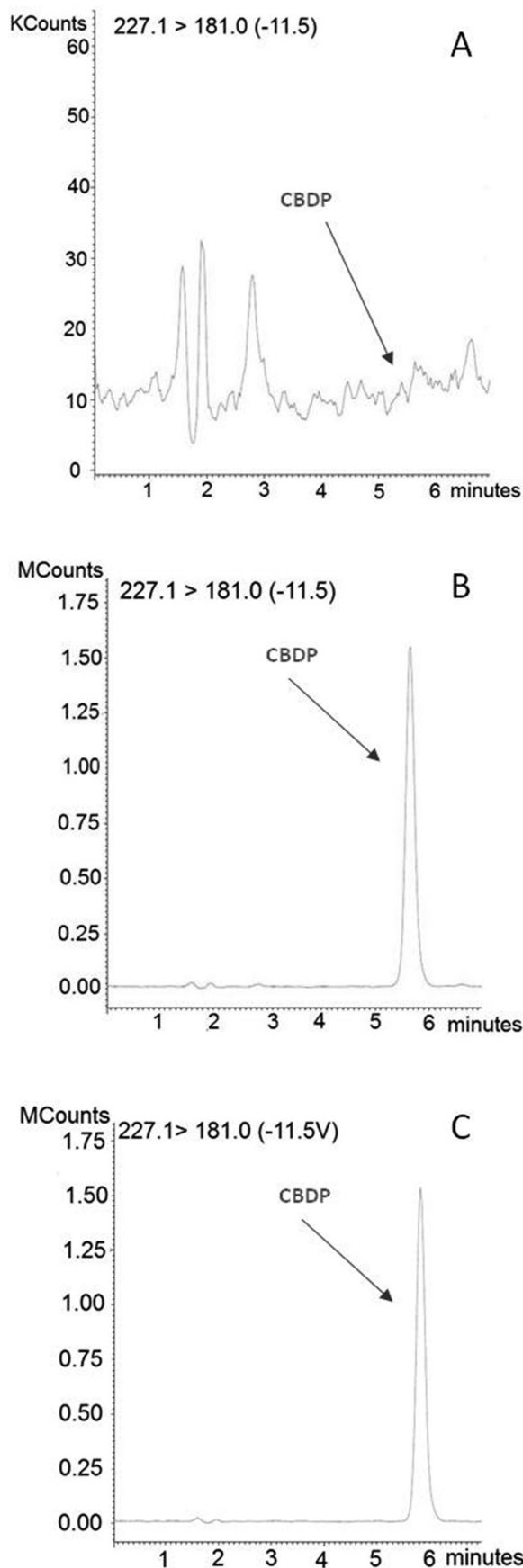


Figure 2. SRM chromatograms of (A) blank plasma sample, (B) blank plasma spiked with carbidopa (1000 ng/mL) and (C) volunteer plasma collected 2 h after the oral administration of benserazide (50 mg)

reduction in running time when compared to most analytical methods described in the literature.^{1,9,11,19,22}

A calibration curve was tested during the method validation and was shown to be linear over the concentration range 25-2000 ng/mL with a weight factor of $1/x^2$, which was able to cover all clinical concentrations of levodopa in this study (Table 1). The linear equations of the calibration curves showed $r > 0.993403$.

Table 1. Precision and accuracy data of back calculated concentrations of calibration samples for levodopa in plasma (2 replicates per batch)

Analyte	Nominal concentration (ng/mL)	Observed concentration (ng/mL, mean $\pm$ SD)	Precision (%RSD)	Accuracy (%)
Levodopa	25.0	25.4 $\pm$ 1.4	5.6	101.6
	50.0	47.7 $\pm$ 0.3	0.6	95.5
	100.0	101.8 $\pm$ 0.0	0.0	101.8
	250.0	251.8 $\pm$ 9.2	3.7	100.7
	500.0	515.8 $\pm$ 12.7	2.5	103.1
	750.0	773.6 $\pm$ 13.1	1.7	103.1
	1500.0	1492.3 $\pm$ 4.9	0.3	99.5
	2000.0	1896.4 $\pm$ 1.6	0.1	94.8

SD = standard deviation; RSD = relative standard deviation.

The lower limit of quantification (LLOQ) was defined as the lowest concentration of levodopa in human plasma detected in the calibration curve (25 ng/mL). The LLOQ observed in this study is one of the lowest reported in the literature that reports lower limits of quantification of around 50 ng/mL.^{9,11,19,20,22} The mean precision and accuracy at LLOQ was 3.11 and 103.54%, respectively (Table 2). With the LLOQ (25 ng/mL), this method was sufficiently sensitive to determine the concentration of levodopa in human plasma 10 h after a single oral administration of levodopa (200 mg) + benzerazide (50 mg) in this bioequivalence study. Representative chromatograms of a blank plasma (Figures 1a and 2a), plasma spiked with levodopa (25 ng/mL; Figure 1b) or carbidopa (1000 ng/mL; Figure 2b) and plasma obtained from the human volunteers 2 h after administration of 200 mg of levodopa (Figure 1c) and 50 mg of benzerazide (Figure 2c), presented peak symmetry values of between 2.61 and 5.05, assuring the separation and effectiveness of the quantitation.

Intra-batch, inter-batch precision and accuracy were evaluated by analyzing eight replicate quality control samples at four different concentration levels of 25, 50, 750 and 1500 ng/mL over three validation

Table 2. Precision, accuracy and recovery data for levodopa quantification by HPLC-MS/MS

Validation parameters	Levodopa quality control concentration (ng/mL)			
	25.0	50.0	750.0	1500.0
Precision (RSD%)				
Intra-run (n = 8)	3.1	4.2	3.9	5.0
Inter-run (n = 24)	-----	4.5	4.4	0.7
Accuracy (%)				
Intra-run (n = 8)	103.5	101.6	103.3	94.4
Inter-run (n = 24)	-----	97.4	99.3	95.1
Recovery (%) (n = 8)	-----	100.6	100.1	94.6

days. Full results are shown in Table 2, where it can be seen that the intra-batch precision measured by the coefficient of variation, CV, was 3.11, 4.24, 3.94 and 4.96%, respectively. The sample concentrations used in the precision and accuracy studies were in accordance with the Brazilian regulatory guidelines¹⁸ (Low-concentration quality control samples: 50 ng/mL, Middle-concentration quality control samples: 750 ng/mL and High-concentration quality control samples: 1500 ng/mL) and the precision at each concentration level did not exceed a CV of 15% for quality controls and 20% for LLOQ (25 ng/mL). The accuracy was within the range established (i.e. 85-115%) for each concentration level tested and for LLOQ of 80-120%. The mean extraction recoveries of levodopa (n = 8) were 100.60, 100.15 and 94.58% at concentrations of 50, 750 and 1500 ng/mL, respectively (Table 2). The carryover was examined by analyzing the peak areas of drug-free plasma after injecting levodopa sample (1500 ng/mL) three times consecutively.

The stability of levodopa under different storage and handling conditions were fully evaluated by analyzing Quality Control samples. Levodopa proved to be stable in plasma samples for at least 7 h at room temperature (short-term) and also after 5 freeze thaw cycles, demonstrating that human plasma samples could be thawed and refrozen without compromising the integrity of the samples. Plasma samples were stable for at least 274 days at -70 °C (long-term). The results demonstrated that extracted samples could be analyzed after being kept in the autosampler for at least 125 h with acceptable precision and accuracy (Table 3).

Application to a bioequivalence study

The validated method was successfully applied to a bioequivalence study of two levodopa + benzerazide formulations. The

Table 3. Stability of human plasma samples of levodopa under various storage conditions (n = 8)

Stability	Measured concentration (ng.mL ⁻¹)	Mean fresh samples	RSD(%)	Mean stability samples	RSD(%)	Assay values (%)
Post-preparative stability (125 h, 7 °C)	50.0	51.1	5.9	50.7 ^a	4.7	-0.7
	1500.0	1543.7	5.1	1581.7 ^a	2.7	2.5
Long-term stability (274 days, -20 °C, %)	50.0	51.3	2.7	53.5 ^c	3.5	4.3
	1500.0	1449.3	3.4	1521.6 ^c	2.7	5.0
Freeze-thaw stability (5 cycles – 137 h, -70 °C)	50.0	52.1	4.5	51.4 ^b	4.1	-1.4
	1500.0	1575.3	10.5	1502.3 ^b	3.2	-4.6
Short-term stability (7 h, room temperature)	50.0	51.3	2.7	53.5 ^c	3.5	4.3
	1500.0	1449.3	3.4	1521.6 ^c	2.7	5.0

^a After 125 h; ^b after 137 h; ^c after 7 h; ^a mean of 8 replicates, ^bRSD = relative standard deviation.

mean concentration versus time curves in plasma from 60 healthy volunteers after administration, reference and test preparations are shown in Figure 3.

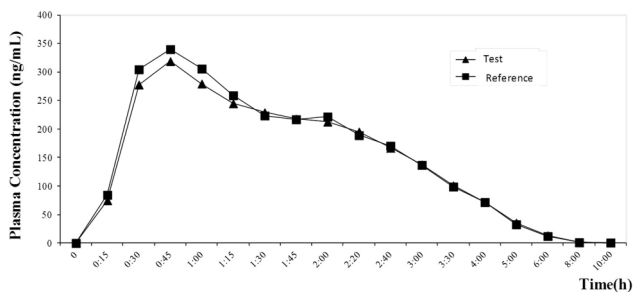


Figure 3. Plasma concentration–time curve of levodopa after the oral administration of a single dose of reference and test formulations (levodopa 200 mg + carbidopa 50 mg) in 60 healthy volunteers

The results demonstrated that the two levodopa + benzerazide preparations were bioequivalent in terms of their rate and extent of absorption.

CONCLUSION

A new sensitive and simple method using HPLC-MS/MS for the determination of levodopa in human plasma was developed and validated and can be a useful tool for pharmacokinetics studies of several drugs.

The described method showed good specificity, precision, accuracy and linearity over the 25–2000 ng/mL range. This method afforded simple sample preparation using protein precipitation with perchloric acid. The established LLOQ of 25 ng/mL is one of the lowest reported in the literature and it was efficient for determination of the levodopa concentrations in human plasma up to 10 h after oral administration of levodopa + benzerazide. No significant interferences from endogenous compounds were observed. The method was successfully applied to demonstrate the bioequivalence of test and reference formulations.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Available at <http://quimicanova.sbq.org.br>, as PDF file, with free access.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge all volunteers, laboratory analysts, and technicians who participated in this study.

REFERENCES

- Karimi, M.; Carl, J. L.; Loftin, S.; Perlmutter, J. S.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2006**, 836, 120.
- Kim, T. H.; Cho, K. H.; Jung, W. S.; Lee, M. S.; *PLoS ONE* **2012**, 7, e35695.
- Massano, J.; Garrett, C.; *Frontiers in Neurology* **2012**, 3, 1.
- Keller, G. A.; Czerniuk, P.; Bertuola, R.; Spatz, J. G.; Assefi, A. R.; Girolamo, G. D.; *Clinical Therapeutics* **2011**, 33, 500.
- Poulopoulos, M.; Waters, C.; *Core Evidence* **2010**, 5, 1.
- Saxer, C.; Niina, M.; Nakashima, A.; Nagae, Y.; Masuda, N.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2004**, 802, 299.
- Jonkers, N.; Sarre, S.; Ebinger, G.; Michotte, Y.; *J. Neural. Transm.* **2001**, 108, 559.
- Souza Silva, M. A.; Mattern, C.; Hcker, R.; Tomaz, C.; Huston, J. P.; Schwarting, R. K. W.; *Synapse* **1997**, 27, 294.
- Cesar, I. C.; Bastos, L. F.; Godin, A. M.; Coelho, M. M.; Araujo, D. P.; Fatima, A.; Guidine, P. A.; Pianetti, G. A.; *J. Mass. Spectrom.* **2011**, 46, 1125.
- Li, S. F.; Wu, H. L.; Yu, Y. J.; Li, Y. N.; Nie, J. F.; Fu, H. Y.; Yu, R. Q.; *Talanta* **2010**, 81, 805.
- Muzzi, C.; Bertocci, E.; Terzuoli, L.; Porcelli, B.; Ciari, I.; Pagani, R.; Guerranti, R.; *Biomed. Pharmacother.* **2008**, 62, 253.
- Cesar, I. C.; Byrro, R. M. D.; Cardoso, F. F. S. S.; Mundim, I. M.; Teixeira, L. S.; Gomes, S. A.; Bonfim, R. R.; Pianetti, G. A.; *J. Mass. Spectrom.* **2011**, 46, 943.
- Bedor, D. C. G.; Souza Filho, J. H.; Ramos, V. L. S.; Gonçalves, T. M.; Sousa, C. E. M.; Santana, D. P.; *Quim. Nova* **2011**, 34, 6.
- Dalmora, S. L.; Sangoi, M. da S.; Nogueira, D. R.; D'Avila, F. B.; Moreno, R. A.; Sverdlhoff, C. E.; de Oliveira, R. A.; Borges, N. C.; *Quim. Nova* **2010**, 33, 124.
- Igarashi, K.; Hotta, K.; Kasuya, F.; Abe, K.; Sakoda, S.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2003**, 792, 55.
- Kumarathasan, P.; Vincent, R.; *J. Chromatogr., A* **2003**, 987, 349.
- Koivisto, P.; Tornkvist, A.; Helctin, E.; Markictes, K. E.; *Chromatographia* **2002**, 55, 39.
- Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); *RE 899 Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos*, ANVISA: Brasília, 2003.
- Lv, L.; Jiang, W.; Zhou, S.; Huang, X.; Shi, X.; Lv, C.; Wu, L.; Xu, C.; *Chromatographia* **2010**, 72, 239.
- Pan, L.; Guo, Y.; Li, Z.; Chen, J.; Jiang, T.; Yu, Y.; *Chromatographia* **2010**, 72, 627.
- Tolokan, A.; Klebovich, I.; Balogh-Nemes, K.; Horvai, G.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1997**, 698, 201.
- Jiang, W.; Lv, L.; Zhou, S.; Huang, X.; Shi, X.; Lv, C.; Wu, L.; Xu, C.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, 53, 751.

DETERMINATION OF LEVODOPA IN HUMAN PLASMA BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY (HPLC-MS/MS): APPLICATION TO A BIOEQUIVALENCE STUDY**Heliana F. Martins, Douglas P. Pinto e Viviane de A. Nascimento**

Laboratório de Farmacocinética, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, 21040-900 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

Marlice A. S. Marques

Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Athos da Silveira Ramos, 149, 21949-900 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

Fábio C. Amendoeira*

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, 21040-900 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

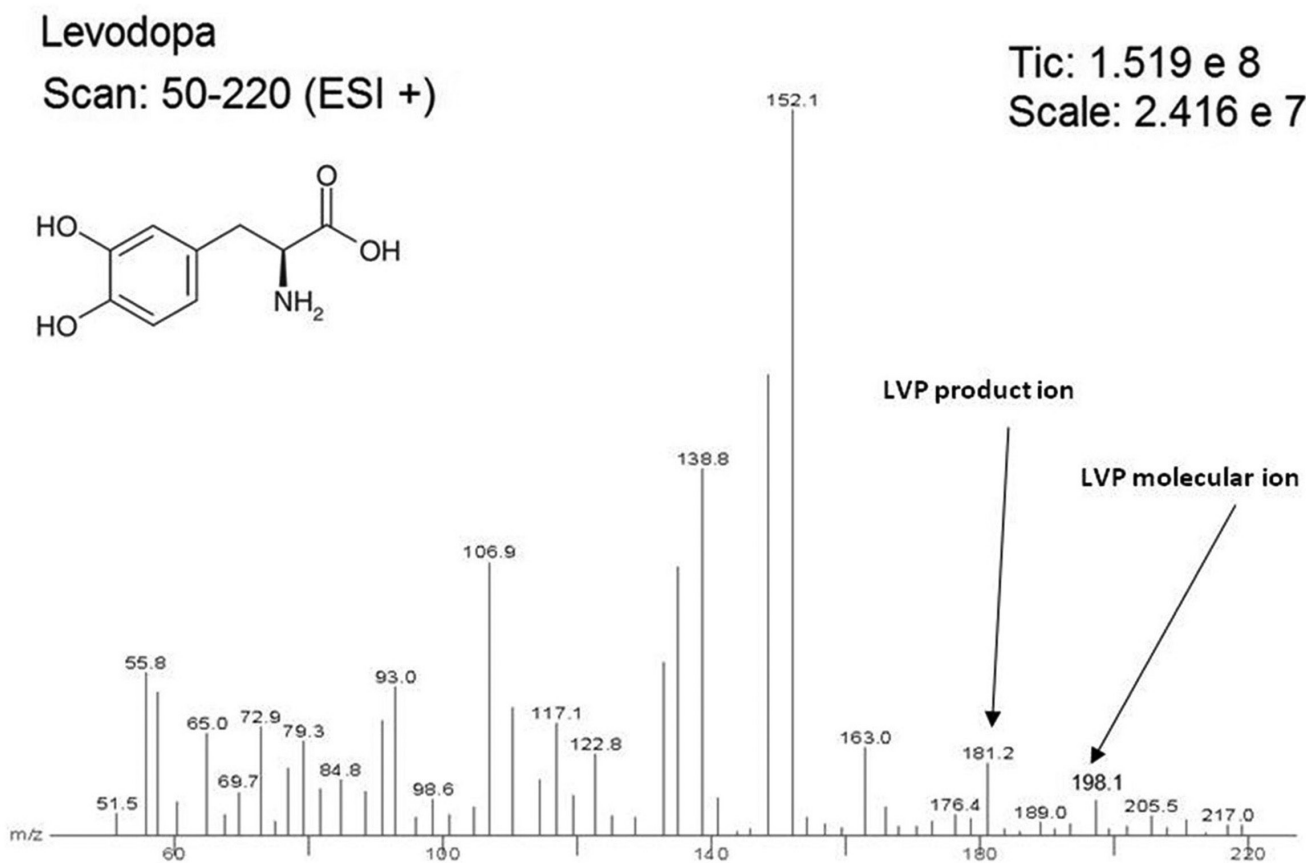


Figure 1S. Chemical structure and ion product spectrum of levodopa (m/z 198.1) obtained by electrospray ionization in positive ion mode

*e-mail: fabio.amendoeira@incqs.fiocruz.br

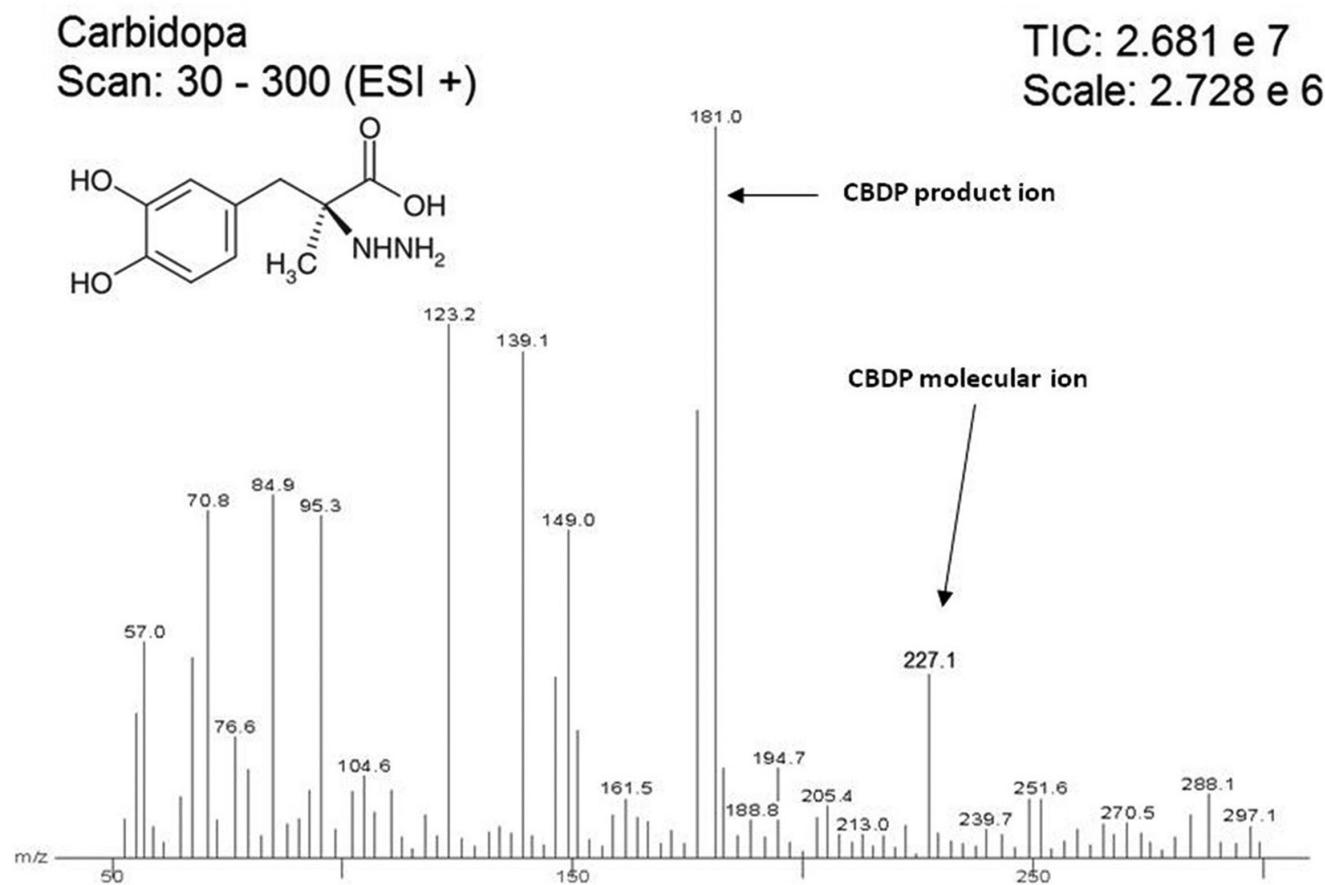


Figure 2S. Chemical structure and ion product spectrum of carbidopa (m/z 181), obtained by electrospray ionization in positive ion mode

3.2 ARTIGO 2: "DEVELOPMENT OF A HPLC/MS/MS METHOD FOR DETERMINATION OF 3-O-METHYLDOPA IN HUMAN PLASMA AND ITS APPLICATION IN A BIOEQUIVALENCE STUDY" - REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ (NO PRELO)

O presente artigo apresenta um método específico, simples e sensível baseado em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à espectrometria de massas – CLAE-EM/EM. O método bioanalítico foi desenvolvido e validado para a determinação de 3-o-metildopa, o principal metabolito da dopamina, em plasma humano. A separação foi realizada em coluna analítica Atlantis T3 C18 (5 µm; 150 x 4,6 mm i.d.) utilizando uma fase móvel composta por uma solução de água e metanol (85:15, v/v), contendo 0,05 % de ácido fórmico. A extração do analito e do padrão interno foi executada utilizando-se uma simples precipitação proteica no plasma através do uso de ácido perclórico. A detecção foi realizada em espectrômetro de massa triplo quadrupolo em modo de monitorização de reações múltiplas (MRM) positivo. A transição monitorizada foi m/z 212,0 → m/z 166,0 para 3-O-metildopa e m/z 227,1 → m/z 181,0 para carbidopa (padrão interno). As curvas de calibração foram lineares em uma faixa de 50 a 4000 ng/mL para 3-O-metildopa. O método apresentou boa precisão e exatidão de acordo com os critérios para análises biomédicas e foi aplicado com sucesso ao estudo de bioequivalência em humanos de duas formulações contendo levodopa + benserazida (200 + 50 mg).

Development of a HPLC/MS/MS method for determination of 3-O-methyldopa in human plasma and its application in a bioequivalence study

Desenvolvimento de metodologia baseada em HPLC/MS/MS para a determinação de 3-O-metildopa em plasma humano e sua aplicação a estudos de bioequivalência

Heliana Figueiredo MARTINS¹, Douglas Pereira PINTO¹, Viviane de Assis NASCIMENTO¹, Marlice Aparecida Sipoli MARQUES², Fábio Coelho AMENDOEIRA^{3*}

¹Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Farmacocinética, Rio de Janeiro - RJ, Brazil, (21) 3865-9568, sefar@fiocruz.br.

²Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Instituto de Química (IQ), Departamento de Química Analítica, Laboratório 512—, Rio de Janeiro - RJ, Brazil, (21) 2562-7860, marlice@iq.ufrj.br.

³Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica, Laboratório de Farmacologia, Rio de Janeiro - RJ, Brazil, (21)38655281, fabio.amendoeira@incqs.fiocruz.br.

*Correspondence: Fabio Coelho Amendoeira. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, 21040-900, Manguinhos, Rio de Janeiro - RJ, Brazil, e-mail: fabio.amendoeira@incqs.fiocruz.br

ABSTRACT

A simple, sensitive and specific HPLC/MS/MS method was developed and validated for determination of 3-O-methyldopa, the major metabolite of dopamine, in human plasma. Separation was achieved on Atlantis T3 C18 analytical column (5 µm; 150 x 4.6 mm i.d.) using a mobile phase consisted in a solution of water and methanol (85:15, v/v) containing formic acid 0.05 %. The extraction of the analyte and internal standard was performed using a simple protein plasma precipitation with perchloric acid. Detection was conducted on a triple quadrupole tandem mass spectrometer with a positive multiple reaction monitoring mode (MRM). The fragmentation transitions monitored

were m/z 212.0 $\rightarrow$ m/z 166.0 for 3-O-methyldopa and m/z 227.10 $\rightarrow$ m/z 181.0 for carbidopa (internal standard). The calibration curves were linear in the range of 50–4000 ng/mL for 3-O-methyldopa. The method presents a good precision and accuracy in accordance to the criteria for biomedical analysis and has been successfully applied to the bioequivalence study of two formulations levodopa + benserazide (200 + 50 mg) in healthy human volunteers in accordance to ANVISA guidelines.

Keywords. 3-O-methyldopa, HPLC-ESI-MS/MS, Bioequivalence, Plasma, Pharmacokinetics.

RESUMO

Um método específico, simples e sensível baseado em HPLC/MS/MS foi desenvolvido e validado para a determinação de 3-o-metildopa, o principal metabolito da dopamina, em plasma humano. A separação foi realizada em coluna analítica Atlantis T3 C18 (5 μ m; 150 x 4,6 mm i.d.) utilizando uma fase móvel composta por uma solução de água e metanol (85:15, v/v), contendo 0,05 % de ácido fórmico. A extração do analito e do padrão interno foi executada utilizando-se uma simples precipitação protéica no plasma através do uso de ácido perclórico. A detecção foi realizada em espectrômetro de massa triplo quadrupolo em modo de monitorização de reacções múltiplas (MRM) positivo. A transição monitorizada foi m/z 212,0 $\rightarrow$ m/z 166,0 para 3-O-metildopa e m/z 227,1 $\rightarrow$ m/z 181,0 para carbidopa (padrão interno). As curvas de calibração foram lineares em uma faixa de 50 a 4000 ng/mL para 3-O-metildopa. O método apresentou boa precisão e exatidão de acordo com os critérios para análises biomédicas e foi aplicado com sucesso ao estudo de bioequivalência em humanos de duas formulações contendo levodopa + benserazida (200 + 50 mg).

Palavra-chave. 3-O-metildopa, HPLC-ESI-MS/MS, Bioequivalência, Plasma, Pharmacokinetics.

INTRODUCTION

Parkinson's disease is a neurodegenerative disorder characterized by progressive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra. It affects the mobility and control

of the skeletal muscular system and is characterized by tremor, rigidity, bradykinesia and postural instability that affects 0.3% of the general population and 1 % to 2 % of people > 60 years¹⁻³.

Nowdays Levodopa still remains the most effective drug in the treatment of Parkinson's disease, however, most of administered levodopa is converted by aromatic L-amino acid decarboxylase to dopamine before it can enter the central nervous system^{1, 3, 4}.

Therefore, L-dopa is routinely given in association with peripheral aromatic-L-amino acid decarboxylase inhibitors, such as benserazide, that inhibit conversion of L-dopa peripherally, but do not easily cross the blood brain barrier to affect its conversion to dopamine centrally^{4, 5}.

In the central nervous system as well as in several other tissues L-dopa can be directly metabolized by catechol-O-methyl transferase (COMT) to 3-O-methyldopa (3-OMD). When L-dopa is administered with dopa decarboxylase inhibitors (DDI), such as benserazide, the availability of L-dopa in the brain increases dramatically, resulting in the accumulation of 3-OMD in this site^{6, 7}.

There is growing evidence that accumulation 3-OMD might be involved in the side effects of chronic treatment of L-dopa^{6, 8}.

Therewith measurements of levodopa and its metabolites in blood have been crucial for pharmacokinetic and bioequivalence studies of antiparkinson

drugs containing levodopa associated with benserazide^{9, 10}.

Recently, several bioanalytical methods based on mass spectrometry for plasma quantification of Levodopa and its metabolites have been developed¹¹⁻¹⁵ as well methods based on fluorimetric, ultraviolet or eletrochemical detection^{3, 10, 12, 15-18}. Several studies performed using high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) for the determination of drugs in biological fluids was recently developed¹⁹⁻²¹, however a few methods to determine 3-OMD in human plasma using HPLC-MS/MS were developed and validated⁹. Therefore, further studies are necessary for development of new rapid and accurate quantitation techniques to the measurement of low concentrations of 3-OMD in human plasma with high selectivity and sensitivity.

The aim of this work was to develop and validate in a bioequivalence study an efficient bioanalytical method based on HPLC-ESI-MS/MS for rapid and accurate quantification of 3-OMD in human plasma.

MATERIAL AND METHODS

Materials

3-OMD (Batch No. 1106062A3) was obtained from PGS (Carborro, USA). Carbidopa (CBDP, internal standard, I.S.) was purchased from the United States Pharmacopeia (Rockville, MD, USA) with 98.8 and 92.6 % of purity respectively. Analytical grade Methanol and Formic acid 96 % was obtained from Tedia (Fairfield, OH, United States). Double distilled water was purified by Millipore system (Bedford, MA, USA) and was used for all the experiments. All other chemicals and solvents were of the highest analytical grade available.

Instrumentation and detection

The HPLC Varian System (Walnut Creek, California, USA), equipped with two analytical pumps Varian 212-LC was employed. A HTS-CTC Analytics auto-injector was used. A triple-quadrupole tandem mass spectrometer (VARIAN 320 MS, Walnut Creek, California, USA) equipped with an electrospray ion source and operated in the positive ionization mode was used in this analysis. The ion spray voltage and source temperature were 5500 V and 400° C, respectively. The others parameters for the gas source were set as follow: drying gas 30 psi, nebulizer gas 55 psi, collision induced dissociation (CID) 2.00 mTorr. The

collision energy for the 3-OMD and CBP were 10.5 and 10.0 V, respectively. The voltage capillary applied was 30 V for analyte and internal standard. Quantification was performed using multiple reaction monitoring (MRM) of the fragmentation transitions m/z 227.10 $\rightarrow$ 181.0 for carbidopa (Figure 1 A) and m/z 212.0 $\rightarrow$ 166.0 for 3-OMD (Figure 1 B). Data acquisition and analysis were achieved using the Varian MS Workstation software (Version 6.6, Walnut Creek, USA).

Chromatographic conditions

Atlantis T3 C18 (5 μ , 150 x 4.6 mm i.d.) was selected as the reversed-phase analytical column. The mobile phase consisting of water and methanol (85:15, v/v) containing formic acid 0.05 % was pumped at a flow rate of 1 mL/min with flow divider split 1:1. The run time was 5.0 min and the injection volume was 20 μ L into HPLC-MS/MS system.

Preparation of stock and working solutions

Stock standard solutions of 3-OMD and CBDP (IS) were prepared by dissolving accurately weighed reference substances in methanol containing 0.04 % of perchloric acid at a concentration of 1

mg/mL. Either solutions were treated in an ultrasonic bath (Branson 2210 ultrasonic cleaner, Branson Ultrasonic Corporation, Danbury, CO, USA) for 5 min. The standard working solutions of 3-OMD in the concentrations of 1000, 2000, 5000, 10000, 15000, 30000, 60000 and 80000 ng/mL, were obtained by dilution of the stock solution with methanol / water (1:1 v/v). Quality control (QC) working solutions with concentrations of 1000, 2000, 30000 and 60000 ng/mL was prepared as the standard working solution. The working internal standard solution containing 4000 ng/mL of CBDP was also prepared in methanol and water (1:1 v/v) by dilution of the stock solution. All solutions were stored at -70°C in amber glass bottle when not used.

Sample preparation

A 200 μL sample of human plasma were added to 2.0 mL polypropylene tubes. To each tube 50 μL of IS solution (4000 ng/mL of CBDP in methanol / water (1:1 v/v) and 240 μL and 0.4 M of perchloric acid were added to the protein precipitation. The tubes were stirred with the vortex for approximately 1 min followed by centrifugation at 20093 g for 15 min, at -5°C . The extract of sample plasma was transferred to an autosampler vial

containing 300 μL of water / formic acid 0.05 % and was vortexed for 20 s. Aliquots (20 μL) from the final extract were injected into the HPLC–MS/MS system for analysis.

Method validation and quantification

The validation process was carried out according to the Guidance given to the Industry – Bioanalytical Method Validation, recommended by US Food Drug Administration and according resolution 899 of May 23, 2003 by ANVISA, BRAZIL²², the legislations in force at the time of the study. Currently studies of this nature should follow the Resolution RDC No. 27 of May 17, 2012²³.

Recovery

The recovery from human plasma was determined at three different concentrations (n=3 each) for 3-OMD and CBDP (IS) by comparing the peak areas obtained from analysis of eight replicates of plasma samples prepared according to the method of analysis versus absolute recovery solutions without plasma deriving from standard solutions with subsequent dilution to identical target concentrations of 100, 1500 and 3000 ng/mL. The recovery of IS was determined in a similar way, at

the working concentration (1000 ng/mL of CBDP)²².

Limit of quantification (LOQ)

Peak response (peak area) was determined in blank plasma samples (six replicates from different plasma) and in spiked LOQ sample prepared from the same plasma. The peak area of blank samples should be no greater than 20 % of the mean peak area of LOQ of 3-OMD, and no greater than 5 % of CBDP. The precision and mean accuracy of the back calculated LOQ replicate concentrations must be ≤ 20 and ± 20 %, respectively. The LLOQ was defined and established in 50 ng/mL. To accept the LLOQ value, the peak of the analyte at this concentration should be at least 5 times the baseline noise. In addition, each LLOQ sample should be obtained with an acceptable accuracy as relative error (RE) within ± 20 % and a precision (RSD) not exceeding 20 %.

Limit of detection (LOD)

According to Resolution 899/ ANVISA, the limit of detection should be established through the analysis of solutions of known and decreasing drug concentration to the lowest detectable level. It is recommended that the LOD is 2 to 3 times the baseline noise. In the

analytical method of the baseline noise was determined in a range of 5 absolute counts, which set limits in terms of detection a value corresponding to 15 ng/mL.

Analytical curves, regression model

The analytical curves were constructed using values ranging from 50 to 4000 ng/mL of 3-OMD in human plasma. Calibration curves were obtained by the weighted linear model. The ratio of 3-OMD peak area to CBDP peak area was plotted against 3-OMD concentration in ng/mL. The suitability of the calibration curve was confirmed by back-calculating the concentrations of the calibration standards.

$$y = a(x_2) + b(x)$$

y = peak area ratio (PAR) of 3-OMD to CBDP

x = concentration (ng/mL) of 3-OMD in plasma.

Coefficients a, b, the coefficient of determination (r^2) and x was calculated using weighted 1 linear model with regression analysis.

Calibration curve standards and quality control samples

The calibration curve was defined by eight-point calibration in human plasma in duplicate concentration. The concentration range evaluated to 3-OMD, was 50, 100, 250, 500, 750,

1500, 3000 and 4000 ng/mL by using a weighted $[1/x^2]$ least-squares linear regression analysis method. The calibration standards were prepared by spiking 950 μ L drug-free human plasma with 50 μ L of 3-OMD standard work solutions. Then 200 μ L of spiked plasma were transferred to a 2.0 mL polypropylene tube and processed as described above.

The QC samples were prepared according to the same procedure described for the calibration standards using blank plasma, fortified at 50, 100, 1500 and 3000 ng/mL of 3-OMD and 1000 ng/mL of CBDP (IS). The calibration curves and QC samples were freshly prepared and analyzed with each batch of human plasma.

Precision and accuracy

The precision and accuracy intra and inter-batch were assessed by using human plasma spiked with three different concentrations (100, 1500 and 3000 ng/mL) with replicate analysis ($n = 8$) on three consecutive days. The concentration of each sample was determined using freshly prepared calibration standards. The precision was expressed as the relative standard deviation (RSD) and the accuracy as relative error (RE) with an acceptable accuracy and precision within $\pm 15\%$ ²².

Stability

The stability of 3-OMD were evaluated by analysis of QC samples at two concentrations of 100 and 3000 ng/mL in eight replicates. The autosampler's stability was also determined by analyzing extracted QC samples kept under autosampler conditions ($+7^\circ\text{C}$) for 48 h. Room temperature stability and long-term stability were assessed using untreated QC samples kept at room temperature for 6 h and stored at -70°C for 683 days, respectively. After eight freezing/thaw cycles (-70°C / room temperature) on consecutive days, QC samples were processed and analyzed to determine the freeze-thaw stability. Samples were considered to be stable if their assay values were within the range of 15 % of the nominal values²².

Standard stock solution stability at room temperature in white light under laboratory conditions and refrigerated conditions for 3-OMD and CBDP was performed as part of the method development process. The results showed good stability for 60 days under refrigerated conditions to 3-OMD and for 21 days to CBDP.

Specificity and carry-over

The specificity was assessed by comparing chromatograms of six

different batches of blank plasma, including one lipemic, one hemolysate and four normal plasmas from different sources. The chromatograms were compared with those obtained from the analysis of the mobile phase fortified with 3-OMD (50 ng/mL) and carbidopa (1000 ng/mL) to ensure no interference in the analyte analysis. The carryover was measured by comparing the peak areas of drug-free plasma injected after the sampling of 3-OMD (4000 ng/mL) by three consecutive times. The endogenous interference of the anticoagulant (heparin) in plasma samples was evaluated.

Pharmacokinetics study

The pharmacokinetics study was conducted in 60 healthy volunteers after a single-dose, randomized with 2-periods, crossover, of two formulations test and reference of levodopa + benserazide (200 + 50 mg). The clinical study was conducted by a collaborative laboratory and its clinic protocol was approved by the Ethics Committee (license: 892/2008, Unicamp, Campinas - São Paulo, Brazil,). All subjects gave written informed consent. The washout time between two periods was 9 days (216 hours). The blood samples were collected into amber tubes, using heparin as anticoagulant at pre-dose,

0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.33, 2.66, 3, 3.5, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 16, 24, 48, 72, 96 and 120 h post-dosing. Samples were centrifuged at 4884 *g* for 10 min in 4° C and the plasma was separated and stored at -70° C until analysis.

Pharmacokinetics parameters for the human plasma samples were calculated by a non-compartmental statistics model using WinNonlin™ program (Version 5.3, Microsoft excel, 2003). Plasma samples were taken for a period of 3 to 5 times under the concentration time curve (AUC) ratio higher than 80 %, as per FDA guidelines. Plasma 3-OMD concentration–time profiles were visually inspected, and C_{max} and T_{max} values were determined.

The AUC_{0-t} was obtained by the trapezoidal method. $AUC_{0-\infty}$ was calculated up to the last measureable concentration and extrapolations were obtained using the last measureable concentration, and the terminal elimination rate constant (K_e). K_e was estimated from the slope of the terminal exponential phase of the plasma of the 3-OMD concentration–time curve by the linear regression method. The terminal elimination half-life $t_{1/2}$, was then calculated as $0.693 / K_e$. Regarding AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$ and C_{max} bioequivalence was assessed by analysis

of variance (ANOVA) and by calculating the standard 90 % confidence intervals (90 % CIs) of the ratio's test/reference (logarithmically transformed data). The bioequivalence was considered when the ratio of averages of log transformed data was within 80 – 125 % for AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$ and C_{max} .

RESULTS AND DISCUSSION

Method development

Chromatographic and mass spectrum

The MS spectra of 3-OMD and CBDP were recorded in positive ion mode. The parameters were optimized for best response by directly infusing standard solutions of 3-OMD and CBDP at flow rate of 20 μ L/min through syringe pump. The best analysis conditions were achieved using a mixture of water/methanol/formic acid at ratio of 85:15:0.05% (v/v/v).

Different types of columns (Atlantis T3, Pursuit C18, OmniSpher C18, monoChrom 5 μ MS) were evaluated and the Atlantis T3 column was selected due to the best chromatographic separation from endogenous compounds under our experimental conditions and contributed to significant reduction of matrix effect due to its high performance with low proportion of

solvents in our experiments. The choice of the column also was based in the possibility of use high proportions of aqueous phase with water, which allows the best chromatographic peak shape. Other factor that also contributed for choice of analytical column was the pH of the plasma samples treated with perchloric acid in step of extraction.

In this study, neither additive was used to pH adjustment (neutralization) after precipitation of perchlorate in the extraction process, different from what the literature describes to similar procedures^{13, 14}.

The retention time and good peak shape of the analyte and internal standard on our analytical conditions, demonstrate the advantage of present high-throughput method when compared to similar extraction methods in recent literature^{9,10,13,18,24}.

The literature shows that as methyldopa much as CBDP could be used as internal standards due to their chemical similarities to 3-OMD and levodopa (5). In our study, methyldopa could not be used as internal standard because your mass fragment are equal to monitored by 3-OMD.

Under the selected chromatographic conditions, CBDP was chosen as I.S. due to its high sensitivity, similar chromatographic and mass

spectrometric behavior in relation to analyte. 3-OMD and CBDP was eluted and well resolved chromatographic at retention times of 4.06 min and 4.04 min, respectively (FIGURE 2 E and 2 F).

Selectivity

The analysis of the six different human blank plasma samples (one hemolysate, one lipemic and four normal) was evaluated by analyzing the specificity. No interference peaks from endogenous compounds were observed at the retention time of the analyte and I.S (FIGURES 2 A and 2 B). The total run time was 5 min, corresponding to an shorter analysis time than most of the analytical methods in the literature ^{5,10,11,13,14}.

Linearity and limit of quantification

A calibration curve was tested during the method validation and has shown to be linear over the concentration range of 50 – 4000 ng/mL with a weight factor $1/x^2$, which could cover all clinical concentrations of 3-OMD used in this study (TABLE I). The linear equations of the calibration curves showed $r = 0.998484$.

The lower limit of quantification (LLOQ) to 3-OMD in human plasma under our experimental conditions was

50 ng/mL (FIGURES 2 C and 2 D), one of the lowest LLOQ reported in literature of which four of these were carried out by mass spectrometry (5). The mean precision and accuracy at LLOQ were 6.12 % and 99.04 %, respectively. With this LLOQ (50 ng/mL), the present method was very sensitive to detect 3-OMD in human plasma even 120 h after a single oral administration of levodopa + benserazide (200 + 50 mg) in this bioequivalence study.

Precision and accuracy of quality control Standards

Intra-batch, inter-batch precision and accuracy were evaluated by analyzing eight replicate quality control samples at four different concentration levels of 50, 100, 1500 and 3000 ng/mL over three validation days. Full results are shown in TABLE II, where it could be seen that the intra-batch precision measured by coefficient of variation, CV, was 6.12 %, 3.04 %, 3.28 % and 3.55 %, respectively. The precision and accuracy were according to the acceptable criteria recommended by ANVISA²². The precision at each concentration level did not exceed a CV of 15 % and its accuracy is within the range established (i.e. 85 - 115 %) for each concentration level tested.

Recovery

The mean extraction recoveries of 3-OMD (n=8) was 85.57 %, 88.57 %, 88.17 % at concentrations of 50, 1500 and 3000 ng/mL, respectively and was 92.40 %, 87.11 %, 87.82 % for CBDP (I.S) (TABLE II).

Stability (Freeze-thaw, Auto sampler, Room temperature, Long term, standard solutions)

The stability of 3-OMD was evaluated after 8 freeze-thaw (-70° C to room temperature) cycles. No significant degradation of 3-OMD was observed even after a 48 h of storage period in the autosampler tray (+7° C), and the final concentrations of 3-OMD ranged from 1.04 to 3.95 %. In addition, the long-term stability of 3-OMD in QC samples after 683 days of storage at -70° C was also evaluated. The concentrations ranged from -6.46 % to 7.73 % (TABLE III). These results confirmed the stability of 3-OMD in human plasma for at least 683 days at -70° C. The stability of standard working solutions of 3-OMD and CBDO were evaluated for periods of 06 hours under the temperature of + 22° C and under refrigeration at -70° C. In these two studies no significant degradation was

observed for both the analyte and for the internal standard.(TABLE IV)

Application to a bioequivalence study in healthy subjects

The analytical method was validated and used in the bioequivalence study of two formulations of levodopa + benzerazide. The plasma concentrations of 60 volunteers participated in the study was obtained after the administration of the test and reference formulations is shown in figure 3. The final results confirmed that the two preparations are bioequivalent according to their rate of absorption and distribution.

CONCLUSION

A HPLC-MS/MS method for the quantification of metabolite 3-OMD in human plasma was developed and validated and also was successfully applied to a bioequivalence study of two levodopa+benserazide formulations. The described method showed good specificity, precision, accuracy and linearity over the range of 50 – 4000 ng/mL. This method provided a simple sample preparation using protein precipitation with perchloric acid. The established LLOQ of 50 ng/mL was adequate to determine the 3-OMD concentrations in human plasma until

120 h after oral administration of levodopa + benserazide (200 + 50 mg) formulations.

No significant interferences caused by endogenous compounds were observed. The method was successfully applied to demonstrate the bioequivalence of test and reference formulation in a pharmacokinetic study and resents a

small run time and high selectivity and sensitivity.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge all volunteers, analysts, and technicians of laboratory with participated in this study. Thanks are due to Fiocruz and CNPq for financial support (407563/2012-1/CNPq).

Table I. Precision and accuracy data of back calculated concentrations of calibration samples for 3-O-methyldopa in plasma (two replicates per batch)

Analyte	Nominal concentration (ng/mL)	Observed concentration (ng/mL, mean $\pm$ S.D.)	Precision (%R.S.D.)	Accuracy (%)
3-O-methyldopa	50	52.17 $\pm$ 4.70	9.01	104.33
	100	91.54 $\pm$ 6.68	7.29	91.54
	250	245.03 $\pm$ 9.37	3.83	98.01
	500	491.06 $\pm$ 16.71	3.40	98.21
	750	793.24 $\pm$ 35.42	4.59	105.77
	1500	1546.68 $\pm$ 22.32	1.44	103.11
	3000	3088.94 $\pm$ 98.09	3.18	102.96
	4000	3845.21 $\pm$ 91.60	2.38	96.13

S.D. = standard deviation; R.S.D. = relative standard deviation.

Table II. Precision, accuracy and recovery data for the assay of 3-O-methyldopa by LC-MS/MS

Validation parameters	3-O-methyldopa quality control concentration (ng/mL)			
	50	100	1500	3000
Precision (R.S.D.%)				
Intra-run (n = 8)	6.12	3.04	3.28	3.55
Inter-run(n = 24)	-----	5.31	2.28	0.55
Accuracy (%)				
Intra-run (n = 8)	99.04	94.80	101.96	100.85
Inter-run(n = 24)	-----	90.59	100.52	100.76
Recovery (%) (n = 8)	-----	85.57	88.57	88.17

Table III. Stability of human plasma samples of 3-O-methyldopa under various storage conditions (n = 8).

Stability	Measured concentration (ng.mL ⁻¹)	Mean Fresh samples	R.S.D.(%)	Mean Stability samples	R.S.D.(%)	Assay values (%)
Post-preparative stability (48 h, +7° C)	100	85.34	8.77	88.71 ^a	6.09	3.95
	3000	2945.89	3.98	2976.43 ^a	5.39	1.04
Long-term stability (683 days, -70° C)	100	99.84	7.97	107.55 ^c	5.74	7.73
	3000	3280.34	11.92	3068.29 ^c	3.87	-6.46
Freeze-thaw stability (eight cycles – 192 h, -70° C)	100	103.34	7.08	97.99 ^b	8.04	-5.18
	3000	3042.27	4.60	2941.82 ^b	4.41	-3.30
Short-term stability (6 h, room temperature)	100	99.95	5.72	98.81 ^c	8.97	-1.15
	3000	3091.24	3.79	3037.44 ^c	2.40	-1.74

^a After 48 hours. ^b after 192 hours. ^cafter 6 hours, ^aMean of eight replicates,^bRSD = Relative standard deviation.

Table IV. Stability of standard solutions of 3-O-methyldopa and carbidopa (IS) under various storage conditions (n = 8).

Stability	Measured concentration (ng.mL ⁻¹)	Mean Fresh samples	R.S.D.(%)	Mean Stability samples	R.S.D.(%)	Assay values (%)
Short-term stability (6 h, +22° C)	100	386980	7.83	402360 ^a	7.27	3.97
	3000	15951875	3.56	15914073 ^a	4.78	0.24
Long-term stability (504 h, -70° C)	100	462974	4.20	528130 ^b	4.41	14.07
	3000	14920971	4.02	14252217 ^b	3.93	-4.48
Short-term stability - IS (6 h, +22° C)	1000	19518767	7.06	21757856 ^c	3.03	11.47
	1000	20447741	2.67	22277215 ^c	4.56	8.95
Long-term stability - IS (1436 h, -70° C)	1000	14913181	3.96	15881694 ^d	4.83	6.49
	1000	16429345	6.59	16187390 ^d	4.61	-1.47

^{a,c} After 6 hours. ^b after 504 hours. ^cafter 6 hours, ^aMean of eight replicates, ^d after 1436 hours, ^bRSD = Relative standard deviation.

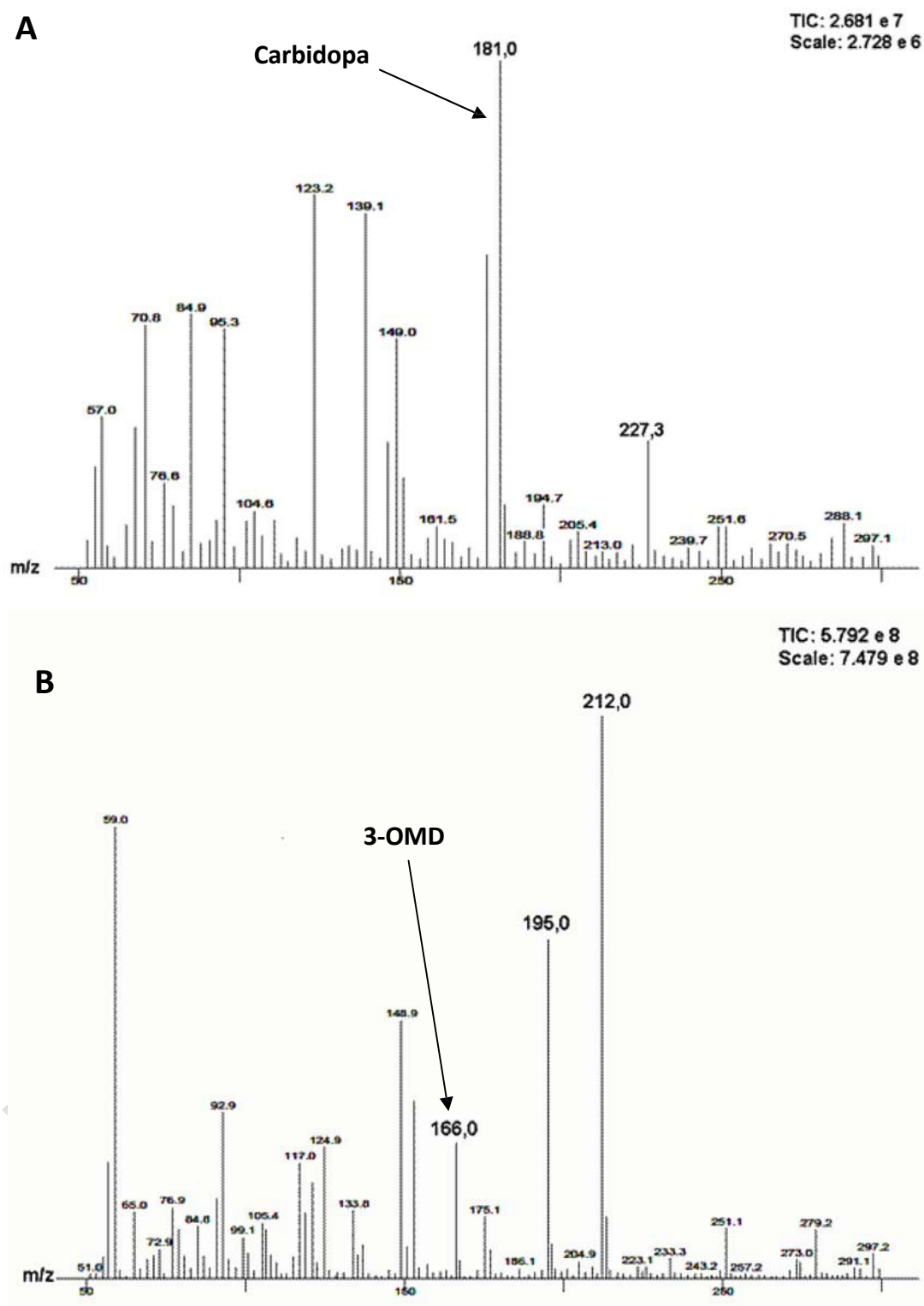


Figure 1. The ion product spectrum of (A) Carbidopa (m / z 181.0) and (B) 3-OMD (m/z 166.0) obtained by electrospray ionization in positive ion mode.

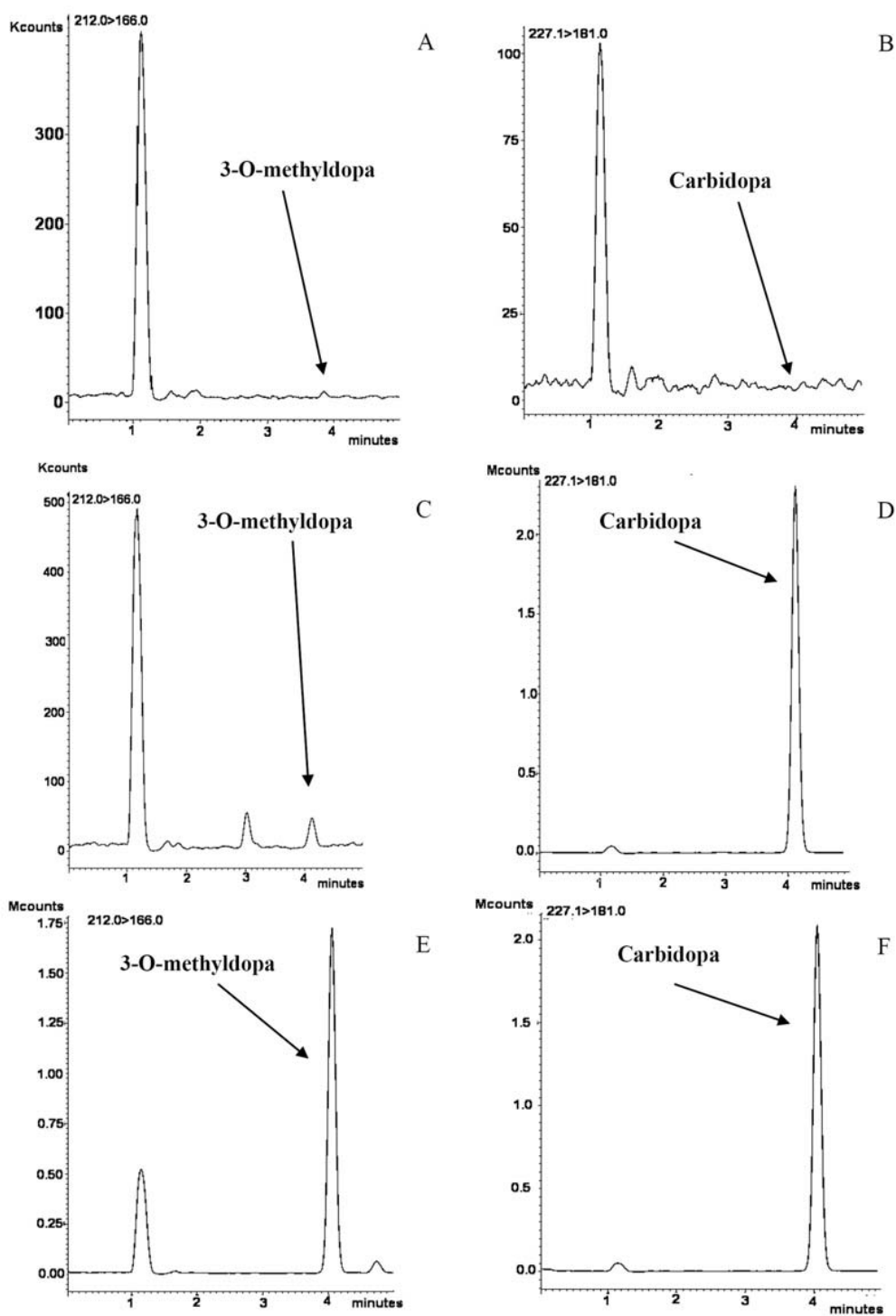


Figure 2. SRM chromatograms of (A and B) blank plasma samples, (C and D) plasma samples spiked with 3-OMD and Carbidopa or (E and F) plasma collected from volunteers 6h after oral administration of Levodopa.

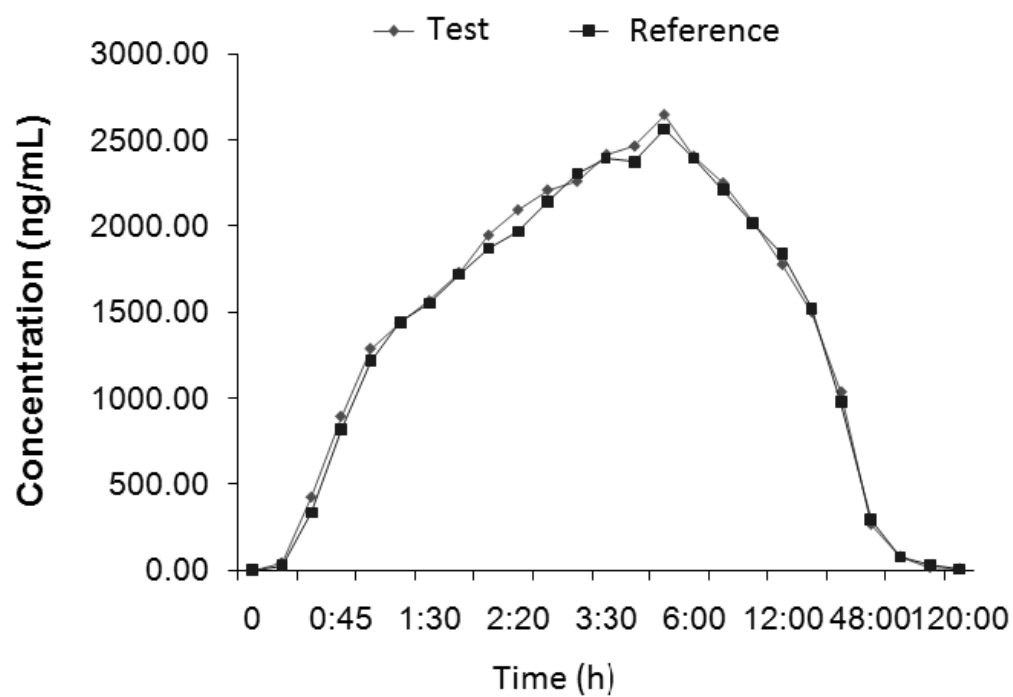


Figure 3. Plasma concentration–time curve of 3-OMD after the oral administration of a single dose of reference and test formulations. (levodopa 200 mg + benserazide 50 mg) in 60 healthy volunteers.

REFERENCES

1. Bugamelli F, Marcheselli C, Barba E, Raggi MA. Determination of L-dopa, carbidopa, 3-O-methyldopa and entacapone in human plasma by HPLC-ED. *J Pharm Biomed Anal.* 2011 Feb 20;54(3):562-7.
2. Galvan A, Wichmann T. Pathophysiology of parkinsonism. *Clin Neurophysiol.* 2008 Jul;119(7):1459-74.
3. Keller GA, Czerniuk P, Bertuola R, Spatz JG, Assefi AR, Di Girolamo G. Comparative bioavailability of 2 tablet formulations of levodopa/benserazide in healthy, fasting volunteers: a single-dose, randomized-sequence, open-label crossover study. *Clin Ther.* 2011 Apr;33(4):500-10.
4. Ensafi A-A, Arabzadeh A, Karimi-Maleh H. Sequential determination of benserazide and levodopa by voltammetric method using chloranil as a mediator. *J Braz Chem Soc.* 2010;21(8):1572-80.
5. Cesar IC, Bastos LF, Godin AM, Coelho Mde M, Araujo DP, de Fatima A, et al. Simultaneous quantitation of nicorandil and its denitrated metabolite in plasma by LC-MS/MS: application for a pharmacokinetic study. *J Mass Spectrom.* 2011 Nov;46(11):1125-30.
6. Lee ES, Chen H, King J, Charlton C. The role of 3-O-methyldopa in the side effects of L-dopa. *Neurochem Res.* 2008 Mar;33(3):401-11.
7. Miller JW, Shukitt-Hale B, Villalobos-Molina R, Nadeau MR, Selhub J, Joseph JA. Effect of L-Dopa and the catechol-O-methyltransferase inhibitor Ro 41-0960 on sulfur amino acid metabolites in rats. *Clin Neuropharmacol.* 1997 Feb;20(1):55-66.
8. Longhi JG, Perez E, Lima JJd, Cândido LMB. In vitro evaluation of *Mucuna pruriens* (L.) DC. antioxidant activity. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2011;47(3):535-44.
9. César IC, Byrro RMD, Cardoso FFdSeS, Mundim IM, Teixeira LdS, Gomes SA, et al. Development and validation of a high-performance liquid chromatography– electrospray ionization–MS/MS method for the simultaneous quantitation of levodopa and carbidopa in human plasma. *J Mass Spectrom.* 2011;46:943-8.
10. Lv L, Jiang W, Zhou S, Huang X, Shi X, Lv C, et al. LC–MS–MS Simultaneous Determination of L-Dopa and Its Prodrug L-Dopa n-Pentyl Ester Hydrochloride in Rat Plasma. *Chromatographia.* 2010;72(3):239-43.
11. Jiang W, Lv L, Zhou S, Huang X, Shi X, Lv C, et al. Simultaneous determination of L-dopa and its prodrug (S)-4-(2-acetamido-3-ethoxy-3-oxopropyl)-1,2-phenylene diacetate in rat plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal.* 2010 Nov 2;53(3):751-4.
12. Jonkers N, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y. Benserazide decreases central AADC activity, extracellular dopamine levels and levodopa decarboxylation in striatum of the rat. *J Neural Transm.* 2001;108:559-70.
13. Karimi M, Carl JL, Loftin S, Perlmutter JS. Modified high-performance liquid chromatography with electrochemical detection method for plasma measurement of levodopa, 3-O-methyldopa, dopamine, carbidopa and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid. *J Chromatogr, B: Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2006 May 19;836(1-2):120-3.
14. Muzzi C, Bertocci E, Terzuoli L, Porcelli B, Ciari I, Pagani R, et al. Simultaneous determination of serum concentrations of levodopa, dopamine, 3-

- O-methyldopa and alpha-methyldopa by HPLC. *Biomed Pharmacother.* 2008 Apr-May;62(4):253-8.
15. Tolokan A, Klebovich I, Balogh-Nemes K, Horvai G. Automated determination of levodopa and carbidopa in plasma by high-performance liquid chromatography-electrochemical detection using an on-line flow injection analysis sample pretreatment unit. *J Chromatogr, B: Biomed Sci Appl* 1997 Sep 26;698(1-2):201-7.
 16. Kim TH, Cho KH, Jung WS, Lee MS. Herbal Medicines for Parkinson's Disease: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *PLoS ONE.* 2012;7(5):e35695.
 17. Massano J, Garrett C. Deep brain stimulation and cognitive decline in Parkinson's disease: a clinical review. *Frontiers in Neurology.* 2012;3(66):1-13.
 18. Pan L, Guo Y, Li Z, Chen J, Jiang T, Yu Y. Simultaneous Determination of Levodopa, Benserazide and 3-O-Methyldopa in Human Serum by LC-MS-MS. *Chromatographia.* 2010;72(7):627-33.
 19. Bedor DCG, Filho JHdS, Ramos VLS, Gonçalves TM, Sousa CEMd, Santana DPd. A sensitive and robust LC-MS/MS method with monolithic column and electrospray ionization for the quantitation of efavirenz in human plasma: application to a bioequivalence study. *Quím Nova.* 2011;34 6.
 20. Dalmora SL, Sangoi MdS, Nogueira DR, D'Avila FB, Moreno RA, Sverdloff CE, et al. Determination of phenobarbital in human plasma by a specific liquid chromatography method: application to a bioequivalence study. *Quím Nova.* 2010 33:1.
 21. Igarashi K, Hotta K, Kasuya F, Abe K, Sakoda S. Determination of cabergoline and L-dopa in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B.* 2003;792:55-61.
 22. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Aprova o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Oficial da União Brasília (DF);* 2 jun 2003; Seção 1
 23. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. *Diário Oficial da União, Brasília (DF);* 22 mai 2012; seção 1
 24. Saxer C, Niina M, Nakashima A, Nagae Y, Masuda N. Simultaneous determination of levodopa and 3-O-methyldopa in human plasma by liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr, B: Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004 Apr 5;802(2):299-305.

3.3 ARTIGO 3:

O artigo 3 está em processo de submissão na revista Accreditation Quality Assurance. O trabalho apresenta o desenvolvimento e implementação do Sistema de Gestão da qualidade, como um conjunto de recursos e regras mínimas, com o objetivo de orientar cada parte da empresa para que execute de maneira correta e no tempo devido a sua tarefa, em harmonia com as outras partes, estando todas direcionadas para o objetivo comum da empresa: a Qualidade Total para a manutenção da certificação do centro de bioequivalência da FIOCRUZ.

Foram descritas as ferramentas de Controle da Qualidade, através da distribuição da Qualidade em seis núcleos de controle, baseados nos Círculos de Controles de Qualidade, originados no Japão, por volta de 1962, criada pelo Professor Kaoru Ishikawa.

A análise gerou formulação de indicadores de qualidade, que serão utilizados como medição dos procedimentos para novas propostas de melhorias contínuas, em busca da qualidade total.

Accreditation and Quality Assurance

Total quality control used in bioequivalence studies to obtain certification for the bioequivalence center of FIOCRUZ

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Total quality control used in bioequivalence studies to obtain certification for the bioequivalence center of FIOCRUZ
Article Type:	Practitioner's Report
Keywords:	Bioequivalence study; Quality Management System; Total Quality Control
Corresponding Author:	Heliana Martins Pereira, Ph.D. Fundação Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, Rio de Janeiro BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Fundação Oswaldo Cruz
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Heliana Martins Pereira, Ph.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Heliana Martins Pereira, Ph.D.
	Ana Paula da Silva da Costa dos Santos, Bachelor's Degree
	Douglas Pereira Pinto, Master's Degree
	Laís Bastos da Fonseca, Ph.D.
	Fábio Coelho Amendoeira, Ph.D.
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	The availability of generic drugs and drugs similar to generic drugs is of great relevance to the public health system. Thus, various dynamic approaches should be developed to assure the quality of these drugs and ensure that these drugs will be launched in the market and will have the same characteristics and physicochemical properties as that of the reference drug. The analytical references describe the development of bioanalytical and analytical methodologies for the pharmaceutical industry about studies on bioequivalence; however, few studies have reported models or use of tools for improving quality in the analytical phase of these studies. A quality system applied in these studies is crucial for the study to be accepted by the National Health Surveillance Agency (ANVISA), the agency responsible for granting the registration of generic and similar drugs in Brazil. These drugs are not only intended to be sold at a lower price but also expected to have their quality assured using rigid models and control methods. This study aimed to describe the implementation of a quality management system (QMS) based on total quality control (TQC), a Japanese model, in the analytical phase of bioequivalence studies. The implementation was performed at the Laboratory of Pharmacokinetics - LAB-SEFAR, bioequivalence center of FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

Total quality control used in bioequivalence studies to obtain certification for the bioequivalence center of FIOCRUZ

Heliana Martins PEREIRA^{1*}, Ana Paula da Silva da Costa dos Santos¹, Laís Bastos da Fonseca¹, Douglas Pereira Pinto¹, Fábio Coelho AMENDOEIRA²

¹Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Farmacocinética, Rio de Janeiro - RJ, Brazil, (21) 3865-9568, sefar@fiocruz.br.

²Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica, Laboratório de Farmacologia, Rio de Janeiro - RJ, Brazil, (21)38655281, fabio.amendoeira@incqs.fiocruz.br.

*Correspondence: Heliana Martins Pereira, Laboratório de Farmacocinética, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brazil 4365, 21040-900, Manguinhos, Rio de Janeiro - RJ, Brazil, e-mail: heliana_sefar@fiocruz.br, Fax number: (21) 38659529

Abstract

The availability of generic drugs and drugs similar to generic drugs is of great relevance to the public health system. Thus, various dynamic approaches should be developed to assure the quality of these drugs and ensure that these drugs will be launched in the market and will have the same characteristics and physicochemical properties as that of the reference drug. The analytical references describe the development of bioanalytical and analytical methodologies for the pharmaceutical industry about studies on bioequivalence; however, few studies have reported models or use of tools for improving quality in the analytical phase of these studies. A quality system applied in these studies is crucial for the study to be accepted by the National Health Surveillance Agency (ANVISA), the agency responsible for granting the registration of generic and similar drugs in Brazil. These drugs are not only intended to be sold at a lower price but also expected to have their quality assured using rigid models and control methods. This study aimed to describe the implementation of a quality management system (QMS) based on total quality control (TQC), a Japanese model, in the analytical phase of bioequivalence studies. The implementation was performed at the Laboratory of Pharmacokinetics - LAB-SEFAR, bioequivalence center of FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

Keywords: Bioequivalence study •Quality Management System •Total Quality Control

Introduction

Registration of a drug as a generic drug in Brazil requires that a series of analytical tests regulated by laws and resolutions of the Ministry of Health be performed. These tests can only be performed accurately at research centers certified by the National Health Surveillance Agency - Ministry of Health (ANVISA/MS). One of the most important tests is the bioequivalence study, which involves a comparison between two drugs of the same pharmaceutical form and composition, one of them is the reference drug, also known as an innovator, used as a comparator, and another drug known as the test drug, whose bioequivalence with the reference drug needs to be established. The availability of generic drugs and other drugs similar to generic drugs is of considerable relevance to the public health and is important from a socioeconomic aspect. Thus, various dynamic approaches and methods should be developed for assuring the quality of these drugs and to ensure that these drugs will be launched in the market and will have the same characteristics and physicochemical properties as those of the reference drug. The analytical references describe work related to the development of analytical methodologies and bioanalytical for the pharmaceutical industry, regarding bioequivalence studies and analytical stability, using specific methods and equipment, however, there is noticeably the absence of papers that present models or quality assurance to the analytical phase of these studies. This fact is essential for the study to be accepted by the National Health Surveillance Agency (ANVISA) and reaches its main objective which is the availability of generic medicines to the population, not just the lowest price, but with the quality assured by methods and strict control models. The ultimate goal of the ANVISA is that generic drugs reach the population fast after having their quality assured using rigid models and quality control methods.

Quality is a dynamic and daily process, and maintaining quality is a challenge for technological and scientific development. Moreover, quality has become a factor for competitiveness between laboratories and companies. In the recent years, the concern about quality-related aspects has increased because of the creation of the internal European market accompanied by globalization of the economy and introduction of free trade and a simultaneous increase in consumer awareness. Implementation of a quality system enables companies to be more organized and have more efficient methods of operation, thereby leading to greater profitability.

This study aimed to describe the implementation of a quality management system (QMS) based on total quality control, a Japanese model, applied to the analytical phase of bioequivalence studies. The implementation was performed at the Laboratory of Pharmacokinetics - LAB-SEFAR, bioequivalence center of FIOCRUZ, the only center in Rio de Janeiro, Brazil. The LAB-SEFAR occupies an important strategic position for FIOCRUZ and the Ministry of Health in the context of health care of the population, because it assists in the consolidation of one of the main pillars of the National Drug Policy of the Ministry of Health, the generic drug program. The laboratory belongs to the structure of the Vice President of Production and Innovation in Health since 2010, and several actions have been taken for obtaining recertification of the center by ANVISA.

The World Health Organization (WHO) defines bioavailability as the rate and extent of absorption of a drug from a dosage form from a concentration-time curve in the systemic circulation or its excretion in the urine; the same definition is adopted by ANVISA [1].

According to the FDA (2002), bioequivalence is defined no significant difference in the rate and extent by which this equivalent or pharmaceutical alternatives becomes available drug at the site of action when administered at the same molar dose under similar conditions in a properly planned test [2].

A bioequivalence study designed to compare the bioavailability of two or more formulations of the same drug, which are considered to be equivalent and have been administered in the same manner as the molar formulations may be considered interchangeable dose.

According to the resolution - RE nº 1.170, 19 April 2006- guide to tests of relative bioavailability/bioequivalence of drugs, the bioequivalence study involves three steps: clinical, analytical, and statistical [3].

The clinical stage comprises the recruitment and selection of volunteers, administration of medication, and collection of samples for analyzes related to the study and clinical monitoring of the volunteers before and after the study. The analytical phase includes the analysis of samples collected in the clinical stage and quantification of the drug in its unchanged form and/or its active metabolite by using validated bioanalytical methods developed in the laboratory or obtained from appropriate textbooks and literature according to the current legislation and regulation. The statistical step involves analysis of data obtained in the analytical step and calculation of pharmacokinetic parameters such as area under the curve (AUC_{0-t}), peak drug concentration (C_{max}), time to achieve C_{max} (T_{max}), and other parameters such as elimination half-life (T_{1/2}) and elimination rate constant (K_{el}), and the assessment of bioequivalence and bioavailability through confidence intervals and hypothesis testing by using software tools such as spreadsheets and their validation. All activities were performed in three stages and proof of

traceability tools was submitted, to allow the safe and reliable recovery of data from the study [4]. Bioequivalence studies can only be performed at centers certified by ANVISA [5]. The resolution - RDC N° 56, October 8, 2014, provides for the Certification of Good Practice for conducting bioavailability/bioequivalence studies of drugs.

The regulatory backbone for bioequivalence studies has its origins in the principles of Good Laboratory Practices (GLP) and Good Clinical Practices (GCP). Bioequivalence studies, pharmacokinetics studies, and/or pharmacodynamics studies are non-therapeutic studies.

The essence of a quality system is that the quality has to be delivered by all workers, and the role of the quality personnel is ensuring that it happens. The bioequivalence study is generally related to the installation of a system, which points to the need of a synergy between quality control (QC) and quality assurance (QA) [6].

Total quality control (TQC) is an administrative system perfected in Japan from American ideas introduced there after World War II. TQC, as practiced in Japan, is based on the participation of all sectors of the company and all the employees in the study and ensuring quality.

In the era of total quality, the emphasis is on the quality system. In this approach, the quality is not just about the product or service is not only a responsibility of the quality department, but quality is an important issue for all employees and covers all aspects of company operations. In other words, quality is a systemic matter. Ensuring quality of the system ensures total quality [7].

In the 80s, the quality control circles (QCCs) was disseminate on Brazilian companies through a total quality management programs as alternatives to participatory management and continuous improvement. Campos (2004) emphasizes that the QCCs are an extension of the practice of quality control at the level of operators, and operators can exercise control via QCC groups, which proposes changes to operating procedures by troubleshooting. The participation of QCCs occurs in the initial stages, and it plays a role in solving small problems in the work environment using the plan do check act (PDCA) cycle (Deming Cycle), and eventually, once the worker gains experience in the activities of the circles, the QCC then solves problems, which might be arising from the top management or the management unit [8].

The PDCA cycle (Figure 1), also known as the Shewhart cycle or Deming Cycle is a management tool widely used by companies worldwide. This system was designed by Walter A. Shewhart and widely publicized by William E. Deming. The PDCA cycle has the initial stage of action planning (P), after everything is planned, the action is executed (D), and then the implemented actions are constantly checked (C). On the basis of this analysis and comparing the actions with what was planned, the manager then begins to implement measures to correct the faults that have arisen in the process or product, proposing continuous improvements (A).

The principles of total quality state that QA is a function of the company that aims to confirm that all quality activities are being conducted in the required manner. QA is achieved by correct and stubborn management (through the PDCA) of all quality activities for each project and process, systematically checking to eliminate the flaws, constant preoccupation with total satisfaction of consumer needs, and participation and responsibility of everyone in the company. Juran (1979) defines QA as the activity of providing stakeholders the evidence needed to establish confidence that the quality function is being conducted properly [9].

Quality Control in the context of TQC, is to exercise control over the dimensions of quality, focusing on process control, aiming to ensure the quality of their final product for the internal and external customer. TQC and QA cannot happen without the dedicated and methodical participation of all sectors and workers practicing QC.

Implementation of the QMS

Implementation of the QMS required participation of the entire organization in maintaining the quality and implementing QA and QC for conducting bioequivalence studies. In this context, this work has proposed a quality evaluation that is not limited to the assessments described in the standards of GLPs, which are necessary for conducting bioequivalence studies, as well as the specific laws previously quoted, but proposes to assess the quality, which is understood from a development of a good bioanalytical methodology to audit the final reports of the study and provision of drug bioequivalent to the population.

Previous studies have indicated the overall importance of implementing a QMS in companies. However, previous studies have not proposed a method for implementing the QMS based on TQC for bioequivalence studies. This finding shows the importance of our work, innovative character, for laboratories and centers wishing to achieve certification and customer satisfaction in its totality. According Benoliel (1999), quality is a daily, on-going challenge, which contributes to technological and

scientific development. Quality has also become a factor of competitiveness between laboratories and companies. In the recent years, the concern about quality-related aspects has increased as a result of the creation of the internal European Market accompanied by globalization of the economy and free trade, and a simultaneous increase in consumer awareness. Here, he present the aspects that should be taken into account in the step-by-step implementation of a QMS, and he describe the requirements for the operation of accredited laboratories in accordance with European Standard EN 45001. However, this study only provides a theoretical explanation of general aspects of quality, which is different from our previous study that provides a practical implementation of a QMS [10].

The first step was to create QA, and to ensure the quality of the bioequivalence studies, it was necessary to provide evidences that the requirements were met and documented. Grochau and Caten (2012) proposed some general steps for implementing a QMS according to ISO/IEC 17025 to prepare laboratories for accreditation. The authors believe that these suggested steps should help test laboratories, especially those located at teaching and research institutions, to pursue accreditation according to the ISO/IEC 17025, similar to that reported in other studies that have no practical results of accreditation. Our study recognizes the importance of the 17025, but the INMETRO accreditation alone would not confer a significant advantage to the QMS of a bioequivalence center, because of its specificity and the need for a wide view of how the proposed total quality should be implemented in addition to the standards of quality already known [11].

Thus, we defined the scope of quality at LAB-SEFAR by using the principles of total quality, beyond the current references with regard to quality and good practice in bioequivalence studies, such as ISO 9000, ISO 9001, ISO/IEC 17025, and the specific legislation for bioequivalence studies [7, 8, 14, 15]. After defining the scope, a quality manual (QM) was prepared by setting the quality policies and objectives, in accordance with the requirements. Standard operating procedures (SOPs) and all documents necessary to implement a quality system in a certified laboratory were prepared. The organization chart of LAB-SEFAR was defined and several persons were nominated to those positions, and they were assigned the responsibility of certain tasks (Figure 2). The LAB-SEFAR quality policies aim to guide the structure of the QMS and provide the following:

- Increasing confidence to the results obtained in the analytical procedures;
- Meeting the expectations of internal and external customers;
- Complying with technical standards established by the national regulatory agency (ANVISA), with respect to tests of bioequivalence and bioavailability;
- Playing a role in the professional development of its staff by involving them in research projects and Masters and PhD academic programs.
- Searching for total quality, high performance, continuous improvement and excellence, and maintaining effective management of process and information

Before starting the studies, a database tracking study was created with all pertinent and relevant information at each step. The database is filled according to the progress of study and conclusion of each step. The SOPs required by ANVISA for conducting bioequivalence studies were also created before starting the activities, as well as other improvements relating to the management system. Logbooks for all operations and laboratory analyzes were prepared, and a book study with predefined fields, where the records should be made at the time the activities are performed. This information was checked with the available data on the equipment and/or forms available in the laboratory. Was developed a spreadsheet to calculate the parameters of the bioanalytical method validation, according to RDC No. 27 of May 17, 2012, which establishes the minimum requirements for the validation of bioanalytical methods used in studies with the purpose of registration and post-registration of medicines. The database was validated for quality assurance before being put to use. Documents and other QA tools are distributed as shown in Figure 3.

To exercise quality control, distribution of quality into six centers was performed using CCQ's widespread management programs for total quality in the 80s in Brazilian companies as reference, as alternatives to participatory management and continuous improvement. Through the centers listed below, it will be possible for operators to have control, proposing amendments to operating procedures by the method of problem solving using the PDCA cycle and, over time, gain experience in the activities of the centers. The centers are:

- Control training centre: This center is responsible for ensuring the qualification of professionals who are involved in performing the studies, ensuring that staff involved clearly understand the functions they perform, and that training is provided where required;
- Document control centre: This center controls the preparation, review, distribution, and archiving of the documents, which are part of LAB-SEFAR QMS, namely, standard operating procedures, forms, record books, official bulletins of responsibilities, bioanalytical methods, quality manual, and

spreadsheets. It is responsible for providing all the updated and approved documentation required for the study and ensuring traceability of all records;

- Process control centre: This center monitors the implementation of operational procedures in activity in LAB-SEFAR by monitoring the registers and forms and conducting periodic routine inspections in the laboratory. In addition, this center monitors the equipment and instruments of the LAB-SEFAR controlling registration, maintenance, and calibration or certification, where applicable. It is responsible for ensuring achievement of the processes according to the rules and scope of GLP.
- Quality control centre: This center promotes audits in all studies on LAB-SEFAR, ensuring cohesion and traceability of results, as well as its consistency with the health legislation or any other legal instrument current. It is responsible for compliance of all documents generated in the bioequivalence study, from clinical protocols to the final reports;
- Control non-conformity centre: This center is responsible for monitoring and treatment of non-conformities for continuously improving the quality assurance system. Every occurrence as detected should not be logged and assigned a team of action that will assume responsibility for reviewing the recorded occurrence, propose corrective and/or preventive measures and implement the proposed actions, according to the analysis of cause and effect. The effectiveness of the actions implemented should be evaluated, ensuring the resolution of the occurrence and not as the continuous improvement of operating systems and/or management.
- Coordination studies centre: This center is responsible for monitoring the stages of the study and customer service. The LAB-SEFAR raises the provision for the establishment and maintenance of a systematic cooperation with its customers, clarifying their doubts about technical matters, matters related to deadlines, and monitoring of services provided by the laboratory.

With participatory management through each center of quality, staff involved exercised control and proposed changes to operating procedures by the method of problem solving using the PDCA cycle for proposals for continuous improvement. The analysis enabled the development of quality indicators that will be used as measurement procedures for new proposals for continuous improvement in pursuit of total quality.

Tayyem et al. reported regulatory requirements and scientific requirements in regulated contract research organizations (CROs) conducting bioequivalence studies. In accordance with this work, they claim that the activities of bioequivalence studies are either general or study related, pointing to the need for a quality control (QC) and quality assurance (QA) dichotomy. This is because in most laboratories, there is a resistance from the lab analysts to follow QA guidelines. In fact, what has to be is a change of culture, and subsequently, a synergy between quality control and quality assurance. Further, the authors claim that the standards of GLP, GMP, and GCP are required by regulatory authorities around the world, with rigorous attention to employee training, detailed and authorized documentation, equipment validation, careful tracking of changes, and routine auditing of compliance [16]. For explaining the result of the implementation of the QMS based on total quality, we present a comparison between the number of occurrences before and after the implementation of the QMS (graphic 1). The indicators show a significant reduction in the number of occurrences found in the audits, which represent a decrease of 77.95% in just five months of work. The occurrences in the audits are all facts that can generate non-conformity or study requirements at ANVISA. Occurrences found in the presented audits were as follows: errors in formatting reports, differences of translated values for the report, divergences between logs and reports, absence of logs and differences of translated values for the spreadsheet plasma concentration. The identification of these occurrences and its due correction allowed that the ANVISA inspection in loco, immediately after the implementation of the QMS has not generated any non-conformity, which allows recertification of bioequivalence center at FIOCRUZ.

Conclusion

Implementation of a QMS, with a focus on overall quality, allowed maintenance of certification of the bioequivalence center of FIOCRUZ, which is the only center authorized by ANVISA for this purpose in Rio de Janeiro and can be used as standard work for other national and/or international centers. The new proposed approach of quality assurance to evaluate drugs during the bioequivalence and bioavailability studies contributed to greater control over the data and analytical reports released, ensuring the reliability of the results, in addition to providing training for all staff in the laboratory with a systemic and harmonious workplace, according to participatory management. In this context, indicators of quality enabled to know and measure the performance of services and assess the need for improvements to the satisfaction of internal and external customers. Thus, the quality of studies increased and the dichotomous view between quality and laboratory decreased, thereby increasing the marketing of generic drugs of assured quality after thorough evaluation using bioavailability and bioequivalence studies.

Acknowledgements

The authors thank all LAB-SEFAR staff and professionals of the Vice President of production and innovation in health for all the support in the study. We thank the professionals INCQS for their partnership at all times.

References

- [1] BRAGA, D. M. **Planejamento e análise de estudos de bioequivalência: comparação de delineamentos do tipo cross-over**. 2008. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.
- [2] GUIDANCE for industry: bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products: general considerations. Rockville, MD: FDA, July, 2002.
- [3] ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução-RE nº. 1170, de 19 de abril de 2006. Determina a publicação do guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, de 24 de abril de 2006.
- [4] CORDEIRO, J. A. R. **Papel do LFM em face da nova realidade do mercado farmacêutico após a lei dos genéricos: ser um centro analítico de bioequivalência e biodisponibilidade credenciado pela Anvisa**. 2009. Monografia (Especialização em *MBA Executivo em Saúde*) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, COOPEAD, Rio de Janeiro, 2009.
- [5] ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Histórico**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/bioequivalencia/historico.htm>>. Acesso em: 28 de outubro de 2010.
- [6] World Health Organization (WHO). Additional Guidance for Organizations Performed in vivo Bioequivalence Studies. Working document QAS/05.120/Rev.1. Draft Revision. November 2005
- [7] CAMPOS, V. F. **TQC Controle da qualidade total (no estilo japonês)**. 8. ed. Belo Horizonte: FCO/UFGM, 2004.
- [8] PESSOA, G. A. **A importância dos círculos de controle da qualidade na gestão participativa e melhoria contínua das organizações**. São Luís: Escola brasileira de administração pública e de empresas. Fundação Getúlio Vargas, 2004. Projeto de pesquisa apresentado no curso de mestrado acadêmico em gestão empresarial.
- [9] JURAN JM (1979) Quality Control Handbook. McGraw-Hill Book. Company, New York.
- [10] Benoliel MJ (1999) Step-by-step implementation of a quality system in the laboratory. Trends Anal Chem 18:632-638.
- [11] Grochau IH and Caten CS (2012) A process approach to ISO/IEC 17025 in the implementation of a quality management system in testing laboratories. Accred Qual Assur 17:519-527
- [12] ISO 9000 – Quality management. Retrieved from http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/management_and_leadership_standards/quality_management.htm.
- [13] ISO 9001 (2008) Quality management systems. Requirements. International Organization for Standardization (ISO), Geneva.
- [14] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO/IEC17025: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração**. Rio de Janeiro, 2005.
- [15] INSTITUTO DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **INMETRO NIT-DICLA-035: Boas práticas de laboratório**. Rio de Janeiro, 2011. INMETRO.
- [16] Tayyem R (2008) Built-in quality systems in regulated contract research organizations (CRO) conducting bioequivalence studies: a regulatory science perspective. Accred Qual Assur 13:473-477.

Figure 1 – The PDCA Cycle or Deming cycle

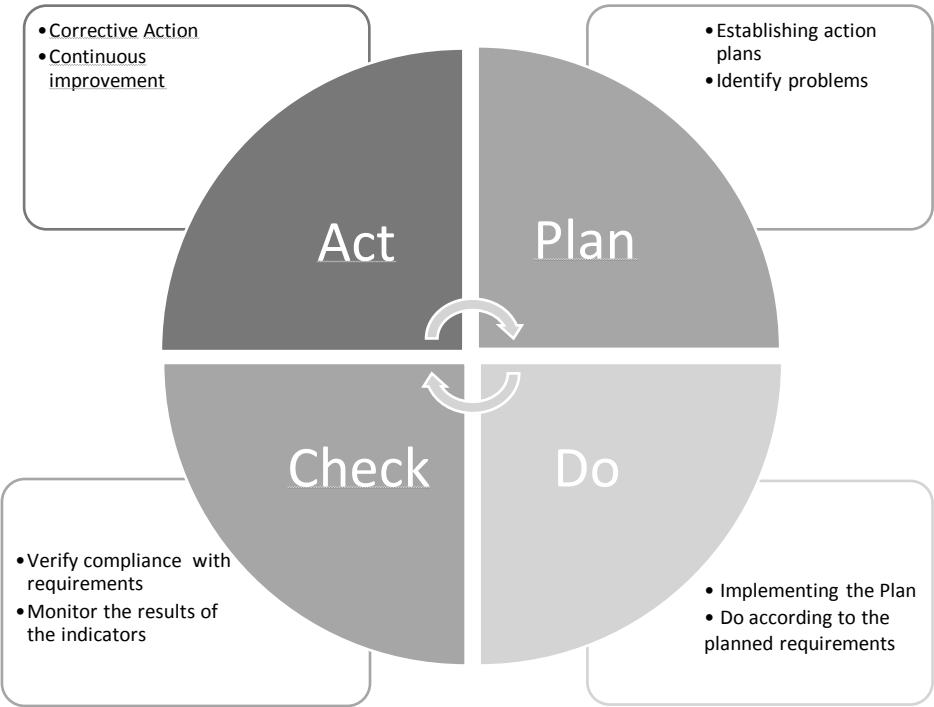


Figure 2 – The organization chart of LAB-SEFAR.

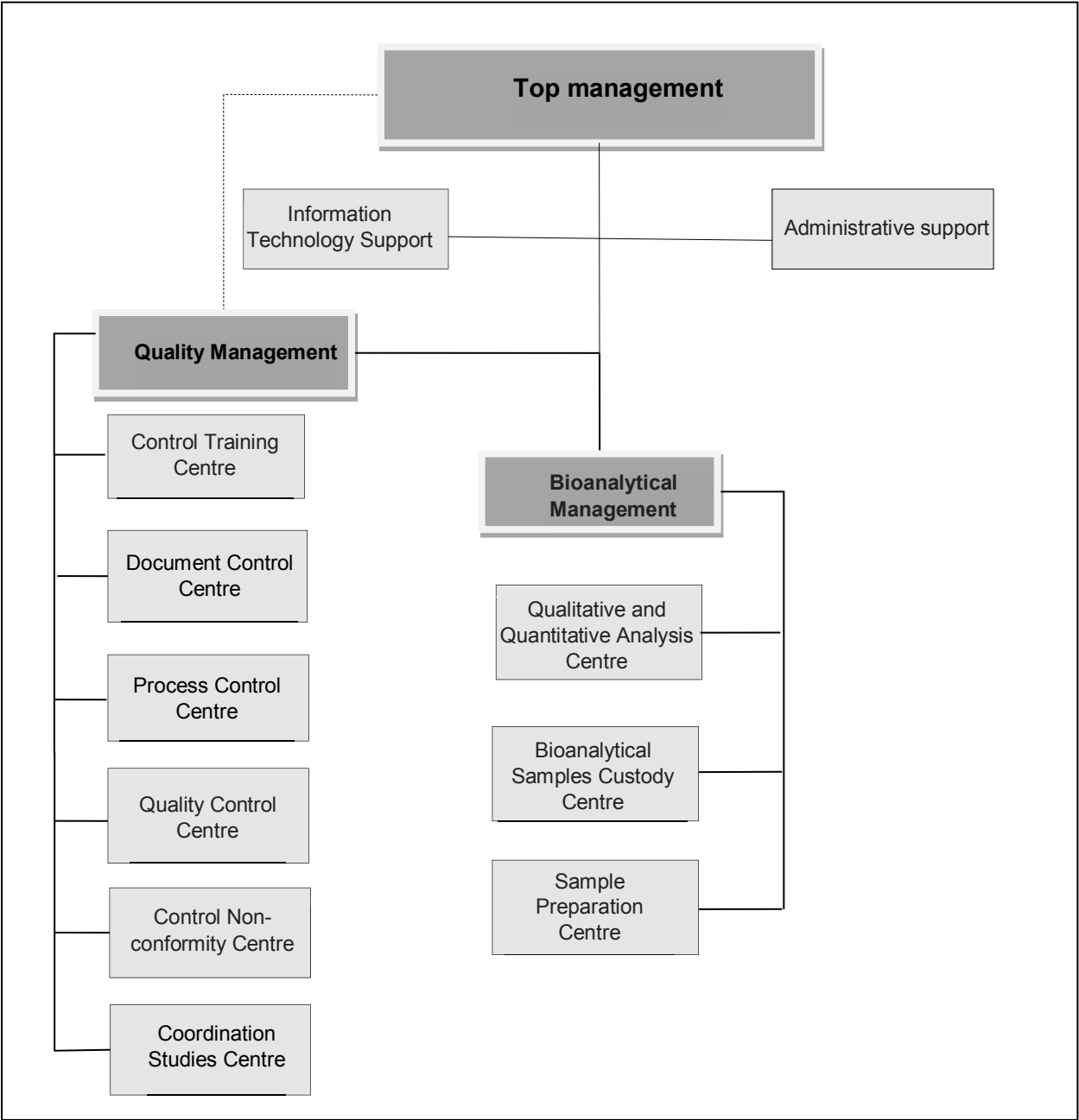
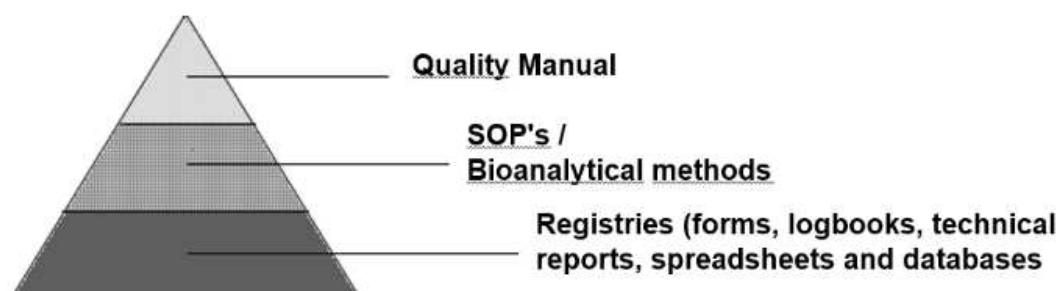
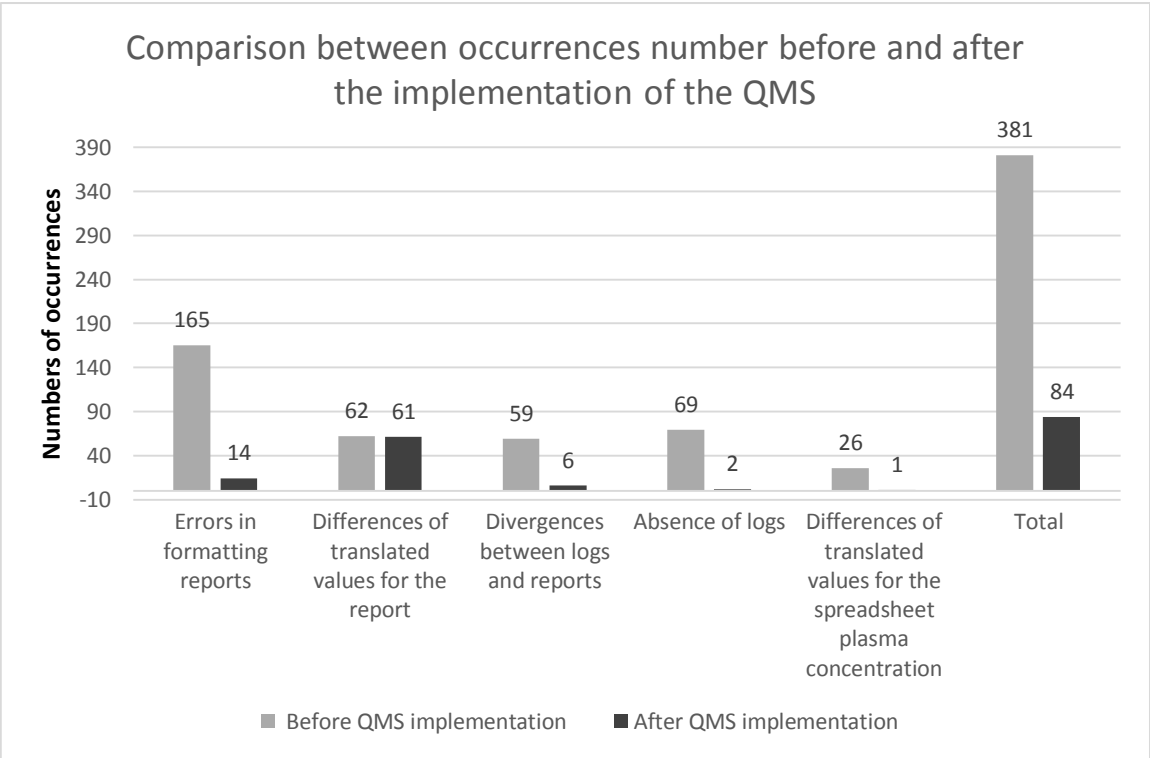


Figure 3 - Distribution of Quality Assurance work tools





Graphic 1 - Occurrences in previous audits the implementation of the QMS. Before QMS implementation = ten audits before the QMS implementation. After QMS implementation = ten audits after 5 months of implementation of the QMS. Absolute numbers of occurrences distributed by type of occurrence.

3.4 INDICADORES DA QUALIDADE

Indicadores são ferramentas de controle e monitoramento específicos de processos. São dados ou informações, preferencialmente numéricos, que representam um determinado fenômeno e que são utilizados para medir um processo ou seus resultados e garantir a eficiência e a eficácia dos processos organizacionais. A eficácia reflete a qualidade e adaptabilidade dos produtos e serviços, ou ainda quão bem as expectativas do cliente estão sendo atendidas frente aos seus requisitos. A eficácia pode ser medida por meio dos resultados alcançados pela organização frente ao que foi planejado.

A eficiência reflete no desempenho interno de produtividade da organização e quão bem os recursos são utilizados. A eficiência pode ser medida pela relação entre os resultados alcançados e os recursos utilizados. Abaixo seguem os resultados que refletem os indicadores do LAB-SEFAR.

3.4.1 Resultados relativos a clientes e mercado

-  % de clientes efetivamente atendidos e abrangidos pelos serviços
-  Índice de satisfação (através da pesquisa de satisfação do cliente)
-  Aquisição de novos clientes
-  Índice de reclamações

3.4.2 Resultados econômico-financeiros para a Instituição

-  Relação entre os recursos planejados e executados
-  Relação entre o executado x metas físicas
-  Redução de custos operacionais
-  Recursos investidos na melhoria dos processos versus recursos recebidos

3.4.3 Resultados relativos às pessoas – Recursos Humanos

-  Absenteísmo

- ✚ Índice de satisfação dos empregados (Colaboradores, Profissionais, Funcionários)
- ✚ Hora do treinamento
- ✚ Eficácia do treinamento
- ✚ Frequência e gravidade de acidentes no trabalho
- ✚ Escolaridade, em %
- ✚ Evolução do profissional (promoções ou desenvolvimento escolar – pós, mestrado, doutorado)
- ✚ Clima organizacional

3.4.4 Resultados relativos aos fornecedores

- ✚ Qualidade dos produtos / serviços prestados
- ✚ Tempo médio de atendimento
- ✚ Índice de requisições atendidas versus requisições feitas
- ✚ Número de horas paradas em decorrência da falta de matérias-primas / materiais / equipamentos a serem adquiridos

3.4.5 Resultados dos processos relativos aos estudos/projetos

- ✚ Quantidade de não-conformidades nos projetos (%)
- ✚ Eficácia dos projetos (entrega no prazo estipulado)
- ✚ Índice de retrabalho
- ✚ Disponibilidade de equipamentos, em %
- ✚ Número de serviços prestados
- ✚ % de não-conformidades em auditorias
- ✚ % de falhas ou de tempo parado devido a falhas
- ✚ Solicitações de orçamento de estudos BD/BE recebidas no LAB-SEFAR
- ✚ Contratos fechados
- ✚ Número de exigências pós-estudo da ANVISA

3.4.6 Resultados relativos à sociedade – Responsabilidade Social

- ✚ Índice de rejeitos

- Indicadores relativos a ações de combate ao desperdício e preservação do meio ambiente
- Número de publicações à sociedade

Estes dados foram consolidados preferencialmente em gráficos e apresentados em reuniões de grupo para análise dos resultados atingidos, avaliação de metas e definição de ações corretivas, sempre que possível e necessário.

4 DISCUSSÃO

Esse trabalho foi desenvolvido diante da necessidade de se obter o aumento da qualidade dos estudos de BD/BE, necessários para o registro de medicamentos genéricos e similares e para a recertificação do centro de bioequivalência da FIOCRUZ. No que se refere ao objetivo principal do trabalho, foi necessário ampliar o conhecimento em sistemas de gestão da qualidade, as lógicas da qualidade, os objetivos reais da qualidade para, finalmente, desenvolver o seu próprio sistema de gestão da qualidade através de uma metodologia adaptada das leituras e debates que ocorreram. O assunto da qualidade é, hoje em dia, um assunto realmente chave no que concerne à satisfação dos requisitos do cliente, o que implica em uma grande precisão na planificação, na realização dos processos, no monitoramento e nas reações adequadas. Sendo assim, a qualidade é um componente principal e indispensável na administração atual. Foram utilizados os princípios da Qualidade Total, no modelo japonês, além das referências atuais brasileiras no que se refere à Qualidade e às boas práticas nos estudos de BD/BE, como as normas ABNT NBR ISO 9000:2005, ABNT NBR ISO 9001:2008, ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005, NIT-DICLA-035:2011 e as demais citadas ao longo do texto, específicas para estudos de BD/BE.^{50,51,52,53}

O desafio parecia grande, pois os estudos de BD/BE que estavam em andamento no LAB-SEFAR não poderiam parar enquanto o Sistema de Qualidade, no modelo proposto, era desenvolvido. Foi utilizado, então, o estudo de Levodopa + Benserazida como piloto para a aplicação das melhorias, que eram necessárias desde o desenvolvimento dos métodos bioanalíticos, descritos nos artigos 1 e 2, até a medição dos indicadores finais para o estudo em questão. Dessa forma, os métodos apresentaram vantagens e diferenciais quanto aos da literatura até o momento, que discutiremos a seguir.

No artigo de Levodopa, o método desenvolvido para este ativo apresentou especificidade, avaliada por análise de seis amostras diferentes de plasma humano em branco (um hemolisado, um lipêmico e 4 normais). Não houve picos de interferência a partir de compostos endógenos observados no tempo de retenção do analito e do padrão interno. Os tempos de retenção de levodopa e carbidopa foram cerca de 2,61 minutos e 5,05 minutos, respectivamente, e o tempo total da corrida foi de 7 minutos, o que representa uma redução no tempo de execução, quando

comparado à maioria dos métodos analíticos descritos na literatura, o que representa a diminuição do custo das análises.^{54,55,56,57,58,59}

O limite inferior de quantificação (LIQ) foi definido como a menor concentração de levodopa no plasma humano detectado na curva de calibração (25 ng/mL). A média dos limites inferiores de quantificação encontrados na literatura é de cerca de 50 ng/mL, como observado pelo autor NUNES e colaboradores (2009) e Wu (2000). Sendo assim, o LIQ observado neste estudo é um dos mais baixos relatados na literatura, demonstrando um método bastante sensível.^{60,61}

O método bioanalítico empregado proporcionou a obtenção de resultados com boa precisão (mínimo de 1,86% e máximo de 5,25%) e exatidão (mínimo de 92,79% e máximo de 103,54%) para os controles de qualidade analisados. Observou-se também boa recuperação, maior que 90% para o analito e padrão interno. Os ensaios de especificidade demonstraram que não houve contaminação significativa (>20% em relação ao CQ-LIQ - Limite Inferior de Quantificação, e maior que 5% com relação ao padrão interno) nos tempos de retenção do analito e do padrão interno nas matrizes de plasma empregadas. Os resultados dos testes de estabilidade realizados demonstraram que o analito e o padrão interno apresentaram-se estáveis quando submetidos aos ensaios, sob as condições teste pré-estabelecidas. Não apresentaram degradação significativa na temperatura e/ou nos períodos especificados em matriz biológica, bem como em soluções padrão. Desta forma, os requisitos de validação propostos na RE 899 foram cumpridos e demonstrados com sucesso.²⁰

O método validado foi aplicado com sucesso no estudo de bioequivalência de duas formulações de levodopa + benserazida. Os resultados demonstraram que as formulações foram bioequivalentes em sua taxa e extensão de absorção, assim como apresentado pelo autor CESAR e colaboradores (2011).⁶²

No artigo de 3-Orto-Metildopa, da mesma forma foi demonstrado o desenvolvimento do método bioanalítico do metabólito de Levodopa, para aplicação no estudo de BD/BE. Um diferencial neste método foi a ausência de aditivo para ajuste do pH (neutralização) após precipitação de perclorato no processo de extração, diferente do que a literatura descreve para procedimentos semelhantes.⁵⁷ O tempo de retenção e boa forma do pico do analito e o padrão interno nas nossas condições analíticas, demonstraram a vantagem do método de alto rendimento

presente quando comparado com os métodos de extração semelhantes em literatura recente.^{9,10,13,18,24}

A análise das seis amostras de branco de plasma humano diferentes (um hemolisado, um lipêmico e quatro normais) foi avaliada através da análise da especificidade. Não houve picos de interferência de compostos endógenos observados no tempo de retenção do analito e padrão interno. O tempo total de corrida foi de 5 minutos, o que corresponde a uma análise de tempo mais curto do que a maioria dos métodos analíticos na literatura, conforme apresentado no artigo de Levodopa, que também apresentou uma redução no custo das análises.^{5,10,11,13,14}

O método analítico empregado proporcionou a obtenção de resultados com boa precisão (mínimo de 0,55% e máximo de 6,91%) e exatidão (mínimo de 89,75% e máximo de 101,96%) para os controles de qualidade analisados. Observou-se também boa recuperação, maior que 85% para o analito e 87% para o padrão interno. Os ensaios de especificidade demonstraram que não houve contaminação significativa (maior que 20% em relação ao CQ-LIQ e maior que 5% com relação ao padrão interno) nos tempos de retenção do analito e do padrão interno nas matrizes de plasma empregadas. Os resultados dos testes de estabilidade realizados até o momento demonstraram que o analito e o padrão interno apresentaram-se estáveis quando submetidos aos ensaios sob as condições-teste pré-estabelecidas. Não apresentaram degradação significativa na temperatura e/ou nos períodos especificados em matriz biológica, bem como em soluções padrão. O método validado para 3-Orto-Metildopa foi aplicado com sucesso no estudo de bioequivalência de duas formulações de levodopa + benserazida. Os resultados demonstraram que as formulações foram bioequivalentes em sua taxa e extensão de absorção.

O artigo de Qualidade apresenta o desenvolvimento do Sistema de Gestão da Qualidade, proposto com base no Controle da Qualidade Total, modelo japonês. O sistema de gestão da qualidade foi descrito em um Manual da Qualidade, definindo a política e os objetivos da Qualidade, bem como fazendo referência aos procedimentos, padrões e especificações que definem as atividades, responsabilidades e autoridades das pessoas envolvidas. Os trabalhos encontrados na literatura apresentam em sua totalidade a importância da implementação de um Sistema de Gestão da Qualidade nas empresas. Porém, não foi encontrado na literatura uma proposta de implementação do Sistema de Gestão da Qualidade,

baseado no Controle da Qualidade Total, aplicado a estudos de bioequivalência. Este fato caracteriza a importância do nosso trabalho, de caráter inovador, para os laboratórios e centros que pretendem alcançar a certificação e a satisfação dos clientes em sua totalidade.

A implementação do SGQ no LAB-SEFAR teve como referência as normas NIT-DICLA-035:2011 – Princípios das boas práticas de laboratório e Norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 – Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração, além dos conceitos da Qualidade Total. GROCHAU E CATEN em 2012, propuseram algumas etapas gerais para a implementação de um SGQ de acordo com a ISO / IEC 17025, a fim de preparar os laboratórios para o credenciamento. Os autores acreditam que esses passos sugeridos devem ajudar os laboratórios de ensaios, especialmente aqueles localizados em instituições de ensino e pesquisa, para alcançar a acreditação de acordo com a ISO / IEC 17025. Porém eles não apresentaram os resultados práticos da acreditação. Estamos de acordo com a importância da ISO 17025, porém, a acreditação no INMETRO, isoladamente, não traria ganhos significativos para o sistema de gestão da qualidade de um centro de bioequivalência, pela sua especificidade e necessidade de um amplo olhar como a proposta de Qualidade Total, além dos padrões de qualidade já conhecidos, onde a qualidade é vista como um todo e não apenas cumprimento de requisitos de uma norma isolada.⁶³

Segundo BENOLIEL (1999), a qualidade tornou-se um fator de competitividade entre os laboratórios e empresas. Nos últimos anos tem sido crescente a preocupação com os aspectos relacionados com a qualidade, como resultado da criação do mercado interno europeu acompanhado pela tendência de globalização da economia e do comércio livre e, ao mesmo tempo, uma maior consciência do consumidor. O autor apresenta os aspectos que devem ser levados em conta na implementação passo-a-passo de um sistema de qualidade e também faz referência aos requisitos para o funcionamento de laboratórios acreditados em conformidade com a norma europeia EN 45001. No entanto, este artigo faz uma apenas uma exposição teórica dos aspectos gerais de qualidade, também diferente da nossa proposta que apresenta uma implementação prática de um Sistema de Gestão da Qualidade.⁶⁴

Nesse contexto, a política da qualidade do LAB-SEFAR foi aprovada e colocada em prática para a manutenção e melhoria contínua do sistema de garantia

da qualidade, fornecendo evidências documentais necessárias para estabelecer a confiança às partes interessadas que os requisitos de qualidade estão sendo atingidos e as diretrizes foram descritas no artigo submetido. Dessa forma, o objetivo de apresentar um sistema de garantia da qualidade foi cumprido, com a elaboração do que podemos chamar de ferramentas de trabalho, de acordo com cada atividade distribuída nos núcleos da qualidade. O APÊNDICE 1 apresenta um exemplo de livro de registro elaborado no LAB-SEFAR, como parte integrante do sistema documental desenvolvido.

Tayyem e colaboradores (2008), apresenta os requisitos regulamentares e requisitos científicos em Organizações Representativas para Pesquisa Clínica (ORPC) que realizam estudos de bioequivalência. De acordo com este trabalho, eles afirmam que as atividades dos estudos de bioequivalência são gerais ou relacionadas com o estudo, apontando para a necessidade da dicotomia entre controle de qualidade (CQ) e garantia de qualidade (GQ). Nós acreditamos que essa proposta surgiu, porque na maioria dos laboratórios há uma resistência por parte dos analistas de laboratório para seguir as diretrizes de garantia de qualidade. Na verdade o que tem que ocorrer é uma mudança de cultura e uma sinergia entre as áreas, controle de qualidade e garantia de qualidade. Os autores também afirmam que os padrões de Boas Práticas Clínicas e Boas Práticas de Laboratório são obrigatórios pelas autoridades reguladoras de todo o mundo, com atenção rigorosa para treinamento de funcionários, documentação detalhada e autorizada, a validação de equipamentos, acompanhamento cuidadoso das mudanças, e auditoria de rotina, que estão de acordo com o nosso trabalho proposto.⁶⁵

Com esse olhar, implementamos os indicadores da qualidade, em cada núcleo da qualidade, para medir se os resultados esperados foram refletidos nos resultados obtidos. A partir dos mesmos pudemos traçar metas de melhoria contínua por meio das reuniões de análise crítica pela alta direção. Os indicadores foram utilizados no estudo piloto de Levodopa + Benserazida. Foi apresentado no artigo de Qualidade um gráfico comparativo entre dez auditorias realizadas antes da implementação do SGQ e dez auditorias realizadas após a implementação do SGQ. O número de ocorrências geradas a partir das auditorias diminuiu 77,95%. Essa redução foi suficiente para a capacidade de correção dos relatórios e melhorias do processo antes que o estudo fosse submetido à ANVISA. Dessa forma, o estudo de Levodopa + Benserazida

apresentou “Não conformidade zero” após inspeção *in loco* no centro de bioequivalência e todas as melhorias apresentadas permitiram a recertificação do Centro de bioequivalência da FIOCRUZ na ANVISA.

5 CONCLUSÃO:

O trabalho contribuiu de forma única para a Ciência com a disponibilização de duas novas metodologias bioanalíticas para quantificação de Levodopa e 3-O-Metildopa, respectivamente, além de disponibilização de novos modelos de controle e garantia da qualidade, que poderão ser utilizadas na condução de qualquer estudo de bioequivalência/biodisponibilidade, para o aumento da qualidade dos estudos dos no Brasil.

O desenvolvimento de um sistema de garantia da qualidade e a disponibilização de um amplo sistema documental elaborados com enfoque na Qualidade total, permitiu a manutenção da certificação do centro de bioequivalência da FIOCRUZ, que é o único centro habilitado pela ANVISA para este fim no Rio de Janeiro.

A proposta de nova abordagem da garantia da qualidade para avaliação de medicamentos durante a etapa analítica de estudos de Bioequivalência e Biodisponibilidade contribuiu para um maior controle sobre os dados e relatórios analíticos liberados, garantindo a confiabilidade dos resultados, além de proporcionar a capacitação de todo o pessoal do laboratório, com um trabalho sistêmico e harmonioso, de acordo com a gestão participativa.

Neste contexto, o trabalho foi um marco importante para o aumento da qualidade dos estudos realizados, diminuindo a visão dicotomista entre Qualidade e Laboratório e, conseqüentemente, a comercialização dos medicamentos genéricos com qualidade assegurada, após a avaliação por meio do estudo de BD/BE. A apresentação de um novo olhar da Garantia da Qualidade tornou esse trabalho como um modelo para os centros de pesquisa que desejam alcançar a Qualidade Total.

REFERÊNCIAS

-
- 1 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE MEDICAMENTOS GENÉRICOS – PRÓ-GENÉRICOS. **História dos medicamentos genéricos no Brasil**. São Paulo: Pró-genéricos, 2007. Disponível em: <<http://www.progenericos.org.br/historia.shtml>>. Acesso em: 19 nov. 2010.
- 2 ARAUJO, Lorena Ulhôa et al. Medicamentos genéricos no Brasil: panorama histórico e legislação. **Rev Panam Salud Publica**. Washington, v. 28, n. 6, Dec. 2010. Available from <http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1020-49892010001200010&lng=en&nrm=iso>. access on 11 Nov. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1020-49892010001200010>.
- 3 BRASIL. Lei nº 9782 de 26 de fevereiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 27 jan.1999.
- 4 BELOTTO, K. C. R. **Comparação da bioequivalência de duas formulações da risperidona**. São Paulo. 2010. Dissertação (Mestrado em Psiquiatria) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, São Paulo, 2010.
- 5 BRASIL. Resolução 391/1999. Disponível em: www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/legis/resolucoes/391_99.htm. Acessado em 11 de novembro de 2014.
- 6 BRASIL. Resolução RDC 10/1991. Disponível em: www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/legis/resolucoes/10_01rdc.htm. Acessado em 11 de novembro de 2014.
- 7 BRASIL. Resolução RDC 84/2002. Disponível em: www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/84_02rdc_versao2.htm. Acessado em 12 de dezembro de 2008.
- 8 BRASIL. Resolução RDC 135/2003. Disponível em: www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/135_03rdc.htm. Acessado em 15 de dezembro de 2008.

9 BRASIL. Resolução RDC 16/2007. Disponível em:
<http://www.diariodasleis.com.br/busca/exibelink.php?numlink=1-9-34-2007-03-02-16>.
Acessado em 11 de novembro de 2014.

10 ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Histórico**.
Disponível em:
<<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/bioequivalencia/historico.htm>>. Acesso em:
28 de outubro de 2010.

11 BRAGA, D. M. **Planejamento e análise de estudos de bioequivalência: comparação de delineamentos do tipo cross-over**. 2008. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

12 GUIDANCE for industry: bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products: general considerations. Rockville, MD: FDA, July, 2002.
Disponível em:
<<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070124.pdf>>. Acesso em:
05/09/2014

13 BRASIL. Lei n. 9787 de 10 de fevereiro de 1999. Altera a Lei n. 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 de fevereiro de 1999.

14 ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução-RE nº. 1170, de 19 de abril de 2006. Determina a publicação do guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, de 24 de abril de 2006.

15 CORDEIRO, J. A. R. **Papel do LFM em face da nova realidade do mercado farmacêutico após a lei dos genéricos: ser um centro analítico de bioequivalência e biodisponibilidade credenciado pela Anvisa**. 2009. Monografia (Especialização em *MBA Executivo em Saúde*) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, COOPEAD, Rio de Janeiro, 2009.

16 ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA Resolução-RDC nº 56, de 08 de outubro de 2014. Dispõe sobre a Certificação de Boas Práticas para a realização de estudos de Biodisponibilidade/Bioequivalência de medicamentos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 09 de outubro de 2014.

17 BRESSOLE, F. et al., Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods: applications to pharmacokinetics. **J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v.686, n.1, p. 3-10, 1996.

18 CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: view point and discussion. **J. chromatogr., B: Biom. Appl.**, Amsterdam, v. 689, n.1, p. 175-180, 1997.

19 ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA Resolução-RE nº 899, de 02 de junho de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 de junho de 2003.

20 ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 de maio de 2012.

21 SWEETMAN, S. C. (Ed.) Martindale: **the complete drug reference**. 36. ed. London: Pharmaceutical Press, 2009. 2 v.

22 MASSART, D. L.; HARTMMAN, C.; SMEYERS-VERBEKE, J. et. al. Validation of bioanalytical chromatographic methods. Review article. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 17, p. 193-218, 1998.

23 ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Sistema de gestão da qualidade**: fundamentos e vocabulário. Rio de Janeiro, set. 2000.

24 JURAN, J. M. **Juran on planning for quality**. New York, Free Press, 1988.

25 NÓBREGA, K. C. **Gestão da qualidade em serviços**. São Paulo. 1997. Tese (Doutorado) Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia de Produção., São Paulo, 1997.

26 JURAN, J. M. **Juran na liderança para qualidade**. São Paulo, Pioneira, 1990.

27 DEMING, W. E. **Qualidade: a revolução da administração**. Trad. Clave Comunicações e Recursos Humanos. Rio de Janeiro, Marques-Saraiva, 1990.

28 FEIGENBAUM, A. V. **Total quality control**. New York, McGraw Hill, 1986.

29 CROSBY, P.B. **Qualidade é investimento**. Trad. de Áurea Weissenberg. Rio de Janeiro. José Olympio, 1985.

30 ISHIKAWA, K. **TQC - Total Quality Control**: estratégia e administração da qualidade. São Paulo, IMC, 1985.

31 CAMPOS, V. F. **TQC Controle da qualidade total (no estilo japonês)**. 8. ed. Belo Horizonte: FCO/UFMG, 2004.

32 PESSOA, G.A. **A importância dos círculos de controle da qualidade na gestão participativa e melhoria contínua das organizações**. São Luís: Escola brasileira de administração pública e de empresas. Fundação Getúlio Vargas, 2004. Projeto de pesquisa apresentado no curso de mestrado acadêmico em gestão empresarial.

33 JURAN, J.M. **Quality Control Handbook**. McGraw-Hill Book. Company, New York, 1979.

50 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO 9000/2005** - *Sistema de Gestão da Qualidade: Fundamentos e Vocabulário*. Rio de Janeiro, 2005.

51 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO 9001:2008**: *Sistemas de Gestão da Qualidade - Requisitos*. Rio de Janeiro, 2008.

52 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO/IEC 17025**: *Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração*. Rio de Janeiro, 2005.

53 INSTITUTO DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **INMETRO NIT-DICLA-035**: *Boas práticas de laboratório*. Rio de Janeiro, 2011. INMETRO.

54 MARTINS, H.F. et al. Determination of levodopa in human plasma by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (hplc–ms/ms): application to a bioequivalence study. **Quim. Nova**. Rio de Janeiro, Vol. 36, No. 1, 171-176, Dez. 2013.

55 Karimi, M.; Carl, J. L.; Loftin, S.; Perlmutter, J. S.; *J. Chromatogr., B*:

Anal. Technol. Biomed. Life Sci. **2006**, 836, 120.

56 Cesar, I. C.; Bastos, L. F.; Godin, A. M.; Coelho, M. M.; Araujo, D. P.; Fatima, A.; Guidine, P. A.; Pianetti, G. A.; *J. Mass. Spectrom.* **2011**, 46, 1125.

57 Muzzi C, Bertocci E, Terzuoli L, Porcelli B, Ciari I, Pagani R, et al. Simultaneous determination of serum concentrations of levodopa, dopamine, 3-O-methyldopa and alpha-methyldopa by HPLC. **Biomed Pharmacother.** 2008 Apr-May;62(4):253-8.

58 Lv, L.; Jiang, W.; Zhou, S.; Huang, X.; Shi, X.; Lv, C.; Wu, L.; Xu, C.; *Chromatographia* **2010**, 72, 239.

59 Bf Jiang, W.; Lv, L.; Zhou, S.; Huang, X.; Shi, X.; Lv, C.; Wu, L.; Xu, C.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, 53,751.

60 NUNES, T. et al. Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Interaction Between Nebicapone and Controlled-Release Levodopa/Benserazide: A Single-Center, Phase I, Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled, Four-Way Crossover Study in Healthy Subjects. **Clinical Therapeutics**, Volume 31, Número 10, 2258, 2271, 2009.

61 WU, G. The Determination of Levodopa in Plasma by HPLC: a Cautionary Note. **Chromatographia**, Volume 52, Número 5/6,371-372, setembro,2000.

62 CÉSAR, I.C. et al. Simultaneous quantitation of levodopa and 3-O-methyldopa in human plasma by HPLC–ESI-MS/MS: Application for a pharmacokinetic study with a levodopa/benserazide formulation. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 56, n. 5, p. 1094-1100, 2011.

63 GROCHAU, I.H.; CATEN, C.S. A process approach to ISO/IEC 17025 in the implementation of a quality management system in testing laboratories. **Accred Qual Assur.** 17:519–527, 2009.

64 BENOLIEL, M.J. Step-by-step implementation of a quality system in the laboratory. **Trends Anal Chem.** 18:632–638, 1999.

65 TAYYEM. et al. "Built-in quality systems in regulated contract research organizations (CRO) conducting bioequivalence studies: a regulatory science perspective." **Accreditation and Quality Assurance.** 13.8: 473-477, 2008.

**ANEXO A – “LEGISLAÇÕES PUBLICADAS NA AGÊNCIA NACIONAL DE
VIGILÂNCIA SANITÁRIA COM RELAÇÃO AOS MEDICAMENTOS GENÉRICOS,
BRASIL, 1999 A 2010”**

Legislações publicadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária com relação aos medicamentos genéricos, Brasil, 1999 a 2010

Legislação	Assunto	Revogada por	URL
Lei 9 787 de 10 de fevereiro de 1999	Altera a lei 6 360 de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária	Em vigor	http://www.anvisa.gov.br/legis/leis/9787_99.htm
Resolução 391 de 9 de agosto de 1999	Regulamento técnico para medicamentos genéricos	RDC 135 de 29 de maio de 2003	http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/135_03rdc.htm
RE 41 de 28 de abril 2000	Faz determinações para as entidades ou empresas que pretendam se habilitar para a realização dos ensaios de equivalência farmacêutica, biodisponibilidade e/ou bioequivalência em medicamentos	Em vigor	http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2000/41_00.htm
RDC 10 de 2 de janeiro de 2001	Regulamento técnico para medicamentos genéricos	RDC 84 de 19 de março de 2002	http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/84_02rdc.htm
RDC 47 de 28 de março de 2001	Determina que os medicamentos genéricos registrados ou que vierem a ser registrados junto à ANVISA devem ter, em suas embalagens, o logotipo que identifica o medicamento genérico	Em vigor	http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/47_01rdc.htm
RE 476 de 19 de março de 2002	Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica	RE 900 de 29 de maio de 2003	http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/900_03re.htm
RDC 84 de 19 de março de 2002	Regulamento técnico para medicamentos genéricos	RDC 135 de 29 de maio de 2003	http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/135_03rdc.htm
RDC 479 de 19 de março de 2002	Guia para protocolo e relatório técnico de estudo de bioequivalência	RE 894 de 29 de maio de 2003	http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/894_03re.htm
RDC 478 de 19 de março de 2002	Guia para provas de bioequivalência de medicamentos genéricos	Em vigor	http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/478_02re.htm
RE 482 de 19 de março de 2002	Guia para estudos de correlação <i>in vitro/in vivo</i> (CIVIV)	Em vigor	http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/482_02re.htm
RE 481 de 19 de março de 2002	Guia para isenção e substituição de estudos de bioequivalência	RE 897 de 29 de maio de 2003	http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/897_03re.htm
RE 484 de 19 de março de 2002	Guia para desenhos aplicáveis a estudos de bioequivalência	RE 898 de 29 de maio de 2003	http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/898_03re.htm
RE 475 de 19 de março de 2002	Guia para validação de métodos analíticos	RE 899 de 29 de maio de 2003	http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm

RE 894 de 29 de maio de 2003	Guia para protocolo e relatório técnico de estudo de bioequivalência	Em vigor	http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/894_03re.htm
RE 899 de 29 de maio de 2003	Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos	Em vigor	http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm
RE 898 de 29 de maio de 2003	Guia para planejamento e realização da etapa estatística de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência	Em vigor	http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/898_03re.htm
RE 901 de 29 de maio de 2003	Guia para ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata (FFSOLI)	RE 310 de 1 de setembro de 2004	http://www.interfarma.org.br/site2/images/Site%20Interfarma/Informaco esdosetor/RE/Registro/2004/RE%20setembro%20310-04%20SIMILAR.pdf
RE 896 de 29 de maio de 2003	Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos	RE 397 de 12 de novembro de 2004	http://www.interfarma.org.br/site2/images/Site%20Interfarma/Informaco esdosetor/RE/Registro/2004/RE%20novembro%20397-04.pdf
RE 897 de 29 de maio de 2003	Guia para isenção e substituição de estudos de bioequivalência	Em vigor	http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/897_03re.htm
RE 310 de 1 de setembro de 2004	Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução	Em vigor	http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/875f3a80419774c98d73ad925ac4fc61/RE_310_2004_Equivalencia_e_Perfil_dissolucao.pdf?MOD=AJPERES
RE 397 de 12 de novembro de 2004	Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência	RE 1 170 de 19 de abril de 2006	http://www.interfarma.org.br/site2/images/Site%20Interfarma/Informaco esdosetor/RE/Registro/2006/RE%201170-06%20SIMILAR.pdf
RE 1 170 de 19 de abril de 2006	Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos	Em vigor	http://www.interfarma.org.br/site2/images/Site%20Interfarma/Informaco esdosetor/RE/Registro/2006/RE%201170-06%20SIMILAR.pdf
RDC 221 de 28 de dezembro de 2006	Institui a Rede Brasileira de Centros Públicos de Equivalência Farmacêutica e Bioequivalência	Em vigor	http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2006/rdc/221_06.pdf
RDC 17 de 2 de março de 2007	Regulamento técnico para medicamentos genéricos	Em vigor	http://www.interfarma.org.br/site2/images/Site%20Interfarma/Informaco esdosetor/RE/Registro/2007/RDC%2016-07.pdf

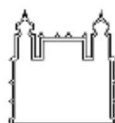
ANEXO B – OS 14 PRINCÍPIOS DE DEMING

1. Estabeleça constância de propósito no sentido de uma constante busca de melhorias;
2. Adote a nova filosofia. Não aceite erros, atrasos, retrabalhos, etc.
3. Termine com a dependência da inspeção em massa;
4. Cesse a prática de escolher fornecedores pelo preço;
5. Encontre os problemas e defina suas causas;
6. Introduza métodos modernos de treinamento no trabalho;
7. Introduza uma supervisão moderna;
8. Afaste o medo do ambiente de trabalho;
9. Elimine barreiras entre departamentos;
10. Elimine slogans, exortações e alvos;
11. Elimine padrões de trabalho que prescrevam cotas numéricas, sem fornecer os métodos adequados para tal;
12. Remova barreiras que impedem o sentimento de orgulho;
13. Institua um amplo programa de educação e treinamento;
14. Crie uma estrutura para garantir os 13 pontos anteriores

ANEXO C – OS 14 PASSOS PARA IMPLANTAÇÃO DA QUALIDADE POR TODA A EMPRESA SEGUNDO CROSBY

1. Comprometimento da gerência
2. Equipe de melhoria da qualidade
3. Cálculo da qualidade
4. Avaliação do custo da qualidade
5. Conscientização - partilhar custos
6. Ação corretiva postura
7. Comitê para o dia Zero Defeitos
8. Treinamento de supervisores
9. Dia Zero Defeitos
10. Estabelecimento de meta
11. Remoção de causa de erros
12. Reconhecimento
13. Conselhos da Qualidade
14. Fazer tudo novamente

**APÊNDICE A – EXEMPLO DE UM LIVRO DE REGISTRO DE BALANÇA
ANALÍTICA DO LAB-SEFAR**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

VPPIS – Vice-Presidência de Produção e Inovação em Saúde

LAB-SEFAR – Laboratório de Farmacocinética

**LIVRO DE REGISTRO****CALIBRAÇÃO, MANUTENÇÃO E UTILIZAÇÃO DA BALANÇA ANALÍTICA****LR 022.10**

Código LAB-SEFAR	Descrição

Dados da calibração externa

Data da última calibração	Nº certificado	Empresa	Data da próxima calibração

Abertura

Área	Nome	Data	Rubrica
Garantia da Qualidade	Heliana Martins Pereira	____/____/____	

Recebimento

Área	Nome	Data	Rubrica
Análítica		____/____/____	

Fechamento

Área	Nome	Data	Rubrica
Garantia da Qualidade	Heliana Martins Pereira	____/____/____	



Ministério da Saúde

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

VPPIS – Vice-Presidência de Produção e Inovação em Saúde

LAB-SEFAR – Laboratório de Farmacocinética

**LIVRO DE REGISTRO****CALIBRAÇÃO, MANUTENÇÃO E UTILIZAÇÃO DA BALANÇA ANALÍTICA****LR 022.10****TABELA 1: REGISTRO DE RESPONSABILIDADES**

	Classificação	Nome	Assinatura	Rubrica
Execução do procedimento	Usuário responsável		_____	_____
Solicitação de calibração externa	Usuário responsável		_____	_____
Supervisão do procedimento	Supervisor responsável		_____	_____

TABELA 2: OPERAÇÕES

Operação (OP)	Descrição	Periodicidade	Executante
VM	Verificação mensal	Mensalmente	Resp. pelo equipamento
VD	Verificação diária	Diariamente	Resp. pelo equipamento
LS	Limpeza semanal	Semanalmente	Resp. pelo equipamento
CA	Calibração de rotina	Anual	Técnico externo
UZ	Utilização	A cada utilização	Usuário



Ministério da Saúde

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

VPPIS – Vice-Presidência de Produção e Inovação em Saúde

LAB-SEFAR – Laboratório de Farmacocinética

**LIVRO DE REGISTRO****CALIBRAÇÃO, MANUTENÇÃO E UTILIZAÇÃO DA BALANÇA ANALÍTICA****LR 022.10****REGISTRO DE OPERAÇÕES**

Nº ordem	Data	Hora	OP ^a	Pesagem (g/mg)	Código do estudo	Descrição ^b	Resp.
01							
02							
03							
04							
05							
06							
07							
08							
09							
10							
11							
12							
13							
14							
15							

a) Ver tabela 2; b) Nome e código do material (reagente ou padrão pesado).

Supervisão: _____