



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

THALITA PEDON DE ARAUJO

**Bioequivalência tópica de produtos contendo metronidazol através da
dermatofarmacocinética (DPK)**

Recife – PE
Fevereiro, 2016.

THALITA PEDON DE ARAUJO

Bioequivalência tópica de produtos contendo Metronidazol através da Dermatofarmacocinética (DPK)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Produção e Controle de Medicamentos

Orientadora: Prof^ª. Dra. Leila Bastos Leal

Co-orientador: Prof. Dr. Davi Pereira de Santana

Recife – PE
2016

Catálogo na Publicação (CIP)
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4 1010

A663b Araújo, Thalita Pedon de.
Bioequivalência tópica de produtos contendo metronidazol através da dermatofarmacocinética (DPK) / Thalita Pedon de Araújo. – 2016.
96 f. il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Leila Bastos Leal.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2016.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Metronidazol. 2. Bioequivalência. 3. Cromatografia líquida de alta pressão. 4. Absorção. 5. Dose única. I. Leal, Leila Bastos (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2016-099)

THALITA PEDON DE ARAUJO

Bioequivalência tópica de produtos contendo Metronidazol através da Dermatofarmacocinética (DPK)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Comissão Julgadora composta pelos membros:

Prof^a. Dra. Leila Bastos Leal
Universidade Federal de Pernambuco
Orientadora - Presidente

Prof. Dr. Davi Pereira Santana
Universidade Federal de Pernambuco
Co-orientador - Examinador Interno

Prof^a. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães
Universidade Federal de Pernambuco
Examinador Interno

Prof^a. Dra. Danielle Cristine Almeida Silva de Santana
Universidade Federal de Pernambuco
Examinador Externo

Aprovada em: 26 de fevereiro de 2016.

Local da defesa: Auditório do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, *campus* da Universidade Federal de Pernambuco.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Reitor

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

Vice – Reitor

Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

Diretor de Ciências da Saúde – CCS

Nicodemos Teles de Pontes Filho

Vice – Diretor do Centro de Ciências da Saúde - CCS

Vânia Pinheiro Ramos

Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Antonio Rodolfo de Faria

Vice – Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Dalci José Brondanni

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Almir Gonçalves Wanderley

Vice - Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Rafael Matos Ximenes

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, razão de todas as coisas.

Aos meus pais, Josael e Ida, por todo amor, dedicação, cuidado e apoio em tudo.

À minha irmã Sarah, pela companhia, incentivo, amizade e carinho em todos os momentos.

Ao meu noivo Igor, por seu amor, companheirismo, compreensão e por cada palavra de incentivo.

À Prof^a. Dr^a. Leila Bastos Leal, minha orientadora, pela oportunidade, orientação, confiança e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Davi Pereira de Santana, meu (co)orientador, pelo apoio e oportunidade.

Aos meus amigos do laboratório por toda a amizade e pelos momentos agradáveis durante esse período. Em especial a Wellithom, pela ajuda e empenho em diversas etapas deste trabalho.

À minha amiga de vida, Ana Rosa por todo o apoio, carinho e amizade.

À Anellyse amiga que o mestrado me trouxe, pela companhia, contribuições e pelos momentos agradáveis.

À Alice, Daniel, Ellison, Giovana, Karine, Marília, Noelly e Zênia pela amizade e contribuições.

Ao Prof. Dr. Danilo Bedor, pela contribuição durante os ensaios analíticos.

A todos do NUDFAC, pelo apoio e torcida.

Ao Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco – LAFEPE, na pessoa de Aíla pela disponibilidade da câmara climática, para realização do estudo de estabilidade acelerada.

Ao Centro de Tecnologia Estratégicas do Nordeste – CETENE, na pessoa de Wilson Souza pelas realizações das análises da reologia.

A todos os voluntários que participaram do estudo, sem vocês, este trabalho não teria sido possível.

Aos professores e funcionários do PPGCF-UFPE.

A CAPES pela bolsa concedida.

RESUMO

A bioequivalência de três formulações de metronidazol (MTZ) 0,75% sendo uma delas disponível no Brasil, Rozex[®] (Galderma, Brasil, produto de referência) e duas formulações geleificadas (Teste 01 e Teste 02) desenvolvidas em nosso laboratório contendo os mesmos excipientes do produto referência foram avaliadas por meio de um estudo aberto, randomizado, de dois períodos e cruzado, realizado em 14 voluntários brasileiros saudáveis. Uma dose única de 143,5 mg de formulação tópica foi aplicada em duplicata em cada braço do voluntário e o estrato córneo foi coletado em período de 6 e 12 horas após a aplicação correspondente ao tempo de absorção e eliminação respectivamente. O perfil de concentração do metronidazol (MTZ) no estrato córneo (EC) após a aplicação foi determinado pela remoção sequencial das camadas de EC utilizando fita adesiva (Scotch Tape Livro, 3M, St. Paul, MN). Cada local de aplicação foi tratado com 30 fitas. Todas as fitas foram pesadas antes e depois do procedimento de tape stripping em balança (Sartorius[®]) para posterior cálculo da quantidade de EC extraída. Após o procedimento de extração do fármaco das fitas as concentrações do MTZ no estrato córneo foram determinadas utilizando cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE e a avaliação dos dados foi realizada de duas diferentes formas seja considerando ou não o volume de estrato córneo coletado. A análise da bioequivalência tópica *in vivo* dos produtos contendo metronidazol através da dermatofarmacocinética (DPK) demonstrou com confiança de 95% no intervalo de 80% - 125% que o produto Teste 01 é bioequivalente ao produto de referência Rozex e que o produto Teste 02 é bioinequivalente ao produto de referência Rozex, considerando ou não a quantidade de estrato córneo coletado. Conclui-se assim que, apenas 0,5% a mais de agente espessante no Teste 2 foi suficiente para aumentar a viscosidade em 1,4 vezes e para diminuir a espalhabilidade em 3 vezes deste produto, levando a uma não-bioequivalência entre o teste 2 e o produto de referência que continham os mesmos constituintes. Resultado que demonstra a necessidade de mudança na legislação brasileira atual.

Palavras-chave: Metronidazol. Bioequivalência. Cromatografia Líquida de Alta Pressão. Absorção. Dose única.

ABSTRACT

The bioequivalence of three formulations of metronidazole (MTZ) 0.75% being one available in Brazil, Rozex® (Galderma, Brazil, reference product) and two formulations (Test 01 and Test 02) developed in our laboratory, containing the same excipients reference product were evaluated using an open, randomized, two-period, crossover healthy Brazilian performed in 14 volunteers. A single dose of 143.5 mg of topical formulation was applied in duplicate on each of the volunteer arm and the stratum corneum was collected in a period of 6 and 12 hours after the application corresponding to the time of absorption and elimination, respectively. The concentration profile of metronidazole (MTZ) in the stratum corneum (SC) after application was determined by sequential removal of the EC layers using adhesive tape (Scotch Book Tape, 3M, St. Paul, MN). Each application site was treated with 30 tapes. All tapes were weighed before and after the tape stripping procedure on scale (Sartorius®) for subsequent calculation of the amount of EC extracted. After the drug extraction procedure ribbons concentrations of MTZ in the stratum corneum have been determined using high-performance liquid chromatography - HPLC and data evaluation was done in two ways considering whether or not the volume of the stratum corneum collected. The analysis of topical bioequivalence in vivo products containing metronidazole by dermatofarmacocinética (DPK) has shown with 95% confidence in the 80% range - 125% that the product test 01 is bioequivalent to Rozex reference product and that the product test 02 is bioinequivalente Rozex the reference product, considering or not the amount of stratum corneum collected. It is therefore concluded that only 0.5% more thickener in Test 2 was sufficient to increase the viscosity by 1.4 times and to reduce the spreadability of this product 3 times, leading to a non-bioequivalence between the test 2 and the reference product containing the same constituents. A result that demonstrates the need for change in the current Brazilian legislation.

Keyword: Metronidazole. Bioequivalence. Chromatography High Pressure Liquid. Absorption. Single dose.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Principais métodos para a determinação da BD/BE de produtos uso tópico.	19
Figura 02 – Células de difusão de Franz automatizadas.....	20
Figura 03 – Remoção de uma camada de estrato córneo com uma fita adesiva.....	21
Figura 04 – Representação esquemática da estrutura da pele.....	23
Figura 05 – Estrutura da pele.....	24
Figura 06 – Estrutura química do metronidazol.....	26
Figura 07 – Telangiectasias proeminentes e eritema da face medial.....	30
Figura 08 – Rosácea pápulo pustular.....	30
Figura 09 – Rinofima grau 03.....	31
Figura 10 – Eritema do nariz acompanhado de conjuntivite e blefarite.....	32
Figura 11 – Seis locais de aplicação das formulações demarcados na porção ventral de cada antebraço.....	46
Figura 12 – Espalhabilidade das formulações estudadas.....	51
Figura 13 – Gráfico da tensão de cisalhamento x taxa de cisalhamento do Rozex.....	52
Figura 14 – Gráfico da tensão de cisalhamento x taxa de cisalhamento do Teste 01.....	52
Figura 15 – Gráfico da tensão de cisalhamento x taxa de cisalhamento do Teste 02.....	52
Figura 16 – Curva da Regressão Linear obtida da média de três curvas de calibração autênticas.....	55
Figura 17 – Cromatograma indicativo da seletividade do método (a) Placebo, (b) pele de porco, (c) pele humana e (d) solução padrão de MTZ.....	56
Figura 18 – Amostras armazenadas antes do processo de extração (A) e amostras armazenadas após o processo de extração (B).....	57
Figura 19 – Curva da Regressão Linear obtida da média de três curvas de calibração autênticas.....	58
Figura 20 – Transporte do metronidazol através da membrana hidrofílica in vitro. Liberação cumulativa de três diferentes formulações (média ± DP, n = 6).....	61
Figura 21 – Quantidades de fármaco por unidade de área (A) e quantidades de fármaco por unidade de volume (B) de determinações em catorze áreas de pele dorsal de porco para os três produtos de MTZ medidos após 6 h de absorção (n = 14).....	62
Figura 22 – Quantidades de fármaco por unidade de área (A) e quantidades de fármaco por volume (B) das determinações em duplicada em cada voluntário para os três produtos de MTZ avaliados após: 6 h de absorção, ou b 12 h de eliminação.....	64
Figura 23 – Avaliação da bioequivalência dos géis MTZ (produtos A e C) em comparação com o medicamento de referência listado (produto B) medido em 14 voluntários a quantidade de MTZ / área (A) e quantidade de MTZ / volume (B).....	67
Figura 24 – Porcentagem da quantidade de fármaco no EC encontrada nas duas primeiras fitas (média aritmética ± desvio padrão de determinações em duplicado dos três produtos) após 6 h de absorção e seguido por 12 h de eliminação.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação dos parâmetros biofísicos das peles suína e humana <i>in vivo</i>	26
Tabela 2 – Constituintes das formulações descritas como (Produto A e B, como teste 1 e 2, respectivamente) e Rozex como teste de referência.....	37
Tabela 3 – Valores médios de pH, viscosidade e espalhabilidade das formulações estudadas.....	53
Tabela 4 – Valores médios da viscosidade aparente (Pa/s) das formulações nos tempos inicial e 30 dias sob diversas condições de armazenamento.....	54
Tabela 5 – Avaliação da estabilidade dos géis de MTZ no tempo zero.	57
Tabela 6 – Avaliação da estabilidade dos géis de MTZ no tempo 90 dias.....	57
Tabela 7 – Avaliação da estabilidade dos géis de MTZ no tempo 180 dias.....	57
Tabela 8 – Resultados da precisão e exatidão para as fitas em pele humana e em pele de porco.....	59
Tabela 9 – Valores médios para a recuperação no estrato córneo (amostras contaminadas) e pele de porco (epiderme e derme).....	60
Tabela 10 – Tratamento estatístico da precisão intermediária do método.....	62
Tabela 11 – Resultados da exatidão em 3 concentrações (5,0; 10,0 e 15,0 µg/mL) em triplicata, correspondendo a 50%, 100% e 150%, de acordo com a RE 899/03.....	62
Tabela 12 – Quantidade de metronidazol na epiderme e derme a partir de três diferentes formulações na pele dorsal de porco (n = 14).....	64
Tabela 13 – Média, DP e CV% para a quantidade de droga por centímetro quadrado no EC após 6 h de absorção após a aplicação das três formulações MTZ (n = 14).....	65
Tabela 14 – Médias, DP e CV% para a quantidade de fármaco por miligramas de EC após 6h absorção após a aplicação de três formulações MTZ (n = 14).....	66
Tabela 15 – Parâmetro farmacocinético do MTZ no EC após a aplicação tópica através de uma avaliação pós-aplicação e pós-remoção da formulação em humanos (n = 8).....	67
Tabela 16 – Médias superior e inferior com intervalo de confiança 90%, coeficiente de variação e desvio-padrão para a quantidade de fármaco por cm ² de EC após 6 h de absorção (Qi absorção), ou 12 h eliminação (Qi eliminação), após a aplicação de três produtos MTZ ; a razão entre os valores de absorção após depuração (Wi).....	69
Tabela 17 – Médias superior e inferior com intervalo de confiança 90%, coeficiente de variação e desvio-padrão para a quantidade de fármaco por mg de EC após 6 h de absorção(Qi absorção), ou 12 h eliminação (Qi eliminação), após a aplicação de três produtos MTZ ; a razão entre os valores de absorção após depuração (Wi).....	70
Tabela 18 – Avaliação de bioequivalência de produtos com MTZ 0,75% (produtos A e C) em comparação com referência a drogas (Produto B da Galderma) determinada em 14 voluntários da concentração de MTZ / área.....	71
Tabela 19 – Avaliação de bioequivalência de produtos com MTZ 0,75% (produtos A e C) em comparação com referência a drogas (Produto B da Galderma) determinada em 14 voluntários da concentração de MTZ/volume.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – análise de variância
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BD – Biodisponibilidade
BE – Bioequivalência
CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
C-IVIV – correlação *in vitro/in vivo*
CLAE-UV – Cromatografia Líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta
CQA – Controle de qualidade de alta concentração
CQD – Controle de qualidade da diluição
CQM – Controle de qualidade de média concentração
DP – Desvio Padrão Relativo
DPK – Dermatofarmacocinética
EC- Estrato córneo
F. BRAS – Farmacopeia Brasileira
FDA – *Food and Drug Administration*
IFA – Insumo Farmacêutico Ativo
IMC – Índice de massa corpórea
LD – Limite de Detecção
LIQ – Controle de qualidade de baixa concentração
LQ – Limite de quantificação
LSQ – Limite superior de quantificação
MTZ - Metronidazol
RET – Rosácea eritemato telangiectásica
RPP – Rosácea pápulo pustular
SQR – Substância Química de Referência
USP – Farmacopeia dos Estados Unidos
UV – ultravioleta
VIS – visível

LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem
 μg – micrograma
 μL – microlitro
 μm - micrometro
 μS – microsiemens
cm – centímetro
g – grama
h – hora
J – fluxo
 K_p – coeficiente de permeabilidade
mg – miligrama
min – minuto
mL – mililitro
mV – milivolts
° - graus
°C – graus Celsius
Pa.s – Pascal segundo
pH – potencial hidrogeniônico
 r^2 – Coeficiente de determinação
RPM – rotação por minuto
s – segundo
T - temperatura
v – volume
 η – viscosidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
3.1 BIOEQUIVALENCIA /BIODISPONIBILIDADE.....	19
3.2 A PELE.....	22
3.2.1 A pele humana.....	22
3.2.3 A pele animal.....	25
3.3 METRONIDAZOL.....	26
3.3.1 Características químicas.....	26
3.3.3 Propriedades farmacocinéticas.....	27
3.3.4 Propriedades farmacodinâmicas.....	27
3.4 ROSÁCEA.....	28
3.4.1 A doença.....	28
3.4.2 Subtipos da Rosácea.....	28
3.4.2.1 Rosácea eritemato telangiectásica (Subtipo 01).....	29
3.4.2.2 Rosácea pápulo pustular (Subtipo 02).....	30
3.4.2.3 Rosácea fimatosa (Subtipo 03).....	31
3.4.2.4 Rosácea ocular (Subtipo 04).....	32
3.4.3 Tratamento.....	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1 INSUMO.....	36
4.2 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES.....	36
4.2.1 Obtenção das formulações.....	36
4.2.2 Determinação do pH.....	36
4.2.3 Determinação da espalhabilidade.....	37
4.2.4 Estudo de estabilidade física por determinação do comportamento reológico.....	37
4.2.5 Estabilidade acelerada.....	38
4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO DE ULTRAVIOLETA (CLAE–UV).....	38
4.3.1 Soluções padrão.....	38
4.3.2 Análise cromatográfica.....	38
4.3.3 Linearidade, (LD) e (LQ).....	38
4.3.4 Seletividade e especificidade.....	39

4.3.5 Precisão e exatidão.....	39
4.3.6 - Estabilidade das amostras	39
4.3.7 Recuperação	40
4.3.8 Método de extração do metronidazol das formulações	40
4.4 ESTUDO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO METRONIDAZOL.....	41
4.4.1 Validação espectrofotométrica para quantificação do Metronidazol.....	41
4.4.2 Seleção do meio receptor	41
4.4.3 Preparo da membrana sintética hidrofílica	42
4.4.4 Montagem das células de Franz	42
4.4.5 Coleta e Quantificação das Amostras	42
4.4.6 Análise da cinética de liberação <i>in vitro</i>	43
4.5 ESTUDO DERMATOFARMACOCINÉTICO (DPK) <i>IN VITRO/ IN VIVO</i>	43
4.5.1 Procedimento de tape-stripping	43
4.5.2 Processamento das amostras	43
4.5.3 Procedimento do estudo de DPK <i>in vitro</i> em pele da região dorsal do porco	44
4.5.4 Procedimento do estudo de DPK <i>in vivo</i> em voluntários humanos sadios	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES	50
5.1.1. Determinação do pH	50
5.1.2 Determinação da espalhabilidade	50
5.1.3 Estudo de estabilidade física por determinação do comportamento reológico.....	51
5.1.4 Estabilidade acelerada.....	53
5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO DE ULTRAVIOLETA (CLAE-UV)	55
5.2.1 Linearidade, (LD) e (LQ).....	55
5.2.2 Seletividade e especificidade	55
5.2.3 Precisão e exatidão.....	56
5.2.4- Estabilidade das amostras	57
5.2.5 Recuperação	57
5.2.6 Teor das formulações.....	58
5.3 ESTUDO DE LIBERAÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i>	58
5.3.1 Validação espectrofotométrica para quantificação do Metronidazol.....	58
5.3.2 Seleção do meio receptor	60
5.3.3 Estudo de liberação <i>in vitro</i> do metronidazol	60
5.4 ESTUDO DERMATOFARMACOCINÉTICO(DPK) <i>IN VITRO/ IN VIVO</i>	61
5.4.1 Estudo de DPK <i>in vitro</i> em pele da região dorsal do porco.....	61
5.4.2 Tolerabilidade	63

5.4.3 Estudo de DPK <i>in vivo</i> em pele de voluntários sadios e bioequivalência	63
5.4.4 Quantidade de fármaco nas duas primeiras fitas.....	67
6 CONCLUSÃO e PERSPECTIVAS	73
REFERÊNCIAS	75
APÊNDICE A – Protocolo do tape stripping	82
APÊNDICE B – Perfil do MTZ no EC para absorção e eliminação dos 14 voluntários	86
ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido	93
ANEXO B – Submissão ao Comitê de ética e aprovação do estudo.....	96

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A rosácea é uma dermatose inflamatória crônica que afeta principalmente a região centro facial e pode ocorrer em qualquer idade, mas é mais comumente diagnosticada em mulheres com idade entre 30 e 50 anos. Embora sua patogênese seja desconhecida, um número de fatores causais tem sido implicado, incluindo vasodilatação crônica com alterações inflamatórias subsequentes, defeito de barreira da pele e hiperirritabilidade, atividade elevada da serina e da protease e a deposição de peptídeos derivados de catelicidina na pele (FULLER & MARTIN, 2012). Esta patologia apresenta duas fases principais: fase vascular que se manifesta como eritema e telangiectasia e por vezes, a forma ocular e a fase inflamatória marcada por pústulas e pápulas. Uma minoria dos pacientes pode desenvolver ainda a fase tardia, caracterizada pela proliferação de glândulas sebáceas, tecido conjuntivo e tecido vascular (KATSAMBAS *et al.*, 2015; MC CLELLAN & NOBLE, 2000; FULLER, MARTIN, 2012). O seu diagnóstico depende das características clínicas e histopatológicas (ALTINYAZAR *et al.*, 2005).

Para o tratamento da rosácea alguns agentes sistêmicos como tetraciclínas, eritromicina, metronidazol e isotretinoína podem ser úteis. No entanto, os efeitos colaterais dessas drogas limitam a duração do tratamento, levando à recidiva da doença. No mais, uma quantidade mínima de agente ativo atinge a pele, local de ação dos referidos produtos (MC CLELLAN, NOBLE, 2000; ALTINYAZAR *et al.*, 2005). Diante disto, visando melhorar a eficácia terapêutica, esses ativos estão sendo utilizados através da administração tópica. No entanto, a eficácia do ativo administrado topicamente depende da forma farmacêutica, tipo e quantidade dos veículos e excipientes utilizados que direcionam as características finais da forma farmacêutica a ser administrada. Desta forma, a avaliação da biodisponibilidade/bioequivalência de produtos de administrações tópica e ação local tem uma grande importância e tem sido objeto de diversos estudos em vários países do mundo (MENG *et al.*, 2014; SCHMADEL *et al.*, 1990).

A biodisponibilidade/ bioequivalência dos medicamentos de aplicação tópica de ação local pode ser feita através de ensaios clínicos, dermatofarmacocinética (DPK) e estudos farmacodinâmicos. O conceito de DPK, objeto do estudo, envolve a determinação da quantidade de fármaco presente no estrato córneo (EC) como uma função do tempo pós-aplicação e pós-remoção da formulação em análise. Isso significa que a determinação da concentração de fármaco no EC é feita por remoção sequencial de camadas finas de EC no mesmo local com fita adesiva (FDA, 1998; WIEDERSBERG *et al.*, 2009).

Nos Estados Unidos, produtos de uso tópico de ação local que são candidatos a medicamento genérico só podem ser registrados como tal se forem apresentados estudos que comprovem a bioequivalência entre estes medicamentos e seus respectivos medicamentos de referência através de estudos clínicos e farmacodinâmicos no caso dos corticosteroides (FDA, 1998). Até hoje, apenas o Japão e África do Sul aceitam o DPK na avaliação de medicamentos genéricos para uso tópico.

No Brasil, as legislações vigentes para registro de medicamentos genéricos e similares de uso tópico cutâneo não solicitam a apresentação de estudos de bioequivalência ou estudos clínicos para candidatos a genérico. A bioequivalência pode ser substituída pela equivalência farmacêutica para medicamentos de aplicação tópica sem absorção sistêmica, desde que apresentem mesma concentração em relação ao medicamento de referência e excipientes de mesma função, em concentrações compatíveis (BRASIL, 2011). Em 2009, com a publicação da Resolução RDC nº 48, a ANVISA passou a solicitar estudo de permeação cutânea *in vitro* para comparar as formulações semissólidas antes e após as alterações pós-registro (BRASIL, 2009). Porém, esses produtos não foram comparados com o medicamento referência no momento do registro. Apesar dessa exigência, não existe nenhum guia oficial brasileiro orientando as indústrias de como executar o teste ou delimitando especificações.

Considerando o metronidazol (MTZ) (derivado do nitroimidazol com propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias) um dos fármacos utilizados topicamente no tratamento da rosácea, esse trabalho teve por objetivo principal avaliar a bioequivalência de três formulações tópicas a base do MTZ, sendo duas delas preparadas no laboratório e uma industrializada que é a formulação de referência.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar o estudo de bioequivalência de produtos de uso tópicos contendo Metronidazol.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver géis de Carbopol[®] contendo Metronidazol;
- Desenvolver e validar uma metodologia analítica para o doseamento do metronidazol por espectrofotometria UV-Vis (estudo de liberação cutânea *in vitro*) e por CLAE-UV (estudo de permeação e retenção cutânea *in vitro*);
- Determinar o pH, a viscosidade, a espalhabilidade e a reologia das formulações estudadas;
- Realizar o estudo de estabilidade acelerada dos géis desenvolvidos de acordo com a RE nº01, de 29 de Julho de 2005;
- Realizar o estudo da liberação *in vitro* do metronidazol utilizando membrana sintética (acetato de celulose);
- Determinar *in vivo*, o tempo de absorção do Metronidazol no estrato córneo;
- Determinar *in vivo*, o tempo de eliminação do Metronidazol no estrato córneo;
- Realizar o estudo de dermatofarmacocinética (DPK) – *tape-stripping in vitro e in vivo*;
- Avaliar a bioequivalência das preparações geleificadas.

REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

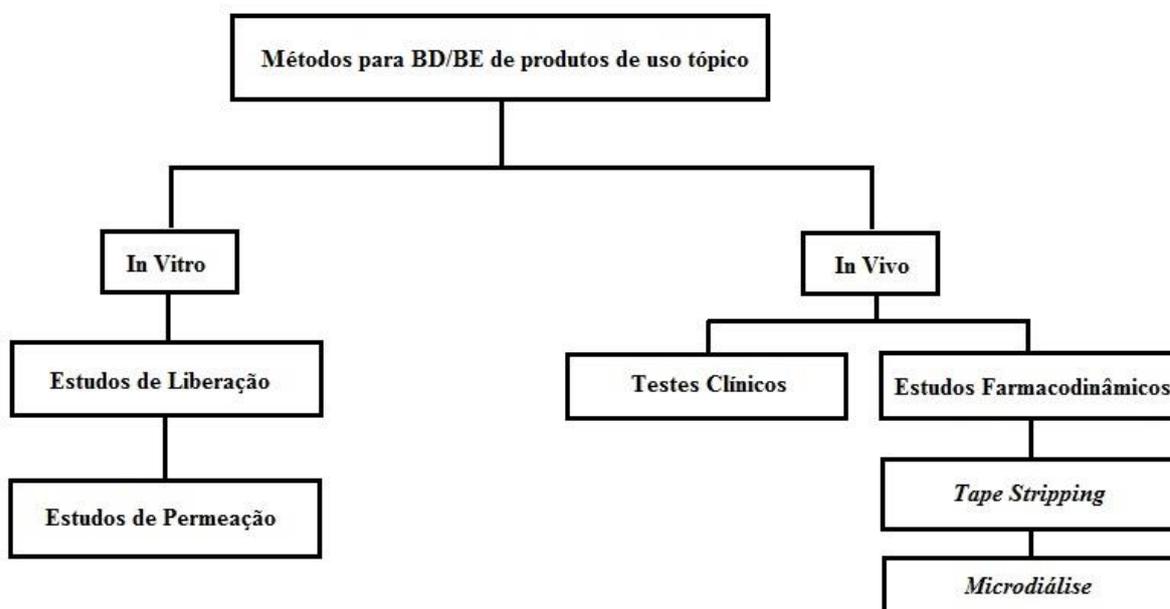
3.1 BIOEQUIVALENCIA /BIODISPONIBILIDADE

Biodisponibilidade (BD) é definida como a velocidade e a extensão pelas quais um fármaco é absorvido a partir de uma formulação e torna-se disponível no local da ação. Bioequivalência (BE) é um parâmetro que consiste na demonstração de equivalência farmacêutica entre produtos apresentados sob a mesma forma farmacêutica, contendo idêntica composição qualitativa e quantitativa de princípio(s) ativo(s), e que tenham comparável biodisponibilidade, quando estudados sob um mesmo desenho experimental (STORPIRTIS *et al.*, 2011).

A bioequivalência, tradicionalmente é avaliada, através da razão das médias geométricas da população. As médias devem estar contidas entre 0,8 a 1,25 com intervalo de confiança de 90% (FDA,2007). Assim, os produtos A e B são considerados: (a) bioequivalentes se $R_{i,90\%,superior}$ e $R_{i,90\%,inferior}$, são ambos contidos no intervalo de 0,8-1,25, (b) não-bioequivalentes se $R_{i,90\%,superior}$ e $R_{i,90\%,inferior}$ não são ambos contidos no intervalo de 0,8 para 1,25, e (c) inconclusiva se nem o critério da bioequivalência nem o da não-bioequivalência é satisfeito (N'DRI-STEMPFER,*et al.*, 2008).

Atualmente, os principais métodos para a determinação da BD/BE tópica podem ser divididos em duas abordagens: (a) *in vitro*, incluindo os ensaios de liberação e permeação cutânea; e (b) *in vivo*, englobando os ensaios clínicos, os farmacodinâmicos (ex.: vasoconstrição), os estudos de dermatofarmacocinética (DPK) (ex.: tape stripping) e a microdiálise dérmica como é mostrado na figura 01.

Figura 01 – Principais métodos para a determinação da BD/BE de produtos uso tópico. Os métodos em itálico ainda estão sob avaliação do FDA.



Fonte: Wiedersberg (2006)

No que diz respeito às abordagens *in vitro*, com utilização de células de Franz (figura 02), propõe-se a utilização do método para a avaliação da efetiva cinética de liberação do(s) componente(s) ativo(s) a partir de formulações semissólidas encontradas em produtos tópicos. Essa técnica, que mede a liberação do Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) faz uso de uma membrana sintética porosa (derivados de celulose, silicone, entre outras). A inabilidade deste teste *in vitro* em se correlacionar com os resultados *in vivo* é devida a impossibilidade da obtenção de dados a cerca da interação entre a formulação (incluindo os excipientes) e a pele, em particular, com o estrato córneo (FDA, 1998).

Figura 02 – Células de difusão de Franz automatizadas.



Fonte: Acervo pessoal

Embora, por si só o ensaio de liberação *in vitro*, "não seja um substituto para os testes de biodisponibilidade e bioequivalência", o guia do FDA, afirma que um fabricante pode fazer pequenas alterações no seu produto e usar o ensaio de liberação *in vitro* para demonstrar a "semelhança" entre eles. Assim, pode-se prever a possibilidade de uma maior utilização para os ensaios de liberação *in vitro*, como parte de uma série de testes, que possam ser utilizados para estabelecer a BE de medicamentos de aplicação tópica (FDA, 1998).

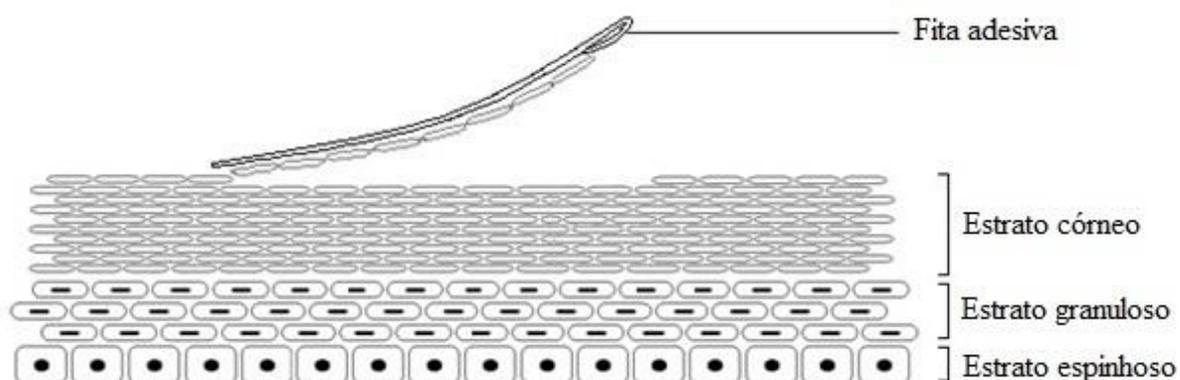
Até o momento, os únicos métodos aceitos pelo FDA para avaliar a BD/BE de produtos tópicos são ensaios clínicos e farmacodinâmicos. Comparativamente os testes clínicos são considerados o padrão ouro, mas esses estudos apresentam um alto custo, consomem tempo e exigem um grande número de voluntários (SHAH *et al.*, 1998). Por

outro lado os estudos farmacodinâmicos são de fácil execução, expõem os indivíduos a uma pequena quantidade de formulação por um curto período de tempo, são relativamente reprodutíveis e requerem um número pequeno de voluntários. Entretanto esses estudos são aplicáveis apenas para fármacos corticosteroides (FDA,1995).

Dentre as outras técnicas citadas, a microdiálise trata-se de uma metodologia *in vivo* que visa à análise da concentração do fármaco livre no fluido extracelular, nos tecidos ou órgãos (HOLMGAARD, NIELSEN, BENFELDT, 2010). Esta técnica permite quantificar o teor de fármaco no fluido extracelular da derme/epiderme e amostras podem ser continuamente coletadas durante um período de tempo. Dessa forma, é compreensível que essa técnica seja uma opção a ser considerada nos testes de BD/BE.

A dermatofarmacocinética (DPK) é uma metodologia onde a quantidade de fármaco presente no estrato córneo é quantificada em função da pós- aplicação e pós-remoção do produto testado, utilizando a metodologia de tape-stripping como mostrado na figura 03 (N'DRI-STEMPFER *et al.*, 2008).

Figura 03 – Remoção de uma camada de estrato córneo com uma fita adesiva.



Fonte: Kanfer (2010).

O principal pressuposto é que a quantidade de fármaco recuperado do estrato córneo, principal barreira da absorção percutânea, está diretamente relacionada à quantidade de ativo que alcança as células-alvo. Assim, esta metodologia pode vir a ser utilizada como substituição dos testes clínicos em estudos de bioequivalência para produtos tópicos. É mais barata, mais rápida, necessita de um menor número de voluntários e na teoria pode ser aplicada a todos os fármacos de uso tópico (BRADDY *et al.*, 2015).

No Brasil, as legislações vigentes para registro de medicamentos genéricos e similares de uso tópico cutâneo não solicitam a apresentação de estudos de bioequivalência ou estudos clínicos para candidatos a genérico. A bioequivalência pode ser substituída pela equivalência farmacêutica para medicamentos de aplicação tópica sem absorção sistêmica,

desde que apresentem mesma concentração em relação ao medicamento de referência e excipientes de mesma função, em concentrações compatíveis (BRASIL, 2003). Entretanto esses estudos de equivalência farmacêutica avaliam apenas os parâmetros físico-químicos e microbiológicos estabelecidos em compêndios oficiais como a farmacopeias brasileira (SOARES *et al.*, 2015).

Em 2009, com a publicação da Resolução RDC nº 48, a ANVISA passou a solicitar estudo de permeação cutânea *in vitro* para comparar as formulações semissólidas antes e após as alterações pós-registro (BRASIL, 2009). Porém, esses produtos não foram comparados com o medicamento referência no momento do registro. Apesar dessa exigência, não existe, até o momento, nenhum guia oficial brasileiro orientando as indústrias com relação à execução do teste ou delimitando especificações.

Levando em consideração que a penetração do fármaco no estrato córneo é um processo complexo e dependente, entre outros fatores, das propriedades físico-químicas do fármaco, do tipo de formulação e tipo de associação estabelecida com a formulação, podemos esperar que a eficácia clínica de um produto tópico dermatológico dependa amplamente dos componentes da formulação (SOARES *et al.*, 2015).

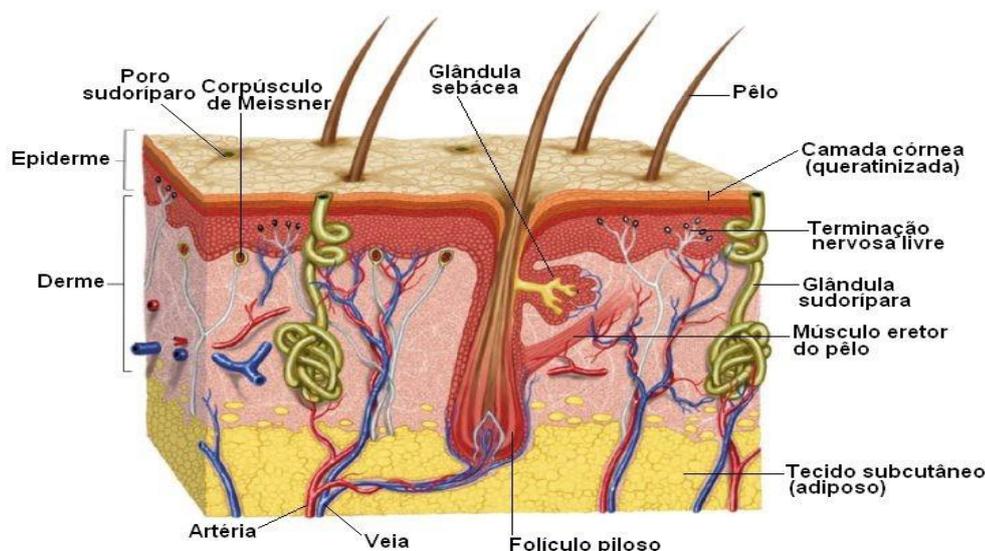
3.2 A PELE

3.2.1 A pele humana

A pele é o órgão mais extenso do corpo humano, com uma área aproximada de 2m^2 e de espessura variável (1 a 4 mm) conforme a região. Sendo a interface entre o organismo e o meio externo, a pele é resistente, quase impermeável e flexível, capaz de impedir a entrada de corpos estranhos, agentes patogênicos externos, toxinas e a perda de água transepidermica, além de possuir funções sensoriais (calor, frio, pressão, dor e tato). (DANGELO & FATTINI, 2005; GUY & HADGRAFT, 2003; STORPIRTIS *et al.*, 2011).

A pele é composta por três camadas: a epiderme formada por tecido epitelial, a derme formada por tecido conjuntivo e a hipoderme formada por tecido adiposo (figura 04). Suas células não são todas iguais: na epiderme, a camada mais superficial é o estrato ou camada córnea. Mais abaixo se encontram as camadas granulosa, espinhosa e basal. As diferentes camadas mostram as fases pelas quais passam as células, que, produzidas nos estratos mais profundos, sofrem o processo de cornificação à medida que atingem os estratos mais superficiais (DANGELO & FATTINI, 2005).

Figura 04 – Representação esquemática da estrutura da pele.

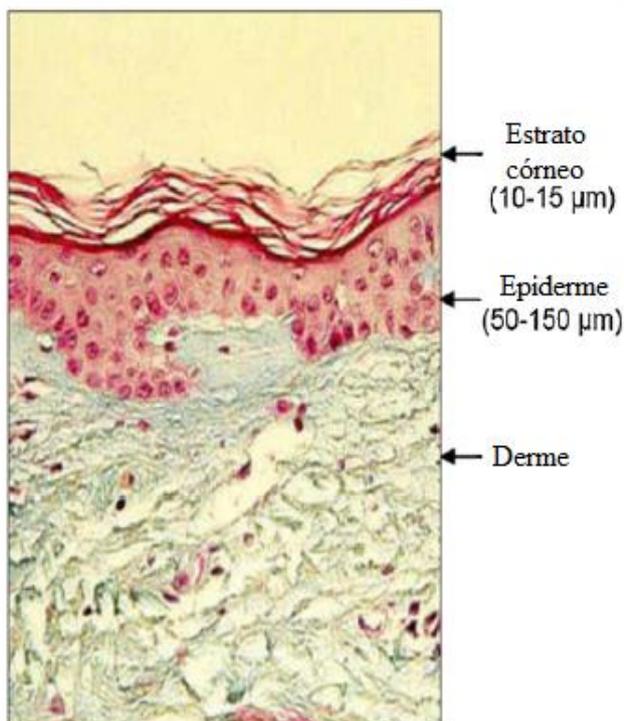


Fonte: <http://www.efdeportes.com/efd192/os-efeitos-do-acido-hialuronico.htm> - acessado em 03/01/2016.

A epiderme é a camada mais externa da pele, sem rede vascular e sua espessura varia de acordo com a região do corpo, sendo entre 15 e 150 μm , chegando a 0,6 mm nas plantas dos pés (BENVINDO, 2006; TOSATO, 2010). É uma camada em contínua renovação e proporciona o desenvolvimento de outras estruturas conhecidas como anexos (unhas, folículos pilossebáceos e glândulas sudoríparas). Sua principal característica é a estratificação, constituída por quatro camadas distintas: córnea, granulosa, espinhosa e basal (camada mais interna), descritas acima (TOSATO, 2010).

O estrato córneo (EC) é a camada mais externa da pele com cerca de 10-15 μm de espessura (figura 05), e é a barreira física real para as mais diversas substâncias que entram em contato com a pele, incluindo os medicamentos de uso tópico. A estrutura do EC é composta por corneócitos empilhadas em 18-20 camadas dependendo da localização anatômica no corpo, por corneodesmosomos, por lipídeos, por enzimas lipolíticas e proteolíticas, e por conteúdos secretados pelos corpos lamelares (MENON, CLEARY, LANE, 2012). A porcentagem de cada componente é cerca de 5-15% de lipídeo (incluindo fosfolipídios, glicofosfolídeos, colesterol) e de proteína 75-85% que é principalmente a queratina (corneócitos) (PATHAN & SETTY, 2009).

Figura 05 – Estrutura da pele.



Fonte: Menon, Cleary, Lane (2012)

A derme é constituída por fibras de colágeno e elastina e está subdividida em duas camadas: a derme papilar, mais superficial e em contato com a epiderme, que confere maior resistência à pele além de fornecer nutriente a epiderme por difusão, e a derme reticular, que confere elasticidade e resistência à compressão. A partir da derme emergem os apêndices cutâneos como folículos pilosos e glândulas sebáceas, além das glândulas sudoríparas (CHIEN, 1992, DANGELO & FATTINI, 2005).

A camada mais profunda da pele é a hipoderme ou tecido subcutâneo, formada por tecido conjuntivo frouxo, é constituída de lóbulos de lipócitos delimitados por septos de colágeno com vasos sanguíneos. Os lipócitos são arredondados e grandes. A estrutura da hipoderme fornece proteção contra traumas físicos, além de ser um depósito de calorías (BEMVINDO, 2006; TOSATO, 2010).

3.2.2 A pele animal

Estudos de permeação em pele animal desempenham um papel essencial na seleção de formulações contendo fármacos para uso tópico. Portanto, a escolha de modelos *in vitro* preditivos de permeação é altamente importante. O ideal seria o uso de pele humana para avaliar as propriedades de permeação de um fármaco. No entanto, as amostras de pele

humana de tamanho e qualidade adequadas para experimentos não são suficientes, são de difícil acesso para a maioria dos pesquisadores e em alguns casos, estão disponíveis apenas em limitados montantes (SCHMOOK, MEINGASSNER, BILLICH, 2001).

Assim, embora a pele animal e a pele humana não tenham as propriedades de permeabilidade idênticas, existem semelhanças significativas em relação à espessura da epiderme, à composição lipídica, as características morfológicas e fisiológicas e entre a permeabilidade aos diferentes compostos (SONGKRO *et al.*, 2003).

Uma ampla variedade de modelos animais são sugeridos como substitutos adequados a pele humana e estes tem sido utilizados para avaliar a permeação percutânea de moléculas. Esses modelos incluem roedores, primatas e suínos. O principal problema com o uso de pele de roedores como um modelo para a pele humana é que ele pode sobrestimar a permeação. A principal diferença a pele humana e a pele de roedores é a composição lipídica e organização no estrato córneo (GODIN & TOUITOU, 2007; FRIEND, 1992).

Alguns estudos tem relatado que a espessura do estrato córneo, e os parâmetros biofísicos tais como a difusividade e o coeficiente de permeabilidade da água através da pele do porco *in vitro* e da pele humana *in vivo* são correlacionáveis (Tabela 01) (SEKKAT *et al.* 2002).

Tabela 01 – Comparação dos parâmetros biofísicos das peles suína e humana *in vivo*.
H¹ (Espessura do estrato córneo), D² (difusividade da água através da pele), K_p³ (coeficiente de permeabilidade da água através da pele).

Pele	H ¹ (µm)	D ² (cm ² x s ⁻¹)	K _p ³ (cm x h ⁻¹)
Orelha de Porco (<i>in vitro</i>)	11,8 ± 4,0	3,2 ± 1,5	5,8 ± 1,1
Humana (<i>in vivo</i>)	10,9 ± 3,5	3,0 ± 1,5	6,1 ± 1,4

Fonte: SEKKAT *et al.* (2002) (apud TABOSA, 2014).

Assim, uma vez que a utilização de primatas na investigação é muito restrita, o modelo animal mais relevante tem sido o porco. A pele de porco é facilmente obtida a partir de matadouros e suas propriedades bioquímicas e histológicas foram repetidamente demonstradas como semelhantes à pele humana (GODIN & TOUITOU, 2007).

Outros estudos examinaram a espessura das camadas da pele suína e demonstraram que a espessura do EC está entre 21-26 µm. A epiderme viável suína apresenta espessura na faixa de 66-72 µm o que é muito semelhante a da epiderme humana que mede cerca de 70µm. A estrutura folicular da pele de porco, também se assemelha a dos seres humanos, com pelos e infundíbulo estendendo-se profundamente na derme. Uma média de 20 pelos

estão presentes por 1cm² de pele de porco e na pele humana uma faixa de 14-32 pelos (exceto área na testa). Além disso, as alterações anatômicas vasculares e os arranjos das fibras de colágeno na derme, bem como o conteúdo de glicoesfingolipídios e ceramidas no EC são semelhantes no homem e no porco. A pele de porco apresenta ainda o estrato córneo mais semelhante ao estrato córneo humano, em termos de composição lipídica (CILURZO, MINGHETTI, SINICO, 2007; GODIN & TOUITOU, 2007).

3.3 METRONIDAZOL

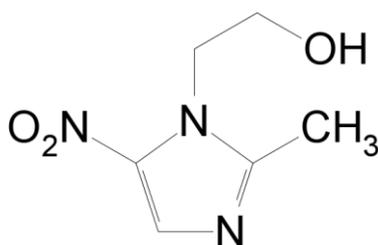
3.3.1 Características químicas

O metronidazol (MTZ) foi sintetizado pela primeira vez em 1957, quando pesquisadores do laboratório Rhône-Poulenc na França tentavam criar o azomicin, um produto sintético derivado de *Streptomyces spp.*, que apresenta atividade contra *Trichomonas vaginalis* (FREEMAN; KLUTMAN; LAMP, 1997). O MTZ embora, originalmente introduzido na terapia humana para o tratamento de tricomoníase, hoje é usado principalmente para infecções anaeróbias, protozoárias e do trato gastrointestinal, e como agente anti-inflamatório (LAMP *et al.*, 1999 ZIP, 2010; SILVA, 2002).

O MTZ foi o primeiro derivado 5-nitroimidazol inserido na terapêutica humana e ainda continua como o principal representante do grupo (SILVA, 2002). No mercado está disponível nas formas farmacêuticas de comprimidos revestidos, solução injetável, geléia vaginal, creme vaginal e gel tópico associado ou não a outros fármacos.

MTZ (figura 06) possui fórmula molecular C₆H₉N₃O₃ e peso molecular de 171,15g/mol. Sua nomenclatura química é 2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-etanol, apresenta-se como um pó cristalino, branco ou levemente amarelado com faixa de fusão 159°C a 163°C (F. BRAS, 2010). Pertence à categoria de classe I do sistema de classificação biofarmacêutica (SCB), apresentando assim alta permeabilidade através de membranas biológicas, e alta solubilidade em água (ISSA, 2011).

Figura 06 – Estrutura química do metronidazol.



Fonte: Farmacopeia Brasileira (2010)

3.3.3 Propriedades farmacocinéticas

O MTZ apresenta rápida e completa absorção após a administração via oral, já pela via tópica a absorção sistêmica é declaradamente baixa. Após a administração de 1g do gel (0,75%) na face de adultos com rosácea, as concentrações séricas resultantes variaram entre indetectável e 66 µg/ L em 24 horas seguintes (FREEMAN; KLUTMAN; LAMP, 1997). Em um estudo *in vitro* foi demonstrado que a penetração cutânea de metronidazol aumenta quando administrado em formulações com um elevado teor de água. Neste estudo, a penetração cutânea de metronidazol era significativamente maior quando administrado em formulações de gel e de creme a 0,75% do que em um creme a 1% (WAGNER *et al.*,1998).

A ligação às proteínas plasmáticas é menor do que 20% após a administração oral, após a aplicação tópica não foi relatada. Apresenta boa penetração celular e distribui-se bem por todos os tecidos e líquidos do organismo. Níveis terapêuticos são encontrados nos líquidos seminal e vaginal, na saliva, no leite, na placenta e no líquido cefalorraquidiano (CLARK, 2013; FREEMAN; KLUTMAN; LAMP, 1997; MCCLELLAN & NOBLE, 2000).

O metronidazol sofre biotransformação, principalmente por metabolismo oxidativo seguido pela glicuronização, com a formação de diversos compostos que são encontrados na urina. Esses incluem os metabólitos hidroxilados [1- (2-hidroxietil)-2-hidroximetil-5-nitroimidazol] e o metabólito ácido (1-ácido acético-2- metil-5-nitroimidazol). O principal metabólito é o hidroximetronidazol. O fármaco inalterado e os metabólitos oxidativos excretados na urina representam cerca de 35 a 65 % da dose administrada (RALPH,1983; CLARK, 2013).

3.3.4 Propriedades farmacodinâmicas

Seu mecanismo de ação ainda não é completamente elucidado, mas sabe-se que para o tratamento de infecções protozoárias anaeróbicas o grupo nitro do MTZ é capaz de servir como aceptor de elétrons, formando compostos citotóxicos que se ligam às proteínas e ao DNA levando a morte celular (CLARK *et al.*,2013).

O mecanismo pelo qual o metronidazol reduz o componente inflamatório da rosácea ainda não foi claramente estabelecido. Mas estudos demonstram que a droga reduz a lesão oxidativa do tecido através da inibição dos mediadores inflamatórios gerados por neutrófilos. O MTZ é inativo contra *Demodex folliculorum*, estafilococos, estreptococos, propionibactérias ou cocos anaeróbicos encontrados em lesões inflamatórias de pacientes com a doença. Em decorrência disso, o mecanismo de ação não parece estar ligado à supressão de bactérias da pele (MCCLELLAN & NOBLE, 2000).

O MTZ é bem tolerado quando administrado na forma gel, creme ou loção. O problema mais comum após o uso tópico é a reação local (ardor), mas isso tem sido relatado em $\leq 2\%$ dos doentes em ensaios clínicos e é de difícil distinção em relação aos sintomas da rosácea. As concentrações de metronidazol absorvidas sistemicamente após aplicação tópica são insignificantes, o que evita possíveis reações associadas ao uso do MTZ oral a longo prazo, como cefaleia, náusea, boca seca, gosto metálico, vômitos, diarreia e mal-estar abdominal. Além disso, interações medicamentosas são improváveis (GOODMAN & GILMAN, 2003; MCCLELLAN & NOBLE, 2000).

3.4 ROSÁCEA

3.4.1 A doença

A Rosácea é uma doença crônica inflamatória, caracterizada por eritema transitório ou persistente, vasos sanguíneos visíveis (telangiectasia), pápulas e pústulas que afetam principalmente a região centro-facial (RAGHALLAIGH *et al.*, 2015). A patogênese da rosácea é complexa e sua etiologia é desconhecida, mas, vários fatores têm sido implicados incluindo vasodilatação crônica com alterações inflamatórias subsequentes, defeitos na barreira da pele, hiperirritabilidade, elevada atividade da serina e da protease, alterações na imunidade inata, deposição de peptídeos derivados da catelicidina na pele, anormal reatividade vascular e respostas imunes a micro-organismos tais como *Demodex folliculorum* e *Helicobacter pylori*. Como resultado da limitada compreensão da multifatorial fisiopatologia da doença, as opções de tratamento não tem como alvo os mecanismos patogênicos e por isso não são curativos (BARCO & ALOMAR, 2008; FULLER & MARTIN, 2012; RAGHALLAIGH *et al.*, 2015; TAN & BERG, 2013).

A Rosácea pode ocorrer em qualquer idade, mas é mais frequentemente diagnosticada em mulheres na faixa etária entre 30 e 50 anos. As taxas de prevalência variam entre 1% a 22%, em relação às populações estudadas, e aos critérios de diagnóstico adotados (FULLER & MARTIN, 2012). Alguns dos fatores que se acredita provocar o aparecimento de sintomas ou agravar a situação incluem a exposição ao sol, estresse, tempo quente e frio, consumo de bebidas quentes ou contendo álcool e alimentos picantes (FELDMAN *et al.*, 2014).

3.4.2 Subtipos da Rosácea

O comitê de especialistas da Sociedade Americana de Rosácea em 2002, desenvolveu um sistema de classificação da rosácea para ajudar a padronizar seu diagnóstico entre clínicos e pesquisadores. A comissão dividiu os critérios de diagnóstico em

características primárias e secundárias, a presença de uma característica primária já é indicativa do diagnóstico. Características secundárias podem ou não estar presente, e em alguns casos podem ocorrer de forma independente. Os quatro subtipos são: Rosácea eritemato telangiectásica (Subtipo 01), Rosácea pápulo pustular (Subtipo 02), Rosácea fimatosa (Subtipo 03) e Rosácea ocular (Subtipo 04) (TWO *et al.*, 2015a).

3.4.2.1 Rosácea eritemato telangiectásica (Subtipo 01)

A rosácea eritemato telangiectásica (RET) apresenta-se na forma de rubor, com eritema centro facial persistente, e é provavelmente a forma mais comum de apresentação da doença. Embora sugira-se que a rosácea é essencialmente um distúrbio vascular cutânea, o rubor facial nem sempre é uma característica. Pacientes que relatam rubor como seu único sintoma não devem receber um diagnóstico de "pre-rosacea", uma vez que, em muitos desses casos, a rosácea não se desenvolve (CRAWFORD *et al.*, 2004; POWELL, 2005).

A porção central da face na maioria das vezes é o local de cor mais intensa, mas a vermelhidão pode também envolver a parte periférica da face, as orelhas, o pescoço e a parte superior do tórax. As causas mais comuns de rubor (por exemplo, fatores psicossociais ou ansiedade, comida, álcool ou drogas, ou menopausa) devem tornar-se evidentes quando um histórico médico é tomado. Episódios prolongados de edema grave acompanhado por sudorese, rubor que não se limitam ao rosto, devem ser investigados para que doenças como policitemia vera, lúpus eritematoso, dermatomiosite, doença mista do tecido conjuntivo, síndrome carcinoide, mastocitose e dermatite alérgica de contato sejam descartadas (CRAWFORD *et al.*, 2004; POWELL, 2005; TWO *et al.*, 2015a).

Normalmente, os pacientes com RET descrevem um rubor que pode durar mais de 10 minutos. Tal reação prolongada pode ajudar na diferenciação em relação ao rubor fisiológico. Os vasos telangiectásicos são geralmente proeminentes nas bochechas e nariz (figura 07). Grande parte dos pacientes também relata a presença de queimação, ardor, coceira ou secura e descamação nas áreas afetadas da pele, que aparecem após a exposição a agentes desencadeantes. (TWO *et al.*, 2015a; REINHOLZ *et al.*, 2013).

Figura 07 – Telangiectasias proeminentes e eritema da face medial.



Fonte: Powell (2005)

3.4.2.2 Rosácea pápulo pustular (Subtipo 02)

Pacientes com rosácea pápulo pustular (RPP), também conhecida como rosácea clássica tem as áreas centro facial, perioral, perinasal ou periocular acometidas tornando-as intensamente vermelhas, seguidas por uma inflamação episódica ou persistente caracterizada por pequenas pápulas encimadas por pústulas pontuais (Figura 08). Episódios de rubor e eritema persistente podem levar a um suave edema que endurece em alguns dias ou a um edema sólido sem ondulações na testa, na glabella, na porção superior das pálpebras, no nariz e nas bochechas. Telangiectasias são menos comuns comparadas à rosácea eritemato telangiectásica, e os episódios de rubor são menos frequentes e menos graves (BARCO & ALOMAR, 2008; CRAWFORD *et al.*, 2004).

Figura 08 – Rosácea pápulo pustular.



Fonte: Fuller & Martin (2012)

Os casos de inflamações conduzem ao edema crônico e alterações fímatosas são observadas em homens com este subtipo da doença, mas são distintamente raras em mulheres. As razões pelas quais esses sintomas acometem menos as mulheres são desconhecidas, mas acredita-se que estão relacionados às influências hormonais (CRAWFORD *et al.*, 2004).

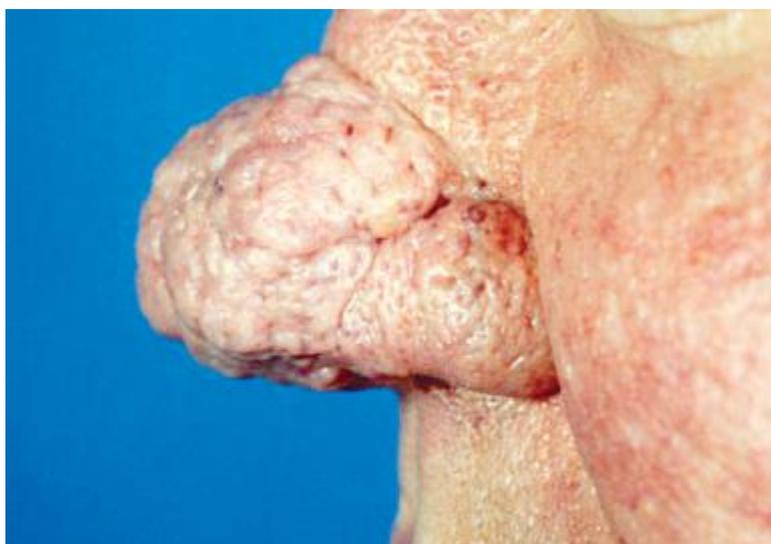
No grau 3 da doença placas de coalescência de lesões inflamatórias, vasos telangiectásicos, graus diversos de edema, inflamação ocular, e tendência a ruborizar estão presentes em alguns pacientes. O diagnóstico diferencial inclui acne vulgaris, dermatite perioral, e dermatite seborreica (POWELL, 2005).

3.4.2.3 Rosácea fimatosa (Subtipo 03)

A maioria dos pacientes com rosácea fimatosa são homens. Trata-se de pápulas ou nódulos e espessamento da pele, com acentuação dos orifícios foliculares, os quais podem conter acúmulo de sebo ou queratina. Telangiectasias nasais tendem a ser frequentes e é possível encontrar sinais de rosácea eritemato telangiectásica e pápulo pustular, a fimatose é normalmente precedida por esses subtipos (BARCO & ALOMAR, 2008; SCHEINFELD & BERK, 2010).

Os sinais são mais comumente vistos na superfície do nariz (rinofima), mas também podem estar presentes no queixo, na testa, nas orelhas, ou nas pálpebras. No grau 03 do subtipo, ocorre o alargamento e distorção do nariz, proeminência dos poros e espessamento da pele devido à hiperplasia das glândulas sebáceas e da fibrose do tecido conjuntivo (Figura 09). Ao contrário dos outros subtipos de rosácea, o tratamento do fimato frequentemente requer intervenção cirúrgica (POWELL, 2005; SCHEINFELD & BERK, 2010).

Figura 09 – Rinofima grau 03.



Fonte: Powell (2005)

Mesmo que a rinofima seja muitas vezes referida como "fase terminal da rosácea," ela pode ocorrer em pacientes com pouco ou nenhum sintoma da doença. O diagnóstico é feito com base na clínica, mas a biópsia pode ser necessária para distinguir entre atípica, nodular ou de outras patologias como de lúpus pernio (sarcoidose do nariz), carcinomas das glândulas sebáceas, angiosarcoma e até mesmo linfoma nasal (POWELL, 2005).

3.4.2.4 Rosácea ocular (Subtipo 04)

Embora a rosácea seja principalmente uma doença da pele, ela pode também afetar os olhos. A prevalência de envolvimento ocular não é conhecida, mas um estudo sugeriu que os problemas oculares são encontrados em 58% dos pacientes com rosácea. Estes pacientes foram diagnosticados por oftalmologistas como tendo algum tipo de envolvimento ocular inflamatório, geralmente blefarite e conjuntivite (Figura 10) (QUARTERMAN *et al.*, 1997).

Figura 10 – Eritema do nariz acompanhado de conjuntivite e blefarite.



Fonte: Barco & Alomar (2008)

Os sintomas mais comuns da rosácea ocular são blefarite e olhos secos; portanto, eles não são específicos. Pode ser uma sensação de corpo estranho, bem como secura, ardor, lacrimejamento, ou vermelhidão da margem palpebral. Esses graves problemas que afetam o filme lacrimal podem levar a alguns distúrbios da visão (visão borrada, aumento da sensibilidade à luz e hiperemia conjuntival). Blefarite (com telangiectases na margem palpebral, ocasionalmente, também calázio ou hordéolo) e conjuntivite são as manifestações mais comuns da rosácea ocular. Ocasionalmente, o edema pode afetar a tampa ou região periorbital. Pode ocorrer ulceração e neovascularização da córnea. Manifestações raras incluem esclerite e uveíte anterior (BROWNING & PROIA, 1986; REINHOLZ *et al.*, 2013).

Os pacientes muitas vezes culpam lentes de contato ou a poluição do ar para o seu problema e os sintomas não são relatados ao dermatologista. Os portadores da rosácea nodular na bochecha podem ter olhos tranquilos, e os pacientes com blefarite grave podem ter inflamação facial insignificante. Assim, a informação específica sobre o histórico de hordéolos, pode ser muito útil para o diagnóstico, já que são frequentes na rosácea (WEBSTER, 2009).

3.4.3 Tratamento

Devido ao limitado entendimento da fisiopatologia da doença, o tratamento é essencialmente sintomático e tem por objetivo alongar os períodos entre as crises e melhorar a aparência estética. A gama de tratamentos utilizados inclui preparações para cuidados com a pele, proteção solar, anti-inflamatórios, antibióticos, retinóides, terapia a laser e técnicas cirúrgicas. Para conseguir uma terapia mais direcionada é vantagem seguir o regime de tratamento recomendado para cada um dos subtipos da doença. Deve-se salientar que ambos os tratamentos orais e tópicos são ineficazes para a resolução das telangiectasias e que, todas as variantes podem apresentar melhora com a terapia a laser (BARCO & ALOMAR, 2008; DÍAZ *et al.*, 2010).

A terapia sistêmica é adequada ao tratamento de formas refratárias da rosácea, mas essa apresenta efeitos mínimos sobre o eritema. Os agentes mais comuns são as tetraciclina, doxiciclina e minociclina (REINHOLZ *et al.*, 2013). A isotretinoína via oral é frequentemente utilizada em casos graves e resistentes ao tratamento convencional. Apresenta efeito importante nas pápulas e pústulas e melhora do eritema. Os efeitos colaterais comuns são queilite, pele e mucosas secas, dores de cabeça e dor musculoesquelética. Tem efeito teratogênico e, portanto, requer o termo de consentimento informado para o uso em mulheres em idade fértil (DÍAZ *et al.*, 2010).

O tratamento tópico é normalmente suficiente em pacientes com rosácea eritemato telangiectásica ou pápulo pustular. Na doença grave, pode ser combinado com o tratamento sistêmico. O ácido azelaico é um dicarboxílico saturado que apresenta efeito anti-inflamatório, antioxidante, e antimicrobiano. O gel de ácido azelaico a 15% é recomendado para o tratamento tópico da rosácea na forma de pápulas inflamatórias e pústulas de leve a moderada. O mecanismo de ação exato é desconhecido, mas acredita-se agir na rosácea através da anti-queratinização e dos efeitos anti-inflamatórios (FELDMAN *et al.*, 2014).

A sulfacetamida sódica 5% e 10% possui ação queratolítica, antifúngica, e atividade antibacteriana. Essas preparações reduzem as lesões inflamatórias causadas pela rosácea, quando utilizadas como monoterapia ou em combinação com outros agentes. Embora o

mecanismo de ação permaneça pouco claro as sulfonamidas parecem atuar como antagonistas competitivos do ácido para-aminobenzóico, um componente necessário para o crescimento bacteriano. Os eventos adversos relacionados incluem reações no local da aplicação, secura, eritema e prurido (SCHEINFELD & BERK, 2010).

O metronidazol tópico tem sido utilizado como tratamento para a rosácea desde 1950. A eficácia clínica do fármaco tem sido atribuída à sua capacidade de reduzir a geração de oxigênio reativo e inativar a sua produção. Comparando a um placebo, o MTZ mostrou ser mais eficaz na redução do eritema, pápulas, e pústulas em múltiplos ensaios de pacientes com rosácea moderada à grave. O MTZ creme e gel disponíveis em duas concentrações (0,75% e 1%) mostraram-se igualmente eficazes em ambas as concentrações na redução do eritema, das pápulas e pústulas quando aplicados uma vez por dia, foi também demonstrado manter a remissão após a descontinuação do tratamento. Em comparação com 42% dos indivíduos que utilizaram tetraciclina, apenas 23% dos indivíduos do grupo do metronidazol apresentaram sintomas de uma recaída da doença em seis meses após a interrupção da terapia. O MTZ reduz o eritema em 50% dos casos, as pápulas em 77%, e as pústulas em 80% após 12 semanas de uso (BARCO & ALOMAR, 2008; LOWE, 2003; TWO *et al.*, 2015b).

No tratamento tópico não apenas os ingredientes ativos, mas também os diversos veículos (géis, emulsões e cremes) desempenham um papel importante na tolerabilidade e eficácia do tratamento da pele normalmente sensível em pacientes com rosácea (REINHOLZ *et al.*, 2013).

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 INSUMO

O insumo farmacêutico ativo (IFA) metronidazol (MTZ) foi cedido pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) com lote nº16754. O MTZ obtido do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – Fundação Oswaldo Cruz (INCQS – FIOCRUZ), Lote: W2F01, teor 99,6%, foi utilizado como substância química de referência. Todos os solventes e reagentes utilizados nas análises foram de grau analítico e as vidrarias previamente calibradas.

4.2 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES

4.2.1 Obtenção das formulações

Os géis testes foram obtidos através da reação de neutralização, após dispersão do polímero carbopol[®] em água purificada com o auxílio de um agitador mecânico (Fisaton[®] - modelo 752A) à velocidade de 900 rpm, seguido da incorporação do ativo previamente solubilizado em propilenoglicol com os demais componentes da formulação. Após a adição de todos os componentes os géis (tabela 02) permaneceram sob agitação durante 20 minutos. Finalizado este processo, os géis foram acondicionados em bisnagas de alumínio para posterior utilização e avaliação da estabilidade acelerada e de longo prazo. O gel referencia (Rozex[®]) foi adquirido em farmácia comercial no município de Recife/ PE.

Tabela 02 – Constituintes das formulações descritas como (Produto A e B, como teste 1 e 2, respectivamente) e Rozex como teste de referência.

Excipientes	Quantidade (%)		
	Teste 1 (Produto A)	Rozex (Produto B)	Teste 2 (Produto C)
Carbopol	1,0	X	1,5
Propilenoglicol	5	X	5
Metronidazol	0,75	0,75	0,75
Metilparabeno	0,18	X	0,18
EDTA	0,05	X	0,05
Propilparabeno	0,02	X	0,02
NaOH 20%	q.s.p. pH 4,0	X	q.s.p. pH 4,0
Água	q.sp. 100	q.s.p 100	q.s.p. 100

x= o percentual utilizado nas formulações não é conhecido.

4.2.2 Determinação do pH

O pH das formulações foi determinado através de pHmetro modelo PG 1800 (GEHAKA[®]), previamente calibrado com as soluções tampão pH 7,0 e pH 4,0, à temperatura ambiente.

4.2.3 Determinação da espalhabilidade

A determinação da espalhabilidade foi realizada pelo método adaptado de Borghetti & Knorst (2006). Em uma placa de vidro disposta sobre papel milimetrado, aplicou-se 0,5 g das formulações em avaliação e sobre cada uma delas foi colocada uma placa de vidro de peso conhecido. Após um minuto de espalhamento, o diâmetro foi aferido em posições opostas e o diâmetro médio calculado. Esse procedimento foi repetido até um total de 5 placas. Os resultados foram expressos em espalhabilidade da amostra em função do peso aplicado, de acordo com a equação abaixo:

$$Ei = d^2 \frac{\pi}{4}$$

Onde, Ei = espalhabilidade da amostra para um determinado peso i (mm²); d = diâmetro médio (mm).

4.2.4 Estudo de estabilidade física por determinação do comportamento reológico

Para a avaliação da estabilidade física as formulações, foram preparadas 24 horas antes da primeira análise e acondicionadas em bisnagas de alumínio (30g), sendo então armazenadas a temperatura ambiente (25°C) e em estufa termostaticada a 45°C por um período de 30 dias. O produto de referência Rozex[®] também foi avaliado seguindo os mesmos parâmetros.

Nos tempos 0 e 30 dias foram retiradas amostras das formulações que permaneceram por 24 horas em temperatura ambiente, para a determinação da viscosidade e do comportamento reológico (CAMARGO, 2006). O comportamento reológico e valores de viscosidades de todas as formulações geleificadas foram visualizados usando reômetro rotacional de cilindros concêntricos tipo Searle, MCR 301 (Anton Paar) e os dados foram plotados através do software Rheoplus (Anton Paar).

Procederam-se às análises utilizando 15 gramas das amostras e *spindle* ASTM 7. Todas as medidas foram efetuadas a 25°C, utilizando velocidades de rotação, progressivamente maiores (10 – 100 rpm), para obtenção da curva ascendente. O procedimento foi repetido no sentido inverso com velocidades, progressivamente menores (100 – 10 rpm), para obtenção da curva descendente. Os gráficos obtidos relacionam valores de velocidade de cisalhamento (1/s) e valores de tensão de cisalhamento (N/m²). A viscosidade aparente de cada formulação foi verificada com velocidade de rotação do *spindle* a 30 rpm.

4.2.5 Estabilidade acelerada

O estudo de estabilidade acelerada foi realizado de acordo com a RE nº 1, de 29 de julho de 2005 (ANVISA).

4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO DE ULTRAVIOLETA (CLAE-UV)

O método por CLAE-UV foi validado seguindo as orientações RE nº 899/2003 e da RDC nº 27/2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA Brasil, 2003) para os métodos analíticos e bioanalíticos, respectivamente. Foram avaliadas a linearidade, o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) de acordo com a diretriz RE nº 899/2003 e a especificidade, a seletividade, a exatidão, a precisão do método e estabilidade das amostras de acordo com a diretriz RDC nº 27/2012.

4.3.1 Soluções padrão

Dois conjuntos de soluções estoque foram preparados para a validação do método a uma concentração de 100 µg/ml de metronidazol base livre. Primeiro em acetonitrila: água (50:50 v/v) para análise dos dados das fitas do DPK *in vivo* e *in vitro* e segundo em tampão de fosfato de sódio monobásico (20 mM) pH 7,4 para análise dos dados de líquido receptor do estudo *in vitro*. A curva de calibração de metronidazol foi preparada em ambos os solventes com as concentrações de 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 15 e 20 µg/ml.

4.3.2 Análise cromatográfica

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) Shimadzu® equipado com detector ultravioleta (UV). A separação foi realizada em uma coluna de fase reversa C18 marca Shimadzu® 150 x 4,60 milímetros e uma pré-coluna C18 de 4 x 4 mm (5 µm), a 35°C, o comprimento de onda utilizado foi o 320 nm. Como fase móvel foi utilizado fosfato de sódio monobásico 20 mM pH 3,0: acetonitrila (88:12), a um fluxo de 1 mL/min e volume de injeção de 20 µL.

4.3.3 Linearidade, (LD) e (LQ)

Para avaliar a linearidade em ambos os solventes, três curvas de calibração diferentes foram preparadas. Cada curva de calibração foi obtida em sete níveis de concentrações de soluções de MTZ (0,1-20,0 µg/ml). As curvas de calibração foram ajustadas utilizando regressão linear dos mínimos quadrados. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ), foram estimados através das fórmulas $LQ = DP_a \times 10/IC$ e $LD = DP_a \times$

3/IC. Onde: DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y médio das três curvas e IC é a inclinação da curva de calibração.

4.3.4 Seletividade e especificidade

A especificidade foi avaliada em três amostras de fita (Scotch Book Tape, 3M, St. Paul, MN, USA), que são usados na remoção das camadas do estrato córneo da pele humana e de porco. Cada fita foi colocado em frascos de borosilicado (Clear Sep Cap Vials, 12 x 32mm, National Scientific Company) e adicionando 1,0 mL de acetonitrila e deixados sob agitação durante um período de 24 horas a 32 °C. Depois disso, as amostras foram submetidas a ultra-som (Quimis[®]) durante 30 minutos. Em seguida, foram centrifugados (Centribio[®]) a 3000 rpm durante 30 minutos. Em seguida, foram filtrados 0,45µm (Millex-HV-[®] PVDF) e analisadas pelo método de CLAE desenvolvido.

A seletividade do método foi verificada através da monitorização do MTZ na presença de componentes da formulação. Os géis de MTZ (0,75%) e o gel placebo foram diluídos a uma concentração teórica de 20 µg/ml em acetonitrila:água (50:50) e foram analisados pelo método de CLAE desenvolvido.

4.3.5 Precisão e exatidão

A precisão e exatidão foram determinadas em uma mesma corrida (intradias) e em três corridas diferentes em pelo menos dois dias distintos (interdias). Em cada corrida analítica foram realizadas cinco repetições, em cinco concentrações: limite de quantificação (LIQ = 0,1µg/mL), controle de qualidade de baixa concentração (3x LIQ = 0,3µg/mL), controle de qualidade de média concentração (CQM = 5,0µg/mL), controle de qualidade de alta concentração (CQA 75% -80% do limite superior de quantificação (LSQ) = 35µg / ml) e controle de qualidade da diluição de (CQD= 50 µg/mL), onde o último foi diluído para a concentração de 16µg/ml controlando assim o processo de diluição da amostra (ANVISA Brasil, 2012). Para a obtenção das amostras, as fitas foram contaminados com as respectivas concentrações em cinco repetições. A extração foi realizada com a adição de 1,0 ml de acetonitrila a cada frasco borosilicado, contendo as fitas, que foram deixados sob agitação durante seis horas a 32°C. Em seguida, foram filtradas 0,45µm (Millex-HV-[®] PVDF) e analisadas pelo método de CLAE desenvolvido.

4.3.6 - Estabilidade das amostras

Após a realização do procedimento de tape stripping cada fita precisa ser pesada novamente e só após isso o procedimento de extração pode ser realizado (estabilidade de

curto prazo). O procedimento de DPK *in vivo* para um voluntário pode durar uma semana. Então, normalmente, a fita pode ficar até sete dias entre o procedimento de tape stripping e o procedimento de extração. Considerando outros possíveis problemas, a estabilidade do fármaco nas fitas foi avaliada após 24, 48, 72hs, 7 e 15 dias. Foram contaminadas 30 fitas com uma quantidade conhecida de fármaco (5 µg/ mL).

Em relação à fase de extração do estudo de DPK, o número de fitas para cada local de aplicação da formulação no voluntário é cerca de trinta. Dependendo do número de voluntários em cada dia e do tempo de execução para análise de cada amostra, o procedimento pode durar até 48hs. Considerando assim, possíveis problemas a estabilidade do fármaco na solução extraída (estabilidade pós-extração) foi avaliada após 24, 48, 72hs, 7 e 15 dias. Para avaliar a estabilidade das amostras armazenada após a extração, 30 fitas foram contaminadas com uma quantidade conhecida de fármaco (5µg/ mL).

4.3.7 Recuperação

A recuperação do MTZ foi avaliada através da contaminação das fitas e da pele de porco com concentrações conhecidas (0,3, 5,0 e 16,0 µg/mL) de MTZ em triplicata. A recuperação foi realizada em fitas com estrato córneo humano e em fitas com estrato córneo de porco. As fitas foram deixadas em contato com as soluções por um período de 6 horas, para a garantia da completa evaporação do solvente. Após completa evaporação, as fitas foram colocadas em tubos borosilicato e foi adicionado 1 ml de acetonitrila, em seguida, os tubos foram mantidos sob agitação por 6 horas a 32°C, seguido de 30 minutos em banho de ultrassom. As soluções foram filtradas 0,45 µm (Millex[®] -HV-PVDF) e quantificadas pelo método de CLAE desenvolvido.

4.3.8 Método de extração do metronidazol das formulações

Para a análise do teor das formulações o metronidazol foi extraído a partir de 500 mg dos géis com 5 mL de N,N-dimetilformamida (Moderb[®] lote: 03064) e aquecimento durante 8 min a temperatura de 60 °C as diluições subsequentes foram realizadas em metanol: água (1:1) (BEDOR *et al.*, 2008). As amostras foram filtradas e analisadas pelo método desenvolvido.

4.4 ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DO METRONIDAZOL

4.4.1 Validação espectrofotométrica para quantificação do Metronidazol

As análises foram realizadas em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV mini-1240, em 320 nm. Os ensaios para determinação dos parâmetros de validação foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela RE 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). As amostras foram preparadas em tampão fosfato de sódio pH 7,4. Todas as soluções foram previamente filtradas em filtros de 0,45 µm antes da leitura.

O estudo da linearidade foi realizado nas concentrações de 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0; 20,0 e 25,0 µg/mL pela transferência de alíquotas de solução estoque de Metronidazol SQR 100 µg/mL (preparada em tampão 7,4). As diluições foram preparadas em três réplicas e empregadas na construção da curva analítica (concentração *vs* área do pico). A equação de reta e o coeficiente de correlação linear (*r*) foram calculados.

A partir da curva analítica foram estimados o limite de detecção (LCD) e o limite de quantificação (LQ), através das fórmulas $LQ = DP_a \times 10/IC$ e $LD = DP_a \times 3/IC$. Onde: DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y, médio das três curvas e IC é a inclinação da curva de calibração.

A precisão foi avaliada com base na repetibilidade, isto é, a correlação entre os resultados obtidos dentro de um curto período de tempo, utilizando a mesma instrumentação e o mesmo analista. Seis soluções de análise da amostra foram utilizadas na concentração de trabalho (10 µg/mL = 100% de concentração teórica). A precisão intradias foi avaliada analisando-se soluções padrão ($n=3$) nas concentrações de 10 µg/mL. As soluções foram analisadas e a seguir o coeficiente de variação (CV%) foi calculado. A precisão interdias foi avaliada dois dias consecutivos por dois analistas distintos.

No estudo da exatidão, foram utilizadas amostras em triplicata, em concentrações equivalentes a 5,0; 10,0 e 15,0 µg/mL, o que corresponde a 50%, 100% e 150% da concentração teórica do fármaco testado, metronidazol.

A robustez foi avaliada através da variação do fabricante de fosfato de sódio monobásico. Os resultados foram analisados pela análise de variância (ANOVA), o desvio padrão relativo ou coeficiente de variação e teste t de Student.

4.4.2 Seleção do meio receptor

A solubilidade do metronidazol foi determinada mediante o preparo de dispersões contendo excesso do fármaco (400mg). Nesse procedimento, ao excesso de Metronidazol foi

adicionado 5mL de diferentes meios receptores: tampão fosfato pH 7.4, solução hidroalcoólica (água:etanol = 50:50), tampão fosfato pH 7.4 com *polioxietileno 20-oleil éter* (Brij 98[®]) a 0,5% e a 3,0%, tampão fosfato pH 7.4 com polissorbato 80 (Tween 80[®]) a 0,5% e água.

Essas dispersões foram homogeneizadas por meio de agitação à temperatura controlada ($32 \pm 2^\circ\text{C}$), por um período de 24 horas e, em seguida, centrifugadas ($2500 \text{ g} \approx 3000 \text{ rpm}$) durante 30 minutos, retirou-se uma alíquota do sobrenadante e filtrou-se em filtro de membrana $0,45\mu\text{m}$. A concentração do metronidazol foi determinada através de espectrofotometria UV (320nm), utilizando a curva de calibração adequada para cada meio testado.

4.4.3 Preparo da membrana sintética hidrofílica

Foi utilizada membrana sintética de ésteres (acetato) de celulose (Millipore[®]; lote 02690), porosidade de $0,45\mu\text{m}$. A membrana foi previamente hidratada em tampão fosfato pH 7,4 por um período de 12 horas.

4.4.4 Montagem das células de Franz

O compartimento receptor das células de Franz foi completamente preenchido com solução receptora. As membranas sintéticas (de acetato de celulose) foram dispostas na célula de modo que ficassem em contato com a solução receptora sem a formação de bolhas. E no compartimento doador foi colocado 100 mg (área de exposição $1,04 \text{ cm}^2$) de cada formulação teste, incluindo o produto de referência, Rozex[®]. O sistema foi mantido sob agitação magnética (300 rpm). As células foram mantidas em banho circulante a $32 \pm 1^\circ\text{C}$.

4.4.5 Coleta e Quantificação das Amostras

Alíquotas de 3 mL foram coletadas nos tempos de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 e 6.0 horas, filtradas em membrana $0,45 \mu\text{m}$, o volume retirado durante as coletas foi repostado imediatamente com solução receptora. As amostras foram quantificadas através de espectrofotometria UV-VIS (método descrito no item **4.4.1**) e utilizadas nos cálculos da quantidade real liberada (equação 1). As análises foram realizadas em sextuplicatas para cada formulação. Os resultados foram plotados para a definição do modelo de cinética adequado para cada formulação.

$$Q_{real,t} = Ct.Vr + \sum Vc.Cc \quad (1)$$

Na qual:

$Q_{\text{real}, t}$ = quantidade real permeada referente ao tempo t ;

C_t = concentração obtida referente ao tempo t ;

V_r = volume de solução receptora (6 mL)

C_c = concentração da amostragem anterior

V_c = volume coletado

4.4.6 Análise da cinética de liberação in vitro

Para a avaliação da cinética de liberação do metronidazol no sistema, o resultado foi compilado em gráficos de dispersão xy, característicos de três modelos de cinética:

- Ordem zero: quantidade liberada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) *versus* tempo (h);
- Primeira ordem: log da quantidade liberada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) *versus* tempo (h).
- Higuchi: quantidade liberada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) *versus* raiz quadrada do tempo (h),

conforme a equação: $\frac{M_t}{M_\infty} = K_H \sqrt{t} + b$

A partir da análise de regressão linear, determinou-se o coeficiente linear (r) para cada modelo de cinética. O modelo que apresentou valor de r mais próximo a 1 foi selecionado. A taxa de liberação corresponde à inclinação (a) da porção linear do modelo de cinética selecionado (COSTA & LOBO, 2001).

4.5 ESTUDO DERMATOFARMACOCINÉTICO (DPK) IN VITRO/ IN VIVO

4.5.1 Procedimento de tape-stripping

O perfil de concentração do MTZ no EC após a aplicação foi determinado pela remoção sequencial das camadas de estrato córneo utilizando fita adesiva (Scotch Tape Livro, 3M, St. Paul, MN). Cada local de aplicação foi tratado com 30 fitas. Todas as fitas, foram pesadas antes e depois do procedimento de tape stripping em balança (Sartorius®) para posterior cálculo da quantidade de EC extraída. Após o procedimento de extração o MTZ foi analisado. Nenhuma das fitas foi descartada, assumindo que qualquer droga não removida da superfície da pele pelo processo de limpeza ao final do tratamento estaria eventualmente biodisponível.

4.5.2 Processamento das amostras

Depois de pesadas as fitas, o fármaco foi extraído; fitas 1 a 14 foram extraídas individualmente e as fitas 15-17, 18-20, 21-23, 24-26 e 27-30 foram agrupados para a extração. A extração foi realizada colocando-se as fitas em frascos de 1 ml de borosilicato

(Clear Sep Cap Vials, 12 x 32mm, National Scientific Company), adicionando 1,0 ml de acetonitrila em cada frasco, em seguida, foram deixadas sob agitação por um período de 6h a 32°C. A solução extraída foi então filtrada 0,45µm (Millex[®]HV-PVDF) e transferida para frascos de CLAE para análise.

4.5.3 Procedimento do estudo de DPK *in vitro* em pele da região dorsal do porco

A pele da região dorsal do porco foi obtida em matadouro local (Paulista, Pernambuco/Brasil); para garantir a integridade da barreira da pele, essa foi removida pós-sacrifício antes que a pele fosse exposta ao processo de limpeza habitual em alta temperatura. As peças de pele foram lavadas com água, e os pelos visíveis foram cortados com tesouras. Depois disso, a pele foi dermatomizada em 750 µm (Zimmerair dermatome, Dover, Delaware). Estas membranas foram armazenadas a -20°C até o momento do uso. Antes da utilização, a pele foi deixada descongelar durante 15 minutos.

Para verificar a função de barreira da pele, a medição da perda de água transepidérmica (TEWL) foi realizada com o Tewameter (Courage + Khazaka eletrônico GmbH -CK eletrônico). A pele de porco foi esticada na abertura da célula de Franz vertical (Vision[®]Microette), e mantida assim com o auxílio de uma garra; a área de pele exposta foi de 2,54 cm². Uma dose única de 143,5 mg de formulação tópica foi aplicada em duplicata, nas áreas expostas. O lado dérmico da pele foi mantido em contato com o líquido receptor constituído por tampão fosfato de sódio monobásico (20 mM) pH 7,4, o qual foi mantido em constante agitação por uma barra magnética.

Depois de 6 horas (tempo de absorção), a formulação residual foi removido da pele de porco com swabs contendo álcool isopropílico Biosoma[®] (duas vezes) e uma amostra (1 mL) de líquido receptor foi coletada. Imediatamente após, a pele foi delimitada por um molde (1,77 cm² em área) e foi realizado o procedimento de tape stripping. O EC foi progressivamente obtido pela remoção sequencial das fitas (fita Scotch Reserve, 3M, St. Paul, MN, EUA), após a aplicação de uma pressão constante usando uma pinça. Trinta fitas foram utilizados em cada pele de porco. Cada fita foi pesada antes e após a remoção do estrato córneo em uma balança de precisão (marca Shimadzu[®]) para determinar a massa e a espessura da camada do EC removido (HERKENNE *et al*, 2006;. KALIA *et al*, 1996;. KALIA *et al*, 2001). O MTZ presente em cada fita foi subsequentemente extraído e analisado pelo método analítico descrito.

4.5.4 Procedimento do estudo de DPK *in vivo* em voluntários humanos sadios

4.5.4.1 Comitê de ética e seleção dos voluntários

O estudo foi realizado em conformidade com os princípios da Declaração de Helsinki e suas alterações (Associação Médica Mundial, 2008) e da Conferência Internacional sobre Harmonização Guia para a Boa Prática Clínica (Conferência Internacional de Harmonização, 1996). O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CAAE 34657814.2.0000.5208).

Os critérios de inclusão foram: idade entre 18-40 anos; homem ou mulher não grávida de qualquer origem étnica; saudável; não fumante; disposição para fornecer informações básicas (ex., idade, altura, peso, sexo e etnia); fornecer consentimento informado por escrito antes do início de qualquer procedimento de estudo; concordar em não participar de outro ensaio clínico durante o período de estudo; capaz de se comunicar bem com os investigadores; capaz de aderir às restrições do estudo e do cronograma de exame; ter um antebraço de pelo menos 22 cm de comprimento já que a área de trabalho começa, pelo menos, 5 cm do pulso e termina com um mínimo de 0,5 cm abaixo da curva do braço no cotovelo.

Os critérios de exclusão foram: história relatada pelo participante da pesquisa ou evidente para o investigador de doença infecciosa ou infecção de pele ou de doença de pele crônica (por exemplo, psoríase, dermatite atópica); doenças de pele hereditárias ou quaisquer condições inflamatórias da pele, conforme relatado pelo participante da pesquisa ou evidente para o investigador; excesso de pigmentação, cabelo, defeitos da pele, queimaduras solares, manchas ou tatuagens, que possam interferir com a avaliação de drogas; grávida ou lactantes; obesos com $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$; fumante e ter consumido álcool nas 24 horas anteriores ao estudo com base em informações fornecidas pelo voluntário; participação em qualquer outro ensaio clínico de estudo ou cosmético; utilização simultânea de quaisquer medicamentos de uso tópico na área local do ensaio, ter realizado exercício extenuante durante o período do estudo: aeróbica, natação, ciclismo, etc; planeja expor os antebraços à luz solar / UV na semana seguinte participação; incapacidade de atender a todos os pontos de tempo de coleta de dados; por último, os voluntários foram instruídos a abster-se de tomar qualquer medicação uma semana antes e durante o período do estudo. Para a determinação dos parâmetros farmacocinéticos oito voluntários adultos foram recrutados.

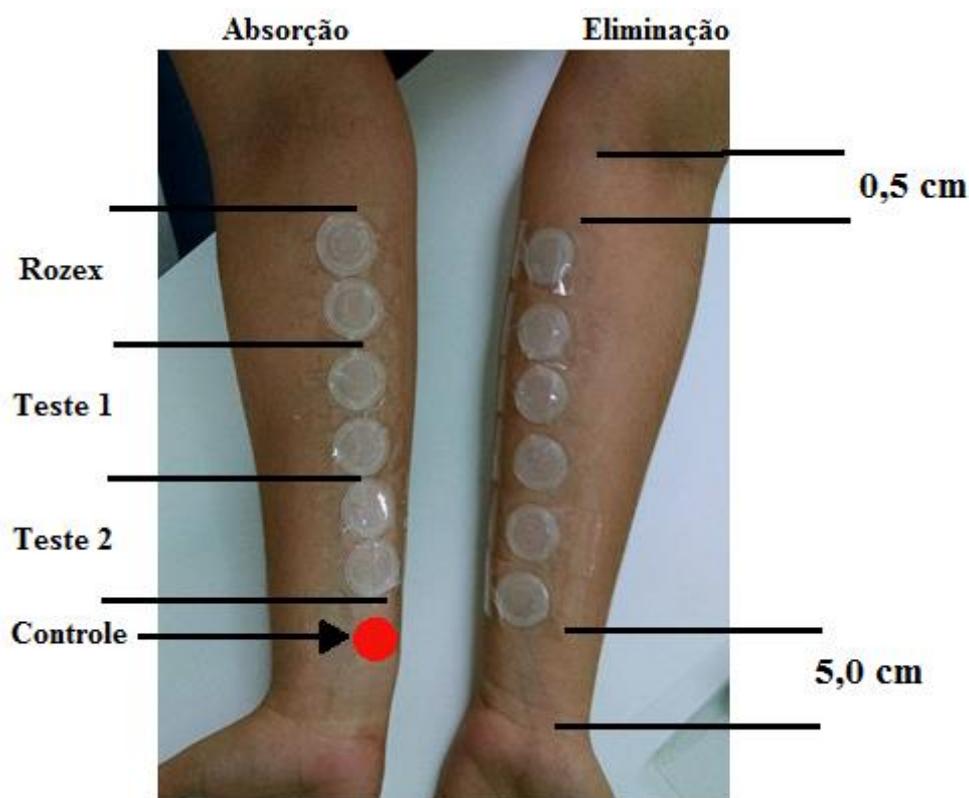
4.5.4.2 Tolerabilidade

Tolerabilidade foi avaliada registrando os eventos adversos relatados espontaneamente pelos voluntários e visualmente observadas durante o tempo do estudo.

4.5.4.3 Estudo de Bioequivalência *in vivo* de formulações de MTZ através da DPK

No dia do estudo, o antebraço foi higienizado. Após 1 hora, as formulações foram aplicadas em 12 locais de tratamento (três formulações por voluntário, dois locais de aplicação por antebraço e formulação) que foram randomizados, mas a mesma ordem foi mantida por antebraços de cada voluntário (figura 11). Em um local não tratado foi realizado o tape stripping que foi utilizado como controle branco (sem fármaco) para a análise dos dados.

Figura 11 – Seis locais de aplicação das formulações demarcados na porção ventral de cada antebraço.



Fonte: Acervo pessoal.

Cada local de aplicação (2.54cm^2 na área) foi demarcado com uma moldura em forma circular de adesivo (Scotch Tape Livro, 3M, St. Paul, MN, EUA). Uma dose de 143,5 mg de cada formulação foi aplicada em cada local com o dedo calçado por uma luva, no antebraço e ocluído com um molde de oclusão ($4,9\text{cm}^2$ na área).

Depois de 6 horas (tempo de absorção), a formulação residual foi removido de todos os locais de aplicação com o auxílio de swabs contendo álcool isopropílico (duas vezes) Biosoma[®]. Imediatamente a seguir, a metade dos locais de aplicação foi delimitada por um molde (1,77 cm² em área) e foi realizado o procedimento de tape stripping. O EC foi progressivamente obtido pela remoção sequencial das fitas (fita Scotch Reserve, 3M, St. Paul, MN, EUA), após a aplicação de uma pressão constante usando uma pinça. Trinta fitas foram utilizados em cada local de aplicação. Para verificar a função de barreira da pele, foi medida a perda de água transepidérmica (TEWL) como o auxílio do Tewameter (Courage + Khazaka eletrônico GmbH -CK eletrônico). Cada fita foi pesada antes e após a remoção do estrato córneo em uma balança de precisão (Sartorius[®]) para determinar a massa e a espessura da camada do EC removido (HERKENNE *et al*, 2006;. KALIA *et al*, 1996;. KALIA *et al*, 2001). O MTZ presente em cada fita foi subsequentemente extraído e analisado pelo método analítico descrito.

O voluntário retornou ao local do estudo após 12 h do início do teste e o procedimento de tape stripping foi realizado nos locais restantes, que correspondem ao tempo de eliminação.

4.5.4.3.1 Análise dos dados para avaliação da Bioequivalência

O valor médio e os intervalos superior e inferior com de 90% confiança foram calculados para cada produto i e considerando todos os voluntários para três grandezas:

- (a) concentração de fármaco no EC do produto i (Q_i);
- (b) razão (R_i) entre a concentração de fármaco no EC do produto i (Q_i) e a concentração de fármaco do produto de referência (Q_{ref});
- (c) razão (W_i) entre a concentração de fármaco após a eliminação ($Q_{i|eliminação}$) e a concentração antes da eliminação ($Q_{i|absorção}$).

Ambos Q_i e R_i foram calculados para 6 horas de absorção ou 12 horas de eliminação.

Considerando, que as medidas de absorção cutânea apresentam uma distribuição log-normal. Por tanto, previamente à análise estatística, realizou-se a transformação logarítmica de todas as grandezas de forma a normalizar a distribuição dos dados analisados (CORNWELL, *et al*. 1995).

Com o número k de réplicas para cada formulação i em cada j voluntário, foram calculados os valores médios das concentrações encontradas no estrato córneo log-transformadas. Os logaritmos relações R_i das e W_i foram calculados para cada voluntário j .

Como o logaritmo da razão de dois números é a diferença dos seus logaritmos, foi possível excluir da análise estatística a variabilidade intrínseca dos voluntários, de forma análoga ao que ocorre no procedimento do teste-t pareado usual.

Para as três grandezas, o valor médio, o desvio padrão e o intervalo de confiança superior e inferior de 90%, com base na distribuição t de Student, foram calculados.

Com a massa e a espessura da camada EC removidos, as concentrações foram expressas como a quantidade de fármaco (μg) por mg de EC ou cm^3 de cada fita. Em seguida, o mesmo cálculo descrito anteriormente foi refeito utilizando o montante de MTZ por mg de EC (após a normalização).

Para a avaliação da bioequivalência, tradicionalmente, os produtos são considerados bioequivalentes se no intervalo de confiança de 90% da razão das médias geométricas da população está contido no intervalo de 0,8 a 1,25 (FDA, 2007). Assim, os produtos A e B são considerados: (a) bioequivalentes se $R_{i,90\%,\text{superior}}$ e $R_{i,90\%,\text{inferior}}$, são ambos contidos no intervalo de 0,8-1,25, (b) não-bioequivalentes se $R_{i,90\%,\text{superior}}$ e $R_{i,90\%,\text{inferior}}$ não são ambos contidos no intervalo de 0,8 para 1,25, e (c) inconclusiva se nem o critério da bioequivalência nem o da não-bioequivalência é satisfeito.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES

5.1.1. Determinação do pH

A concentração hidrogeniônica da superfície cutânea é vista como um importante indicador funcional da pele, pois a produção de ácido láctico confere à superfície cutânea o que se convencionou chamar por “manto ácido cutâneo” (ZLOTOGORSKI, 1987). Um fator importante são as secreções cutâneas que apresentam apreciável capacidade tamponante, uma vez que o pH da pele é frequentemente alterado em consequência da forte exposição a agentes externos. Assim sendo, a pele apresenta um pH levemente ácido (4,6 – 5,8), que contribui para que ocorra proteção bactericida e fungicida em sua superfície (LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002). No caso das formulações estudadas, os pHs encontraram-se na faixa de 4,1 a 4,6, evidenciando que este parâmetro não foi afetado significativamente com a incorporação do metronidazol nos géis (tabela 03).

Tabela 03 – Valores médios de pH e espalhabilidade das formulações estudadas.

Parâmetro	Rozex (Produto B)	Teste 1 (Produto A)	Teste 2 (Produto C)
pH \pm SD	4,59 \pm 0,05	4,40 \pm 0,03	4,15 \pm 0,070
Espalhabilidade (mm ²) \pm DP	2595,8 \pm 24,7	4032,4 \pm 116,7	779,0 \pm 77,8

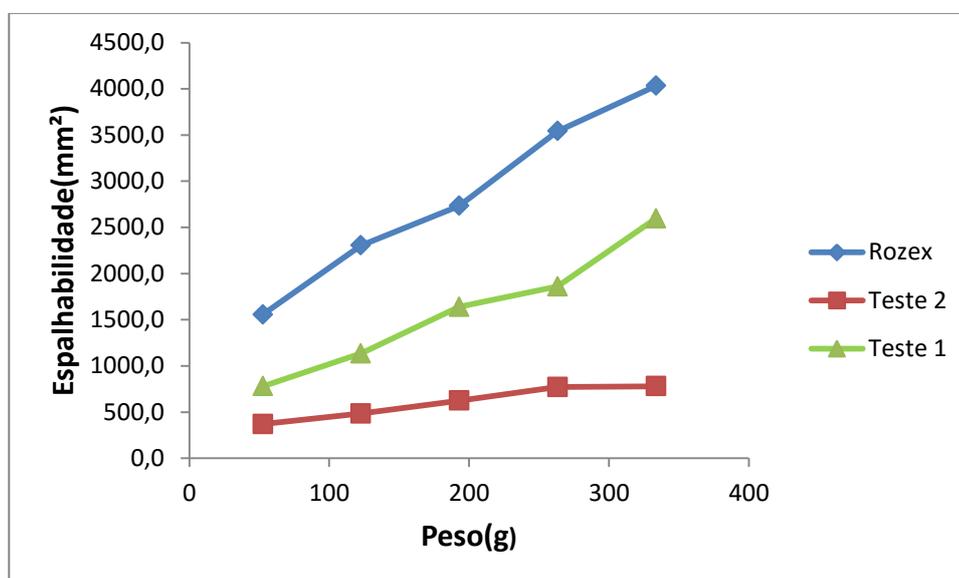
5.1.2 Determinação da espalhabilidade

Uma das características essenciais das formas farmacêuticas destinadas à aplicação tópica é a espalhabilidade. Por definição, a espalhabilidade é a expansão de uma formulação semi-sólida sobre uma superfície após um determinado período de tempo, assim ela está intimamente relacionada à aplicação destas formulações no local de ação (FELTKAMP, FUCKS, SUCKER, 1983; Knorst, 1991).

Os valores de espalhabilidade obtidos para os géis, em função do peso adicionado estão representados na tabela 03 e na Figura 12.

A análise dos dados da espalhabilidade demonstrou ($p < 0,05$) que não existe diferença estatisticamente significativa entre o Teste 1 e o produto de referencia (Rozex). Já entre o teste 2 e o produto de referencia (Rozex) e o teste 1 e o teste 2 foi observada uma diferença significativa, resultado do aumento na concentração do agente geleificante em 0,5%, em relação ao teste 1.

Figura 12 – Espalhabilidade das formulações estudadas.



5.1.3 Estudo de estabilidade física por determinação do comportamento reológico

Os valores de viscosidade aparente obtidos (tabela 04) mostram que a viscosidade das formulações diferem entre si. O teste 1 e o produto de referencia (Rozex), são semelhantes estaticamente, já o teste 2 e o produto de referencia(Rozex) e o teste 1 e o teste 2 são diferentes estatisticamente com 95% de confiança.

O estudo do comportamento reológico das formulações objeto de estudo foi avaliado por meio dos reogramas (Figuras 13 a 15) e dos valores de viscosidade aparente (Tabela 04), obtidos ao longo do período de 30 dias.

Tabela 04 – Valores médios da viscosidade aparente (Pa/s) das formulações nos tempos inicial e 30 dias sob duas diferentes condições de armazenamento.

	t0 ± DP (30 rpm)	30 dias a 25 °C ± DP (30 rpm)	30 dias a 45°C ± DP (30 rpm)
Rozex	22,53±0,11	24,33±0,42	24,69±0,68
Teste 1	19,67±0,12	22,07±0,75	24,1±0,62
Teste 2	28,61±0,16	31,64 ±0,09	40,35±0,26

Figura 13 – Gráfico da tensão de cisalhamento x taxa de cisalhamento do Rozex.

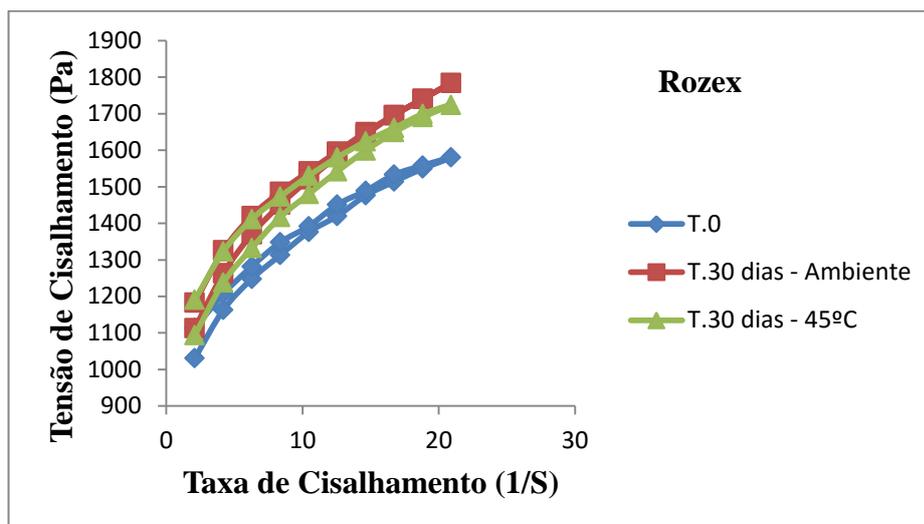


Figura 14 – Gráfico: tensão de cisalhamento x taxa de cisalhamento do Teste 1.

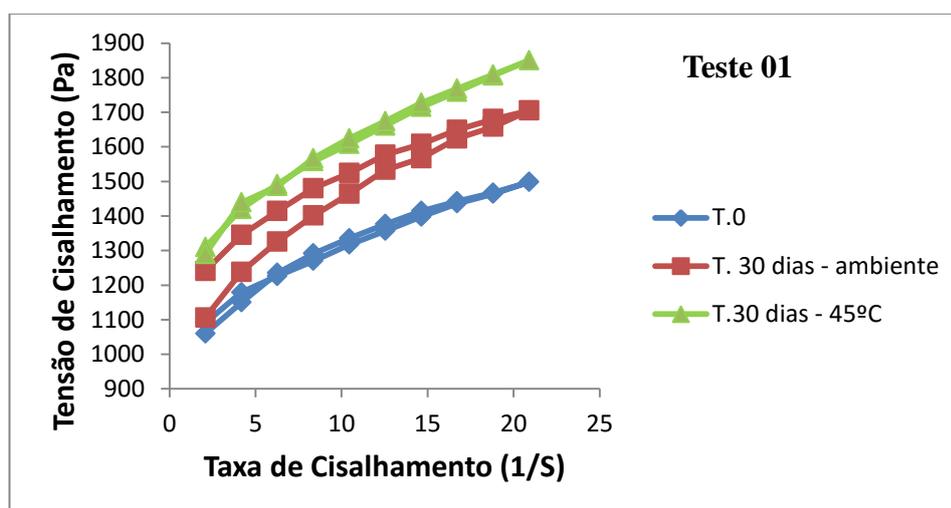
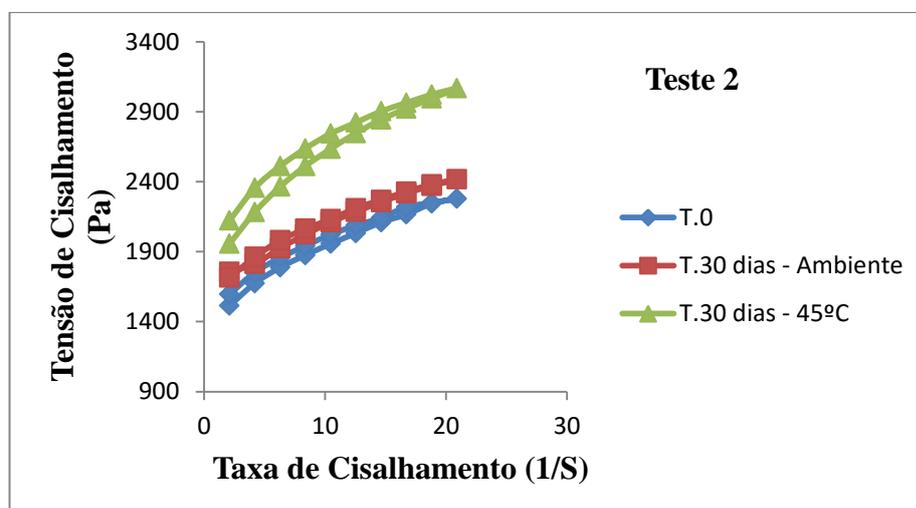


Figura 15 – Gráfico da tensão de cisalhamento x taxa de cisalhamento do Teste 2.



A manutenção da viscosidade frente ao armazenamento, principalmente na temperatura elevada (45 °C) indica boa estabilidade física de todos os géis no prazo estudado.

Os valores de viscosidade aparente obtidos mostram que todas as formulações tiveram sua viscosidade aumentada em função do tempo e das condições de armazenamento. Verifica-se, também, que a estocagem das formulações (durante um período de 30 dias) não alterou muito os valores de viscosidade do Rozex e do Teste 1, o que indica que o umectante presente na formulação foi eficaz na retenção da água. Já o Teste 2 teve sua viscosidade alterada significativamente quando armazenado a 45°C. A viscosidade é a medida da resistência do fluido ao fluxo de um sistema após a aplicação de estresse. Sendo assim, quanto maior a viscosidade, maior será a resistência e a força aplicada para produzir o fluxo com determinada velocidade (CORREA *et al.*, 2005).

Pela análise dos reogramas obtidos todos os géis estudados apresentaram comportamento pseudoplástico e tixotropia. Corroborando com o fato de géis hidrossolúveis possuírem na maioria das vezes, comportamento reológico do tipo pseudoplástico e tixotrópico, ou seja, deformam-se durante a aplicação tornando-se mais fluidos, facilitando o espalhamento e recuperando a viscosidade inicial no momento em que encerra a aplicação, evitando que o gel escorra sobre a pele (AULTON, 2005).

Além disso, o produto tixotrópico tende a ter maior vida de prateleira (“shelf-life”), pois durante o armazenamento, este apresenta viscosidade constante, o que dificulta a separação dos constituintes da formulação (CORREA *et al.*, 2005).

5.1.4 Estabilidade acelerada

A tabela 05 mostra os resultados da avaliação da qualidade dos géis de carbopol contendo MTZ no tempo zero. Pode ser observado que todas as amostras apresentaram consistência característica de gel, com a cor levemente amarelada (característica do MTZ) e odor característico de géis de carbopol.

O pH dos géis apresentou valor 4 no tempo zero, devido no momento da manipulação as amostras terem sido ajustadas para este valor, pois conforme Allen Junior, Popovich e Ansel (2007), cada fármaco deve ser mantido em um valor de pH mais favorável à sua estabilidade e isso varia de acordo com a formulação e local de aplicação.

Tabela 05 – Avaliação da estabilidade dos géis de MTZ no tempo zero.

Amostras (Gel)	Consistência	Cor	Odor	pH	Peso (g)	Teor de MTZ
Teste 1	++	Levemente amarelado	Inodoro	4,40±0,03	50	99%
Tese 2	++	Levemente amarelado	Inodoro	4,15±0,33	50	98%

Consistência: ++ (gel viscoso); + (gel pouco viscoso); - (sem viscosidade). N=3

De acordo com a RE nº01/2005 (ANVISA), para fins de prazo de validade a perda de água, no estudo da estabilidade acelerada, não deve ser maior do que 5% do valor de análise inicial. Assim sendo a perda de água das formulações encontra-se dentro do limite especificado tanto para 90 dias quanto para 180 dias, como demonstrado nas tabelas 06 e 07.

Quanto ao teor do ativo (MTZ), como demonstrado nas tabelas 5-7, as amostras apresentaram teores dentro dos limites recomendados pela Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010), que devem ser de 90 - 110%, mesmo após o período de acomodação em câmara climática.

Tabela 06 – Avaliação da estabilidade dos géis de MTZ no tempo 90 dias.

Amostras (Gel)	Consistência	Cor	Odor	pH ±DP	Perda de água (%)	Teor de MTZ
Teste 1	++	Levemente amarelado	Inodoro	4,39±0,02	0,404	98%
Tese 2	++	Levemente amarelado	Inodoro	4,13±0,01	0,847	98%

Consistência: ++ (gel viscoso); + (gel pouco viscoso); - (sem viscosidade). N=3

Tabela 07 – Avaliação da estabilidade dos géis de MTZ no tempo 180 dias.

Amostras (Gel)	Consistência	Cor	Odor	pH ± DP	Perda de água (%)	Teor de MTZ
Teste 1	++	Levemente amarelado	Inodoro	4,41±0,01	1,458	98%
Tese 2	++	Levemente amarelado	Inodoro	4,10±0,01	1,049	96%

Consistência: ++ (gel viscoso); + (gel pouco viscoso); - (sem viscosidade). N=3

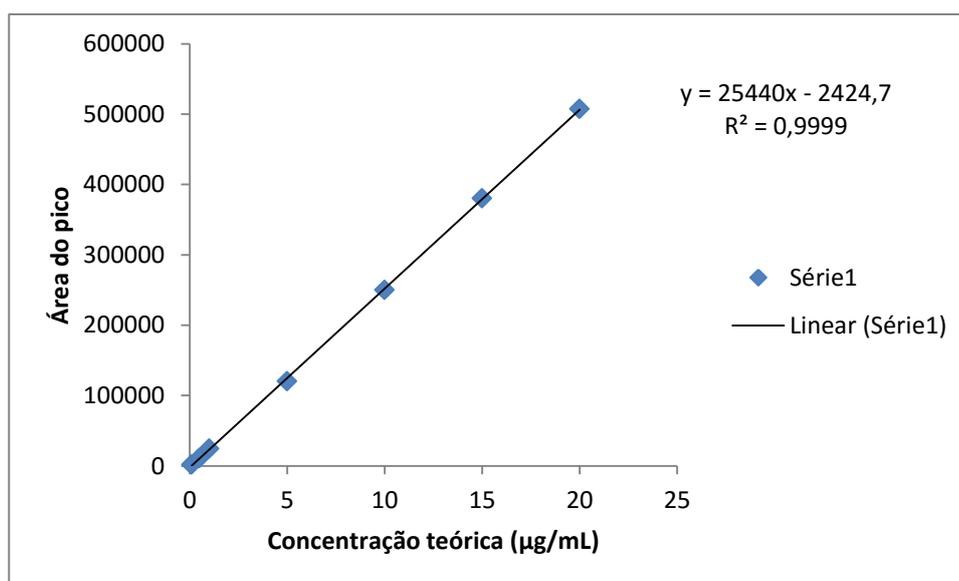
Considerando os dados da estabilidade acelerada as formulações podem ser consideradas estáveis.

5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO DE ULTRAVIOLETA (CLAE-UV)

5.2.1 Linearidade, (LD) e (LQ)

A curva de calibração do metronidazol demonstrou que o método é linear no intervalo de 0,1-20 $\mu\text{g/mL}$. A equação da reta obtida foi $y = 25440x - 2424,7$, com um coeficiente de correlação de $r^2 = 0,9999$. Segundo a ANVISA (BRASIL, 2003), o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,99. Sendo assim, o valor de r^2 obtido na análise do MTZ pelo método CLAE-UV desenvolvido obedece aos limites estabelecidos (Figura 16). Os valores obtidos para o LD e LQ foram 0,0322 $\mu\text{g/mL}$ e 0,1074 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

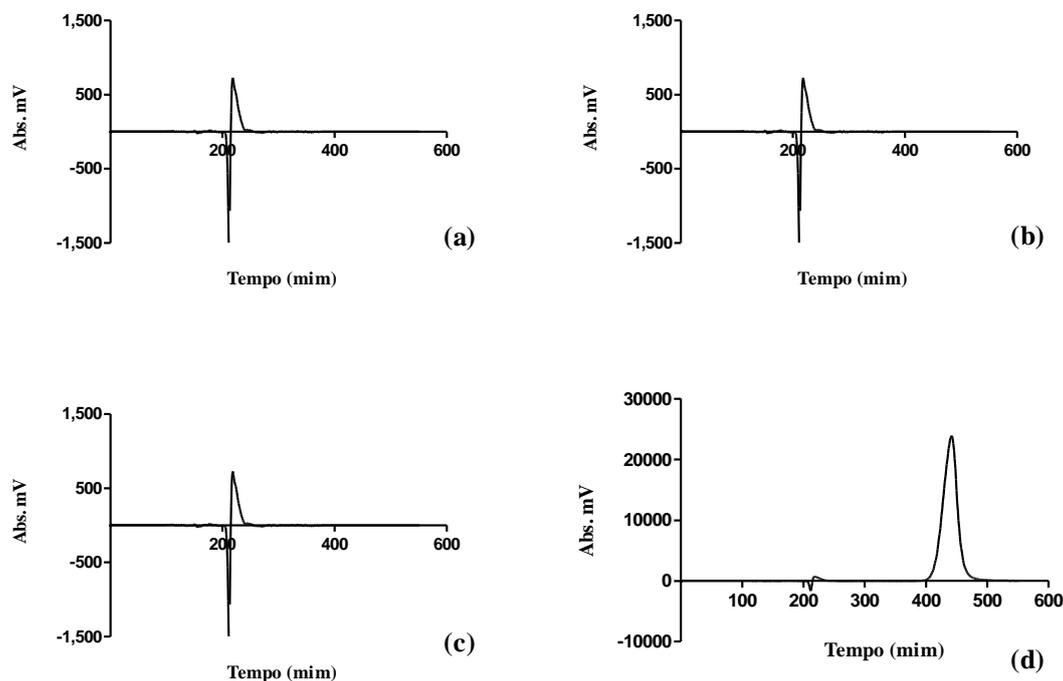
Figura 16 – Curva da Regressão Linear obtida da média de três curvas de calibração autênticas.



5.2.2 Seletividade e especificidade

O método validado mostrou seletividade e especificidade, e não houve interferência de outros componentes (placebo) quando comparado com as amostras padrão, conforme figura 17.

Figura 17 – Cromatograma indicativo da seletividade do método (a) Placebo, (b) pele de porco, (c) pele humana e (d) solução padrão de MTZ.



5.2.3 Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão intradias e interdias foram satisfatórias. Os dados obtidos para as fitas em humanos e para as fitas em suínos (Tabela 08) estão em conformidade com os limites aceitáveis de acordo com a resolução para validação de métodos bioanalíticos (ANVISA, 2012).

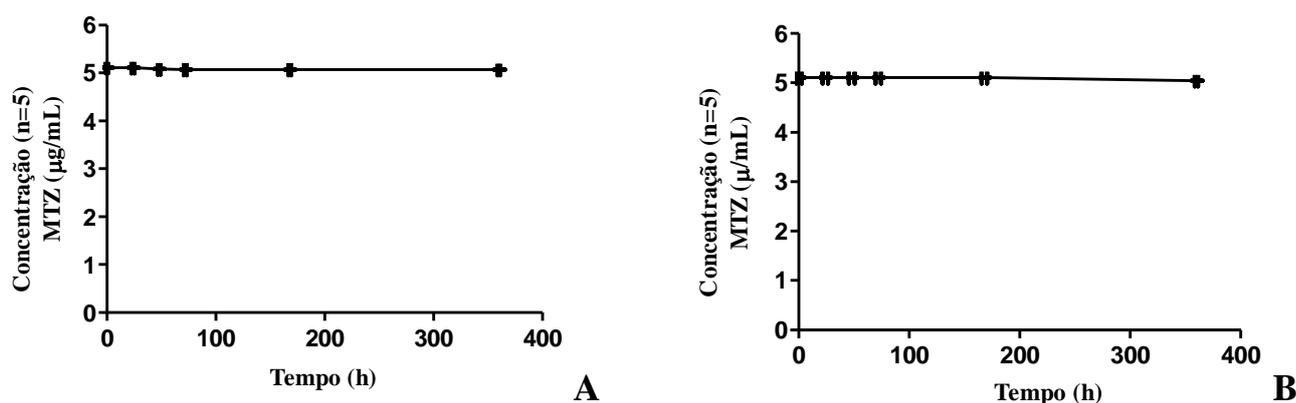
Tabela 08 – Resultados da precisão e exatidão para as fitas em pele humana e em pele de porco.

Precisão e exatidão								
Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Intradias ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (n=5)			Interdias ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (n=15)				
	Humano	Porco		Humano		Porco		
	Média \pm DP	Média \pm DP	Média	Precisão (%)	Exatidão (%)	Média	Precisão (%)	Exatidão (%)
0,1	0,13 \pm 0,04	0,10 \pm 0,07	0,14	18,3	18,07	0,11	10,13	15,93
0,3	0,30 \pm 0,02	0,33 \pm 0,12	0,30	12,34	0,79	0,33	11,06	12,34
5,0	4,75 \pm 0,41	4,37 \pm 0,14	4,86	9,45	2,86	5,15	8,58	3,08
16	14,77 \pm 1,49	15,9 \pm 0,03	14,33	9,49	7,12	15,83	15,83	1,59
50	47,67 \pm 1,25	49,4 \pm 0,05	47,66	4,92	4,67	48,98	4,45	3,94

5.2.4- Estabilidade das amostras

Os dados de amostras em diferentes formas de armazenagem de estabilidade demonstraram que as concentrações não foram significativamente modificadas (Figura 18A e 18B). Assim, as amostras foram estáveis durante até 15 dias sob as condições de armazenagem avaliadas.

Figura 18 – Amostras armazenadas antes do processo de extração (A) e amostras armazenadas após o processo de extração (B).



5.2.5 Recuperação

A tabela 09 apresenta os valores médios de recuperação no estrato córneo (amostras contaminadas) e pele de porco (epiderme e derme). Os resultados estão em percentual recuperado de MTZ. Estes resultados confirmam que o processo de extração é eficiente para a recuperação do MTZ nas fitas e na pele de porco, uma vez que a substância pode ser recuperada em quantidade significativa.

Tabela 09 – Valores médios para a recuperação no estrato córneo (amostras contaminadas) e pele de porco (epiderme e derme).

	Concentração								
	0,3 µg/mL (n=3)			5,0 µg/mL(n=3)			16µg/mL (n=3)		
	Média± DP (µg/mL)	CV (%)	Recuperação (%)	Média± DP (µg/mL)	CV (%)	Recuperação (%)	Média± DP (µg/mL)	CV (%)	Recuperação (%)
Estrato córneo	0,292±0,03	3,17	97,45	4,93±0,01	1,20	98,72	15,31±0,04	4,53	95,71
Epiderme /derme	0,293±0,01	1,40	97,99	4,86±0,03	3,51	97,25	15,72±0,02	1,98	98,29

5.2.6 Teor das formulações

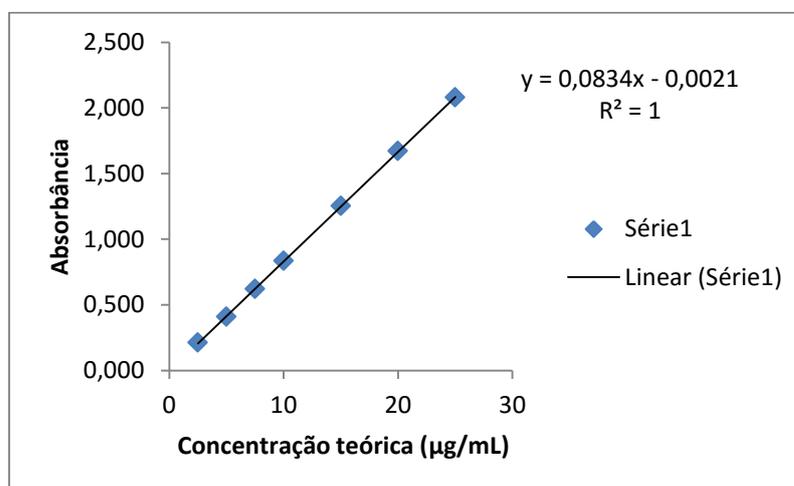
A quantidade de MTZ em cada uma das três formulações não apresentou diferenças significativas entre si (one-way ANOVA, $P = 0,62$). Nenhuma das três formulações diferiu significativamente de 0,75% (com intervalo de confiança de 90% os teores apresentados foram 98% para o Teste 1, 98% para o de referencia, e 97% para o Teste 2).

5.3 ESTUDO DE LIBERAÇÃO CUTÂNEA IN VITRO

5.3.1 Validação espectrofotométrica para quantificação do Metronidazol

O método validado mostrou seletividade e especificidade, e não houve interferência de outros componentes (placebo) quando comparado com as amostras padrão. A curva de calibração do Metronidazol foi linear ($y = 0,0834x - 0,0021$) com um coeficiente de correlação (r^2) de 0,9999. Segundo a ANVISA (Brasil, 2003), o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,99. Sendo assim, o valor de r^2 obtido na análise do metronidazol pelo método espectroscopia UV desenvolvido obedece aos limites estabelecidos (Figura 19).

Figura 19 – Curva da Regressão Linear obtida da média de três curvas de calibração autênticas.



Através da análise de variância (ANOVA), foi testada a linearidade do método e a significância estatística da curva ajustada. O F calculado foi de 0,99, ou seja, abaixo do valor crítico tabelado 3,68; assim pode-se afirmar no nível de 95% de confiança que o modelo linear está bem ajustado na faixa de concentração estudada.

O método mostrou repetibilidade nas seis amostras padrão, com um coeficiente de variação (CV) de 0,99%, menor que o máximo estabelecido pela RE 899/2003 (5,0%). O

método também demonstrou ser preciso quando testado em diferentes dias por diferentes analistas; não houve diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos pelo analista 1 e pelo analista 2 em dias distintos, utilizando o teste *t* de Student com 95% de confiança (Tabela 10).

Tabela 10 – Tratamento estatístico da precisão intermediária do método.

	t calculado	t tabelado (p < 0,05)
1º dia – Analista 1 e 2	0,31	
2º dia – Analista 1 e 2	0,36	
Analista 1 - 1º e 2º dias	0,06	2,57
Analista 2 - 1º e 2º dias	0,34	

Os resultados para exatidão foram próximos a 100%, com coeficientes de variação (CVs) de 0,99%, 1,08% e 0,37% para as concentrações teóricas de 50%, 100% e 150%, respectivamente, de acordo com a tabela 11.

Tabela 11 – Resultados da exatidão em 3 concentrações (5,0; 10,0 e 15,0 µg/mL) em triplicata, correspondendo a 50%, 100% e 150%, de acordo com a RE 899/03.

Determinações	5,0 µg/mL	%	10,0 µg /mL	%	15,0 µg /mL	%
1	4,97	99,3	9,92	99,2	15,10	100,6
2	4,87	97,4	10,13	101,3	15,06	100,4
3	4,93	98,6	10,03	100,3	14,99	99,9

No teste de robustez, quando o fabricante de fosfato de sódio monobásico foi modificado, não houve diferença estatisticamente significativa com 95% de confiança, o valor de *t* calculado foi (0,23) assim, menor que o valor do *t* tabelado (4,30).

Assim a metodologia proposta para a determinação do Metronidazol demonstrou ser simples, rápida e barata, atendendo as exigências quanto à especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. Os modelos estatísticos empregados nos dados dos diferentes parâmetros avaliados permitiram uma maior confiabilidade nos resultados. Dessa forma, os

resultados foram considerados satisfatórios e o método provou ser adequado para quantificar o metronidazol.

5.3.2 Seleção do meio receptor

A composição do meio receptor deve demonstrar ser capaz de manter as condições sink. As condições sink devem ser avaliadas para que, entre outros fatores, a concentração de saturação do fármaco no meio receptor, não seja atingida durante o estudo de liberação. Para que essas condições sejam atendidas a concentração do fármaco deve ser 5 a 10 vezes menor do que a concentração de saturação do fármaco meio receptor (COSTA, 2011).

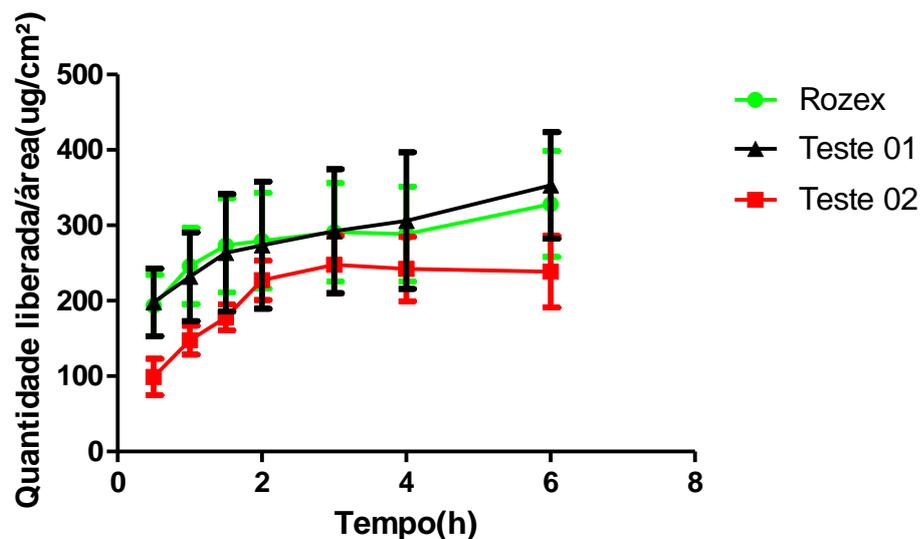
A solubilidade determinada para o metronidazol em tampão fosfato pH 7,4, solução hidroalcoólica (água:etanol = 50:50), tampão fosfato pH 7,4 com *polioxietileno 20-oleil éter* (Brij 98[®]) a 0,5% e a 3,0%, tampão fosfato pH 7.4 com polissorbato 80 (Tween 80[®]) a 0,5% e água após 24 horas de agitação a temperatura controlada ($32 \pm 2^\circ\text{C}$), foi de 8,90, 14,46, 7,13, 10,13, 8,91 e 11,08mg/mL, respectivamente. Para a realização do estudo de liberação *in vitro* o volume de líquido receptor utilizado foi de 6mL. Dessa forma, todas as soluções testadas permitiram a manutenção da condição sink, entretanto a solução receptora escolhida foi o tampão fosfato pH 7.4, que além de permitir a manutenção da condição sink, não ocasionando aumento apreciável da concentração de metronidazol no meio receptor, não alterou a forma de dosagem por retrodifusão através da membrana e é compatível com o método analítico (CLAE) podendo ser injetada diretamente no equipamento (SHAH et al., 1999).

5.3.3 Estudo de liberação *in vitro* do metronidazol

Os estudos de liberação *in vitro* foram realizados em células de Franz, utilizando membranas sintéticas de acetato de celulose. Por não controlar o transporte dos compostos através dela, essa membrana é considerada não limitante (COSTA, 2011).

No gráfico abaixo (figura 20) é possível observar o perfil de liberação de cada formulação após 6 horas de ensaio. Após tratamento estatístico por ANOVA one-way ($P < 0,05$) no intervalo de confiança de 95%, observa-se que há diferença estatisticamente significativa nas quantidades liberadas entre as formulações estudadas, demonstrando que o produto Rozex e Teste 02 e o Teste 01 e o Teste 02 diferem estatisticamente entre si e o produto Teste 01 e o Rozex são semelhantes estatisticamente. Avaliando-se as taxas de liberação apresentadas pelas formulações estudadas os perfis cinéticos foram classificados pelo modelo cinético de Higuchi.

Figura 20 – Transporte do metronidazol através da membrana hidrofílica *in vitro*. Libertação cumulativa de três diferentes formulações (média \pm DP, n = 6).



5.4 ESTUDO DERMATOFARMACOCINÉTICO (DPK) *IN VITRO/IN VIVO*

5.4.1 Estudo de DPK *in vitro* em pele da região dorsal do porco

Independentemente das formulações utilizadas, na permeação, retenção e estudo de DPK em 6h, o fármaco não alcançou a solução receptora utilizando a região dorsal da pele de porco em concentração superior ao limite de quantificação do método que é 0,1074 μ g/mL. Conforme os resultados mostrados na tabela 12, o estudo de retenção (quantidade de MTZ na epiderme e derme viável) demonstrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de MTZ para as diferentes formulações (ANOVA de Friedman e teste de Mann Whitney).

Tabela 12 – Quantidade de metronidazol na epiderme e derme a partir de três diferentes formulações na pele dorsal de porco (n = 14).

Pele dorsal de porco	Quantidade de fármaco na epiderme/derme (μ g/cm ²)		
	A (Teste 1)	B (Rozex)	C (Teste 2)
Média	7,045	5,300	3,816
DP	4,697	3,945	2,107
CV%	66,67%	74,43%	55,22%

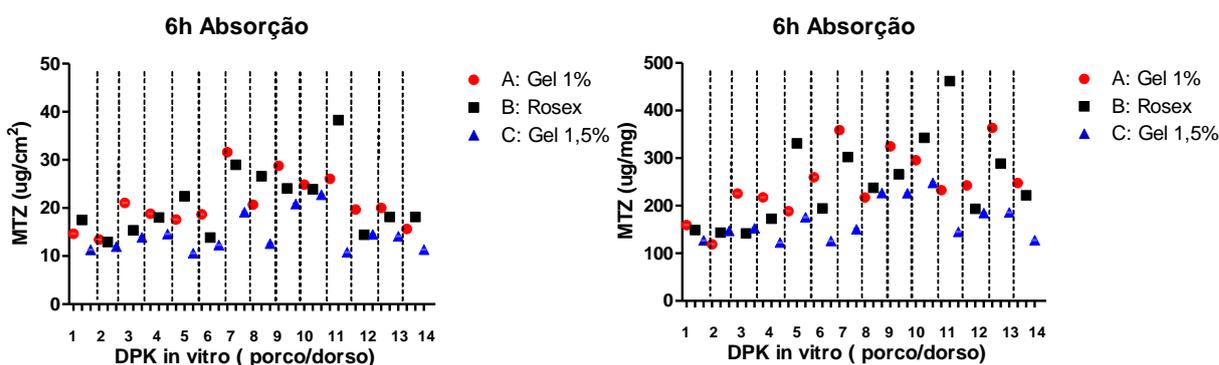
Seguindo o mesmo cálculo realizado por N'Dri-Stempfer, 2008, a figura 21A mostra a quantidade total de fármaco (μ g/cm²), medido nas fitas dos locais de aplicação de cada

produto em catorze áreas de pele dorsal de porco. A tabela 13 lista as quantidades totais médias de fármaco por centímetro quadrado para cada produto, medidas em cada uma das áreas de aplicação após 6h de absorção. Houve diferença estatisticamente significativa para o Produto B (Referência) e Teste 2, utilizando bicaudal de Mann Whitney. Não foi observada diferença estatística entre o de referência e o Teste 1 por bicaudal de Mann Whitney. Resultados semelhantes foram observados para a quantidade de fármaco por mg de EC (Figura 21B e na Tabela 14), demonstrando que a quantidade de estrato córneo coletado, neste estudo não interferiu no resultado. Se a quantidade de MTZ nas duas primeiras fitas não fosse incluída no cálculo dos resultados estes não seriam alterados, o que demonstra que o procedimento de limpeza realizado foi eficiente para remoção das formulações sobre a pele.

Tabela 13 - Média, DP e CV% para a quantidade de droga por centímetro quadrado no EC após 6 h de absorção após a aplicação das três formulações MTZ (n = 14).

Concentração		Formulações		
		A (Teste 1)	B (Rosex)	C (Teste 2)
Concentração de fármaco absorção $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Média	20,83	20,91	14,35
	DP	5,287	7,023	3,864
	CV%	25,38%	33,59%	26,92%

Figura 21 – Quantidades de fármaco por unidade de área (A) e quantidades de fármaco por unidade de volume (B) de determinações em catorze áreas de pele dorsal de porco para os três produtos de MTZ medidos após 6 h de absorção (n = 14).



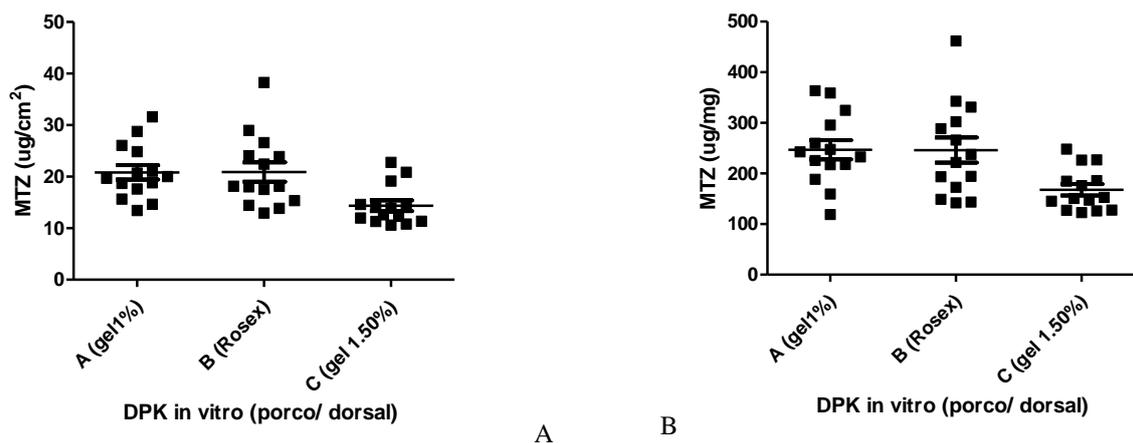


Tabela 14 – Médias, DP e CV% para a quantidade de fármaco por miligramas de EC após 6h absorção após a aplicação de três formulações MTZ (n = 14).

Quantidades		Formulações		
		A (Teste 1)	B (Rozex)	C (Teste 2)
Concentração do fármaco na absorção ug/mg	Média	246,7	246,2	167,8
	DP	70,52	92,33	41,60
	CV%	28,58%	37,50%	24,80%

Nos 42 locais amostrados após 6h de absorção, as duas primeiras fitas continham $26,04 \pm 7,63\%$, $24,66 \pm 6,80\%$, $26,75 \pm 7,89\%$ (média \pm desvio-padrão) da quantidade de fármaco encontrada no EC para as formulações A, B e C, respectivamente.

5.4.2 Tolerabilidade

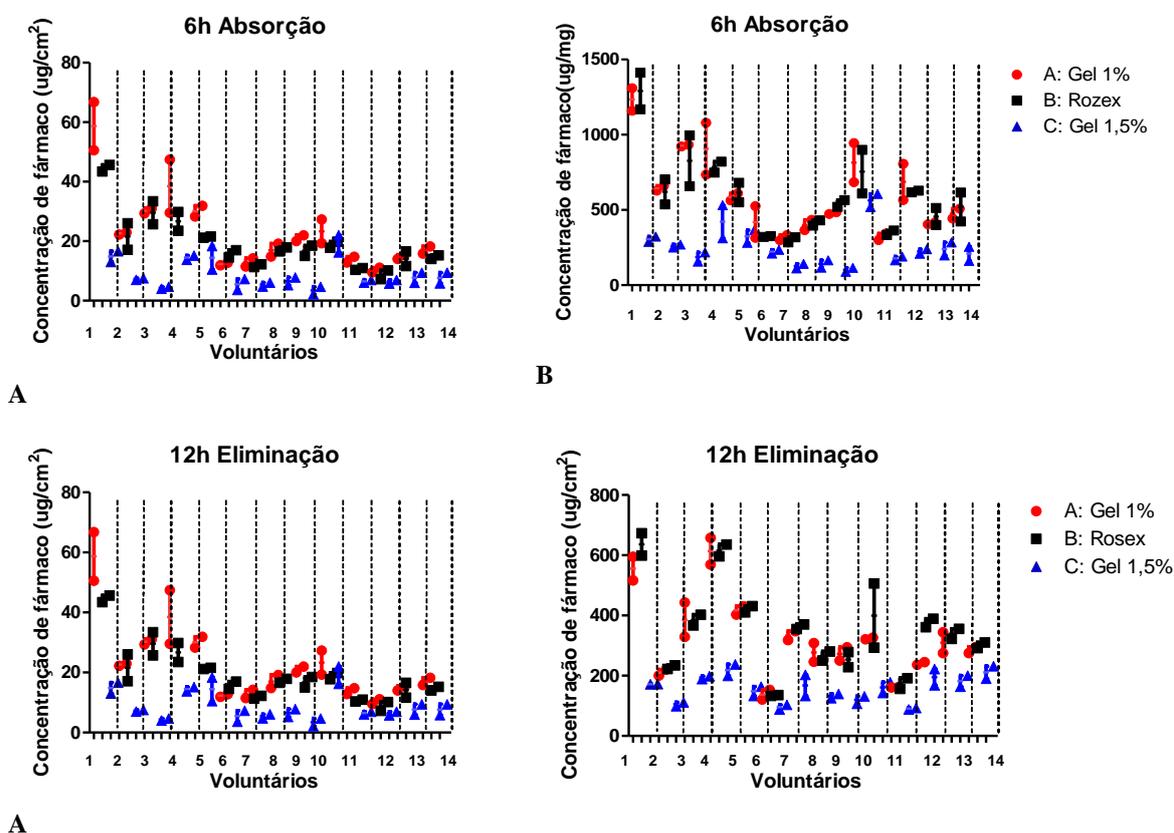
Um total de 14 voluntários saudáveis, 11 mulheres e 3 homens, foram incluídos no estudo após a assinatura de um termo de consentimento. A média (faixa) da idade, do peso e da altura dos voluntários eram de 24 anos (21-32); 64,5 (53-78) kg; e 166 (159-175) cm, respectivamente. Três voluntárias apresentaram fototipo de pele II e V e quatro voluntários tiveram fototipo de pele III e IV. Ao final do estudo observou-se que todos os voluntários apresentaram vermelhidão nos locais do tempo de absorção após o procedimento de tape stripping e em todos os locais do tempo de absorção e do tempo de eliminação ocorreu o aparecimento de uma área clara que levou cerca de 30 dias para retornar à sua pigmentação normal.

5.4.3 Estudo de DPK *in vivo* em pele de voluntários sadios e bioequivalência

Seguindo o mesmo cálculo realizado por Berthe *et al.* 2008, a figura 22A mostra a quantidade total de fármaco ($\mu\text{g} / \text{cm}^2$) medida nas fitas dos locais de aplicação de cada formulação em cada um dos catorze voluntários. A tabela 16 lista as quantidades totais

médias de fármaco para cada produto por centímetro quadrado medida em cada voluntário após 6h de absorção ou 12h de eliminação. Houve diferença estatisticamente significativa entre o Produto B (Referência) e o Teste 2, utilizando o teste bicaudal de Mann Whitney para a absorção e eliminação. Não foi observada diferença entre o referência e o Teste 1 quando realizado o teste bicaudal de Mann Whitney. No entanto, quando comparada a razão W_i não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as três formulações. Os mesmos resultados foram observados para a quantidade de fármaco por mg de EC (Figura 22B e Tabela 16).

Figura 22– Quantidades de fármaco por unidade de área (A) e quantidades de fármaco por volume (B) das determinações em duplicada em cada voluntário para os três produtos de MTZ avaliados após: 6 h de absorção, ou b 12 h de eliminação.



Ao comparar as Figuras 22A e 22B não é possível observar que o uso de volume do que os dados da área são mais estreitamente distribuídos. No entanto, independentemente dos cálculos utilizados os mesmos resultados foram obtidos.

No geral, para 750 μ g de MTZ aplicado cerca de 12% foi recuperado no EC após 6h aplicação para o Teste 1 e para o de referência e cerca de 6% para o Teste 2. Esses valores

foram reduzidos em aproximadamente 45% após 12h de eliminação para o Teste 1 e o de referencia e em 65,2% e para o Teste 2.

Tabela 16 - Médias superior e inferior com intervalo de confiança 90%, coeficiente de variação e desvio-padrão para a quantidade de fármaco por cm² de EC após 6 h de absorção (Qi | absorção), ou 12 h eliminação (Qi | eliminação), após a aplicação de três produtos MTZ ; a razão entre os valores de absorção após depuração (Wi).

Concentração de MTZ		Produtos testados			
		Test 1 (A)	Ref (B)	Test 2(C)	Todos
Absorção (µg/cm ²)	Média	20,29	17,66	7,64	13,99
	Superior CI	16,12	14,41	5,98	11,16
	Inferior CI	25,54	21,65	9,75	17,53
Eliminação (µg/cm ²)	Média	11,49	10,62	5,20	8,59
	Superior CI	9,33	8,54	4,31	7,00
	Inferior CI	14,14	13,21	6,27	10,54
Wi	Média	0,56	0,60	0,68	0,61
	Superior CI	0,46	0,47	0,55	0,49
	Inferior CI	0,69	0,75	0,83	0,76

Tabela 17 - Médias superior e inferior com intervalo de confiança 90%, coeficiente de variação e desvio-padrão para a quantidade de fármaco por mg de EC após 6 h de absorção(Qi | absorção), ou 12 h eliminação (Qi | eliminação), após a aplicação de três produtos MTZ ; a razão entre os valores de absorção após depuração (Wi).

Concentração de MTZ		Produtos testados			
		Teste 1 (A)	Ref (B)	Teste 2(C)	Todos
Absorção (µg/cm ²)	Média	562,56	552,50	224,38	411,62
	Superior CI	461,22	456,70	180,57	336,30
	Inferior CI	686,17	668,39	278,82	503,80
Eliminação (µg/cm ²)	Média	297,39	320,19	150,19	242,73
	Superior CI	244,03	260,95	130,88	202,75
	Inferior CI	362,42	392,88	172,34	290,59
Wi	Média	0,52	0,58	0,66	0,59
	Superior CI	0,44	0,50	0,53	0,49
	Inferior CI	0,62	0,66	0,83	0,70

As razões das quantidades de fármaco por cm² e por mg de EC (média ± 90% intervalo de confiança) para os produtos A (teste 1) ou C (teste 2), em comparação com o produto B (referência), após a absorção, a eliminação, ou absorção e eliminação combinados são mostrados na Fig. 23 e na Tabela 17 .

Bioequivalência foi avaliada usando a razão do log transformado da quantidade de fármaco/cm² (média ± intervalo de confiança de 90%) e a razão da quantidade de fármaco log transformada/ mg de EC após 6 h de absorção ou 12 h de eliminação (Figura 23A e B, respectivamente e Tabela 18 e 19). Tradicionalmente, para serem considerados

bioequivalentes, com intervalo de confiança de 95% a razão deve estar inteiramente no intervalo indicado de 0,8 a 1,25. Então, o Teste 1 foi considerado bioequivalente para absorção, eliminação e para a absorção + eliminação usando a concentração por área ou por volume de EC. O Teste 2 demonstrou-se não-bioequivalente para absorção, eliminação e para absorção + eliminação usando a concentração por área ou por volume de EC.

Embora o dado apresentado na tabela 19, para o percentual do intervalo de confiança superior quando avaliados absorção e eliminação para o teste 01, apresente-se fora da faixa de aceitação de 0,80 a 1,25 o produto em questão não pode ser considerado bioequivalente ao Rozex. Pois o intervalo adequado para avaliar a bioequivalência de produtos de uso tópico ainda está em discussão (N'Dri-Stempfer, *et al.* 2009).

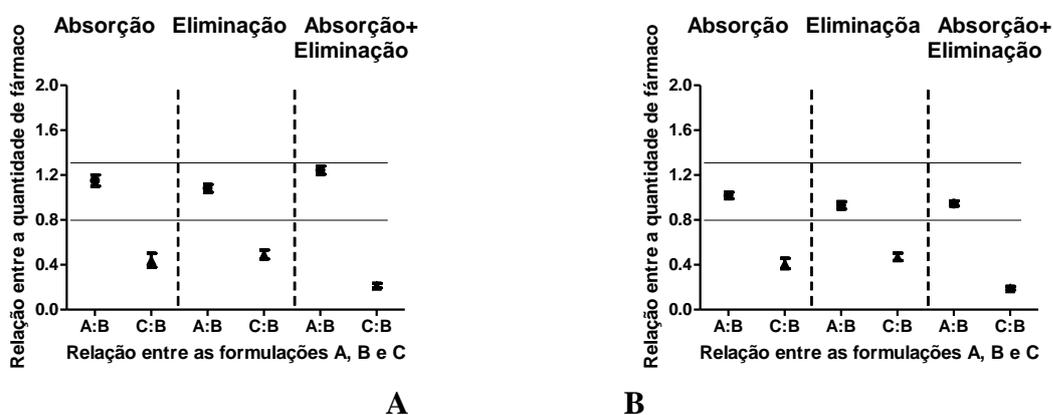
Tabela 18 – Avaliação de bioequivalência de produtos com MTZ 0,75% (produtos A e C) em comparação com referência a drogas (Produto B da Galderma) determinada em 14 voluntários da concentração de MTZ / área. Bioequivalência foi avaliada através da razão entre o log transformado da concentração de fármaco no EC (média \pm 90% de intervalo de confiança) após 6 h de absorção com ou sem eliminação de 12 horas.

Medida da BE	Produto A (Teste 1)			Produto C (Teste 2)		
	Média	CI superior	CI inferior	Média	CI superior	CI inferior
Absorção	1.149	1.066	1.238	0.432	0.339	0.552
Eliminação	1.081	1.024	1.142	0.489	0.426	0.563
Absorção e Eliminação	1.243	1.181	1.307	0.212	0.180	0.249

Tabela 19 – Avaliação de bioequivalência de produtos com MTZ 0,75% (produtos A e C) em comparação com referência a drogas (Produto B da Galderma) determinada em 14 voluntários da concentração de MTZ/volume. Bioequivalência foi avaliada através da razão entre o log transformado da concentração de fármaco no EC (média \pm 90% de intervalo de confiança) após 6 h de absorção com ou sem eliminação de 12 horas.

Medida da BE	Produto A (Teste 1)			Produto C (Teste 2)		
	Média	CI superior	CI inferior	Média	CI superior	CI inferior
Absorção	1.018	0.969	1.070	0.406	0.335	0.493
Eliminação	0.929	0.875	0.986	0.469	0.415	0.530
Absorção e Eliminação	0.946	0.908	0.985	0.190	0.166	0.219

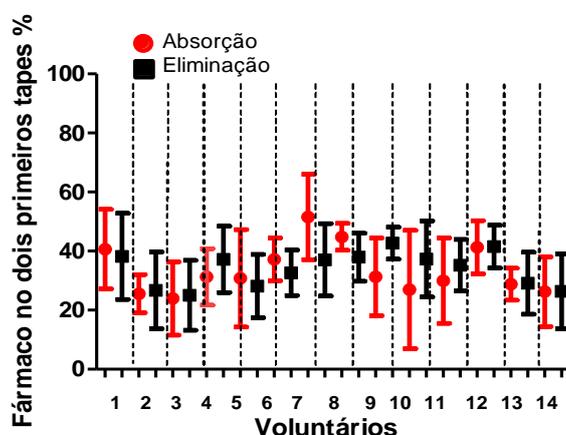
Figura 23 – Avaliação da bioequivalência dos géis MTZ (produtos A e C) em comparação com o medicamento de referência listado (produto B) medido em 14 voluntários a quantidade de MTZ / área (A) e quantidade de MTZ / volume (B).



5.4.4 Quantidade de fármaco nas duas primeiras fitas

Nos 84 locais amostrados após 6h de absorção (isto é, seis locais em 14 voluntários), as duas primeiras fitas continham $33,61 \pm 13,69\%$ (média \pm desvio-padrão) da quantidade de fármaco no EC. Após 12h de eliminação, as quantidades de fármaco nas primeiras duas fitas diminuiu, mas a porcentagem da quantidade de fármaco foi a mesma $33,95 \pm 11,44\%$ (Fig. 24).

Figura 24 – Porcentagem da quantidade de fármaco no EC encontrada nas duas primeiras fitas (média aritmética \pm desvio padrão de determinações em duplicado dos três produtos) após 6 h de absorção e seguido por 12 h de eliminação.



Está bem estabelecido que para os fármacos de produtos dermatológicos, após a aplicação tópica, a concentração de fármaco encontrada no fluido biológico pode não estar relacionada à eficácia terapêutica. Em vista disso, a metodologia para avaliar a bioequivalência destes produtos mantém-se um grande desafio. Diferentes métodos têm sido propostos e entre eles a DPK, a microdiálise dérmica, a libertação *in vitro* e o Raman confocal são muito promissores (SHAH *et al.*, 2014).

O método DPK foi descrito pela Food and Drug Administration (FDA) em um Guia Específico (US FDA, 1998) para a avaliação da bioequivalência de medicamentos tópicos, mas foi parcialmente retirado em 2002, principalmente por causa das dúvidas sobre a adequação e reprodutibilidade dos métodos (FEDERAL REGISTER, 2002; PERSHING, 2001; CONNER, 2001; FRANZ, 2001). Desde aquela época, vários workshops internacionais foram realizados para discutir esta abordagem e os maiores desafios são medir a concentração do fármaco no tecido morto; compreender a relação entre concentração do fármaco no EC e a eficácia tópica; a reprodutibilidade do método da DPK e a capacidade do método de DPK em diferenciar de forma confiável diferentes formulações (SHAH, *et al.* 2014).

Em relação a estes dois últimos desafios, a abordagem da DPK pode ser feita por meio da análise do fármaco em não menos do que oito locais: pelo menos quatro locais expostos ao produto durante diferentes períodos de exposição, e quatro locais expostos ao fármaco durante um período de exposição mais longo, seguido de quatro períodos diferentes de eliminação. Depois é construído um gráfico (quantidade na pele x Tempo (h) ($\mu\text{g} / \text{cm}^2 \times$ Tempo (h))), seguida da avaliação dos parâmetros T_{max} , C_{max} , AUC_{0-t} , $T_{1/2}$, K_{el} (FDA, 1998).

O protocolo de DPK relatado neste trabalho apenas comparou os níveis de fármaco em um tempo de absorção e um tempo de eliminação. De acordo com a literatura é possível discriminar as diferenças de bioequivalência para a eliminação e absorção, como o que foi previamente relatado (BERTHE *et al.* 2009). Esta nova análise dos dados demonstrou que a comparação da bioequivalência pode ser feita mais facilmente e, claro, tem a chance de ser mais reprodutível (BERTHE *et al.*, 2009).

BERTHE *et al.* (2008) propôs as seguintes melhorias no método: (1) Melhor limpeza do excesso de formulação em cada local de aplicação no final do período de absorção, (2) inclusão e determinação da concentração de fármaco nas duas primeiras fitas na quantidade total no EC, (3) um aumento no número de fitas coletadas combinado a um método que garanta a remoção de quase todo o EC, (4) melhor controle da área de amostragem com as fitas, que deve ficar no interior de área de aplicação da droga (para evitar efeitos de borda), e (5) procedimento de análise que possibilite a determinação do fármacos em todos os tapes, sozinhos ou associados em grupos. Assim, a principal questão é qual é a melhor abordagem para avaliar esses dados. Em um estudo piloto (BERTHE *et al.*, 2009), a massa de EC removido por cada fita foi quantificada através da pesagem das fitas antes e após aplicação na pele. A partir destas medições, o EC coletado nas fitas foi considerado completamente reprodutível. Como resultado, o ajuste das concentrações de fármaco coletados nas diferentes quantidades EC de cada voluntário não foi considerado necessário. Isso significa que a massa de EC coletada em cada fita não precisa ser quantificada (BUNGE *et al.*, 2007).

Neste estudo a quantidade de MTZ recolhida no EC não foi diferente entre os produtos avaliados (one-way análise de variância $p < 0,5$) no tempo de absorção e no tempo de eliminação (one-way análise de variância $p < 0,5$). No entanto, foi diferente entre os voluntários. Portanto, neste trabalho avaliou-se a bioequivalência de medicamentos tópicos por quantidade de droga/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) e quantidade de droga/volume de EC ($\mu\text{g}/\text{mg}$) segundo cálculo de BERTHE *et al.*, 2008.

Seguindo PARFITT *et al.* (2011), para ter resultados mais informativos sobre a bioequivalência entre produtos de uso tópico *in vivo*, a AUC a partir de um lote de a quantidade de droga por fita vs H (fração cumulativa de estrato córneo removidos) deve ser calculado para cada local de aplicação usando a regra trapezoidal. Vale ressaltar que, no estudo de PARFITT a primeira fita não foi analisada e o número de fitas utilizadas foi fixado em 15. Neste trabalho foram incluídas as duas primeiras fitas e 30 fitas foram coletadas de cada local de aplicação. Assim, sabendo que a massa de EC e a área de EC nas fitas, foi possível calcular a espessura EC removido (usando uma densidade de EC de $1 \text{ g} / \text{cm}^3$)

(ANDERSON *et al*, 1973; ALBERTI *et al*, 2001) e a posição correspondente (ou profundidade, X) dentro do EC. A espessura aparente do EC (L) foi determinada (HERKENNE *et al*, 2006; KALIA *et al*, 1996; KALIA *et al*, 2001) a partir de medições da perda transepidérmica de água (TEWL) (Tewameter) como a função do EC removido. Isto permitiu que o perfil da concentração de fármaco fosse expressa como uma função normalizada da posição relativa dentro do EC (x/L) e facilitou a comparação de dados provenientes de diferentes indivíduos (HERKENNE *et al*, 2006; KALIA *et al*, 2000, RUSSEL, 2008).

A análise da quantidade/área e quantidade/mg (Tabela 12 e 13) mostrou os mesmos resultados. A análise desses dados log-transformados para encontrar o intervalo de bioequivalência demonstrou que, considerando ou não a quantidade de EC coletado, os resultados são os mesmos, concordando com os resultados encontrados por STEMPFER (2008). Estes dados fornecem uma questão importante uma vez que as formulações 1 e 2 diferem apenas na concentração de 0,5% de agente espessante. Isto seria um fator suficientemente forte para modificar o efeito terapêutico do produto? De acordo com SHAH, 2014, pequenas variações nas concentrações dos constituintes das formulações é um dos desafios. Considerando uma isenção para os requisitos de estudo de bioequivalência é mais comum com base na formulação e na dosagem do medicamento. Quase todas as jurisdições podem conceder uma dispensa para uma formulação tópica na qual os excipientes do produtos teste e referência são os mesmos. O Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) e os excipientes devem ser Q1 (qualitativamente) e Q2 (quantitativamente) os mesmos que o produto de referência (BRADDY *et al*, 2015). Algumas jurisdições e organizações permitem pequenas diferenças de excipientes. No entanto, essas diferenças não devem modificar a absorção do IFA ou afetar a segurança e / ou eficácia do medicamento. O Health Canada (HC), o European Medicines Agency (EMA), o FDA, e o United Nations World Health Organization (WHO) descreveram em maior detalhe as condições nas quais as diferenças de excipientes podem ser aceitáveis. As diferenças ainda devem ser em um intervalo determinado que seja considerado o "mesmo" que o produto de referência. Por exemplo, HC e FDA fazem uma especificação clara quanto ao que "semelhante" significa. No Canadá, a diferença quantitativa em excipientes deve estar entre $\pm 10\%$, enquanto que nos EUA a diferença não deve ser superior a $\pm 5\%$ (EMA, 2010; WHO, 2005; HC, 2012; FDA, 2014; BRADDY *et al.*, 2015).

Neste trabalho, a diferença entre o Teste 1 e Teste 2 foi de apenas 0,5% de agente espessante a mais no Teste 2. Esta quantidade foi suficiente para aumentar a viscosidade em

1,4 vezes e para diminuir a espalhabilidade em 3 vezes levando a uma não-bioequivalência entre o teste 2 em relação ao produto de referência que tinham os mesmos constituintes. Tendo em conta que no Brasil apenas estudos *in vitro* são necessários para o registro de todos os medicamentos tópicos genéricos de uso dermatológicos, incluindo os que contêm corticoides, este resultado demonstra uma necessidade de mudar a legislação brasileira atua

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

- As formulações estudadas apresentaram comportamento reológico do tipo pseudoplástico e tixotrópico, pois se deformam durante a aplicação tornando-se mais fluidas;
- Todas as formulações estudadas apresentaram-se estáveis quando avaliadas através da estabilidade física por determinação do comportamento reológico e através da estabilidade acelerada conforme RE 01/2005 da ANVISA;
- Os métodos desenvolvidos por espectrofotometria e por CLAE-UV apresentaram confiabilidade e segurança necessárias para procedimentos analíticos/ bioanalíticos, pois atenderam as especificações para os parâmetros avaliados apresentando-se, portanto, validados conforme RE 899/2003 e RDC nº 27/2012 da ANVISA;
- Nos estudos de liberação *in vitro*, utilizando membrana de acetato de celulose, as formulações seguiram o modelo de Higuchi. Foi demonstrada diferença estatisticamente significativa entre as formulações Rozex e Teste 02 e o Teste 01 e o Teste 02;
- A análise dos dados *in vitro* demonstrou que a quantidade de MTZ presente no EC da pele de porco foi semelhante para o produto Rozex e Teste 01 diferente para Rozex e Teste 02, considerando ou não a quantidade de estrato córneo coletada;
- A análise da bioequivalência tópica *in vivo* dos produtos contendo metronidazol através da dermatofarmacocinética (DPK) demonstrou com confiança de 95% no intervalo de 0,8 a 1,25 que o produto Teste 01 é bioequivalente ao produto de referência Rozex e que o produto Teste 02 é bioinequivalente ao produto de referência Rozex, considerando ou não a quantidade de estrato córneo coletada.
- A diferença entre o Teste 1 e Teste 2 foi de apenas 0,5% de agente espessante a mais no Teste 2. Esta quantidade foi suficiente para aumentar a viscosidade em 1,4 vezes e para diminuir a espalhabilidade em 3 vezes levando a uma não-bioequivalência entre o teste 2 e o produto de referência continham os mesmos constituintes. Resultado que demonstra a necessidade de mudança na legislação brasileira atual.

7 PERSPECTIVAS

- Avaliar a permeação *in vitro* do MTZ a partir das formulações tópicas no período de 48h;
- Realizar a correlação *in vitro/in vivo* de produtos tópicos contendo metronidazol através da técnica de DPK.
- Avaliar os parâmetros dermatofarmacocinéticos *in vivo* do metronidazol no produto de referencia segundo critérios do guia do FDA;
- Avaliar a bioequivalência tópica de produtos contendo MTZ através da Dermatofarmacocinética (DPK) após uso repetido;
- Publicar dois artigos científicos.

REFERÊNCIAS

- ALLEN JUNIOR, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- ALTINYAZAR, H. C.; KOCA, R.; TEKIN, N. S.; İTÜRK, E.; Adapalene vs. metronidazole gel for the treatment of rosacea. **International Journal of Dermatology**; 44, 252–255, 2005.
- AULTON, M. E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- BENVINDO, C.S.. **Estudo comparativo da liberação e penetração cutânea de nitrato de miconazol de emulsões tópicas comerciais**. Dissertação de mestrado em ciências farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Rio de Janeiro, 2006.
- BRADDY, AC, DAVIT BM, STIER EM, CONNER D.P. Survey of international regulatory bioequivalence recommendations for approval of generic topical dermatological drug products. **AAPS J**.17,121–133, 2015.
- Brasil. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC N° 37. Determina a publicação do "Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência". Diário Oficial da União. Brasília, DF, de 03 de agosto de 2011.
- Brasil. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n°48, de 6 de outubro de 2009. Dispõe sobre realização de alteração, inclusão, suspensão, reativação, e cancelamento pós-registro de medicamentos e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, de 7 de outubro 2009.
- BROWNING, D. J. & PROIA, A.D.. Review Ocular Rosacea. **Surv Ophthalmol** 31 (3) November-December, 1986.
- CATHERINE M. ZIP, M.D.. Innovative Use of Topical Metronidazole. **Dermatol Clin** 28, 525–534, 2010.
- CHIANG, AUDRIS; TUDELA, EMILIE AND MAIBACH, HOWARD I.. Percutaneous absorption in diseased skin: an overview. **J. Appl. Toxicol.** 2012; 32: 537–563.
- CHIEN, Y.W. Novel drug delivery systems. 2 ed. New York, Marcel Dekker, v.50. 1992.
- CILURZO, F., MINGHETTI, P. & AND SINICO, C.. Newborn Pig Skin as Model Membrane in *In Vitro* Drug Permeation Studies: A Technical Note **AAPS Pharm Sci Tech**; 8 (4) 2007.

CORNWELL, P.A. & BARRY B.W. Effects of penetration enhancer treatment on the statistical distribution of human skin permeabilities. **International Journal of Pharmaceutics**; 117: 101- 112, 1995.

CORREA, NÁGILA MALUF; CAMARGO JUNIOR, FLÁVIO BUENO; IGNACIO, ROSA FERNANDA AND LEONARDI, GISLAINE RICCI. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, vol.41, n.1, pp. 73-78, 2005

COSTA, M.A.B.. **Caracterização, desenvolvimento e validação do Método analítico de teor e perfil de liberação *in vitro* – Suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 ml. .** Dissertação de mestrado em ciências farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Rio de Janeiro, 2011.

CRAWFORD, G. H., PELLE M. T., JAMES W.D.. Rosacea: I. Etiology, pathogenesis, and subtype classification. **J Am Acad Dermatol**. Sep;51(3):327-41, 2004.

CSÓKA *et al.*. *In vitro* and *in vivo* percutaneous absorption of topical dosage forms: case studies. **International Journal of Pharmaceutics**, 291:11–19, 2005.

D. BARCO & A. ALOMAR. . **Rosacea. Spain Actas Dermo**; 99:244-56, 2008.

DANGELO, J.G.; FATTINI, C. A. **Anatomia humana sistêmica e segmentar**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

DÍAZA, M.J., BOIXEDA, J.P., TRUCHUELO, M., DÍEZC & CARDOSOD, M., Rosácea: revisión y nuevas alternativas terapêuticas. **Semergen**; 37(2): 83-86 2011.

Farmacopeia Brasileira. Parte I. 5. ed. São Paulo: Atheneu; 2010.

FELDMAN, S.R.; HUANG, W. W. & HUYNH, T. T.. Current Drug Therapies for Rosacea: A Chronic Vascular and Inflammatory Skin Disease. **Journal of Managed Care Pharmacy**, Vol. 20, No. 6 June 2014.

FELTKAMP, H.; FUCKS, P.; SUCKER, H. Pharmazeutische qualitaet skontrolle. Stuttgart: Georg Thieme, p. 714-735,1983.

FRANZ, TJ; LEAHMAN, PA AND RANEY, SG Use of excised human skin to assess the bioequivalence of topical products. **Skin Pharmacol Physiol**, 22:276, 2009.

FREEMAN, C.D., KLUTMAN, N. E. & LAMP, K.C.. Metronidazol - A Therapeutic Review and Update. **Drugs**, Nov; 54 (5): 679-708 1997.

FRIEND, D.R.; *In vitro* sink permeation techniques. **Journal of Controlled Release** 235-248,1992.

- FULLER, D.; MARTIN, S.; Rosacea. **Journal of Midwifery & Women's Health** Volume 57, No. 4, July/August 2012.
- GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. **Int. J. Pharm.**, v. 250, n. 1, p. 35-44. 2003.
- GODIN, B., TOUITOU, E.. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models. **Advanced Drug Delivery Reviews** 59 1152–1161, 2007.
- GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10. ed. Rio Janeiro, Guanabara Koogan, 2003.
- GOPINATHAN, K. MENONA, G., CLEARBY W., MAJELLA E., LANEC. Review The structure and function of the stratum corneum, **International Journal of Pharmaceutics** 435: 3– 9, 2012.
- Guidance for Industry: Topical dermatologic corticosteroids: *in vivo* bioequivalence, Bethesda (MD): **Center for Drug Evaluation and Research, FDA**, 1995.
- Guidance for industry: Topical dermatological drug product ndas and andas- *in vivo* bioavailability, bioequivalence, *in vitro* release, and associated studies. Draft guidance, June 1998, US. Development of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), US FDA (1998).
- GUY F. WEBSTER. Rosacea. **Med Clin N Am**. 93 1183–1194,2009.
- GUY, R.H., HADGRAFT, J. **Transdermal drug delivery**. 2 ed. New York: Marcel Dekker, 2003.
- HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. **Int. J. Pharm.**, v.224, p.1-18, 2001.
- HARVEY, R. A.; MYCEK, M. J.. **Farmacologia Ilustrada**. 5ª Ed. Porto Alegre: Artmed, p. 443, 2013.
- HERKENNE, C., AARTI N., YOGESHVAR N., HADGRAFT J., AND GUY, R. H.. Pig Ear Skin *ex Vivo* as a Model for *in Vivo* Dermatopharmacokinetic Studies in Man. **Pharmaceutical Research**. Vol. 23, No. 8. 2006.
- HERKENNE, C., ALBERTI, I. ,NAIK, A., KALIA, Y. N.,FRANCOIS, X., MATHY, AND GUY R. *In Vivo* Methods for the Assessment of Topical Drug Bioavailability. **Pharmaceutical Research**, Vol. 25, No. 1, January 2007
- HOLMGAARD, R; NIELSEN, JB and BENFELDT, E. Microdialysis sampling for investigations of bioavailability and bioequivalence of topically administered drugs: Current state and future perspectives. **Skin Pharmacol Physiol**, 23:225-243,2010.

- ISSA, M.G. **Avaliação do impacto de diferentes variáveis no ensaio de dissolução intrínseca de metronidazol**. Dissertação de mestrado em ciências farmacêuticas do centro de ciências da saúde da USP- São Paulo, 2011.
- KALIA, Y. N.; PIROT, F AND GUY, R. H.. Homogeneous transport in a heterogeneous membrane: water diffusion across human stratum corneum in vivo. **Biophys. J.** 71, 2692-2700, 1996.
- KALIA, Y, N; ALBERTI, I; NAIK, A; GUY, R. H.. Assessment of topical bioavailability in vivo: the importance of stratum corneum thickness. **Skin Pharmacol.** 14, 82-86, 2001.
- KANFER, I.. Strategies for the Bioequivalence Assessment of Topical Dermatological Dosage Forms. **J Bioequiv Availab** 2: 102-110, 2010.
- KATSAMBAS A.D. *et al.* (eds.), *European Handbook of Dermatological Treatments*, 2015.
- KLANG, V. *et al.*. *In vitro* vs. *in vivo* tape stripping: Validation of the porcine ear model and penetration assessment of novel sucrose stearate emulsions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**; 80: 604–614, 2012.
- KNORST, M. T. **Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato concentrado de Achyrocline satureioides**. Dissertação de Mestrado em ciências farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, 1991.
- LAMP, FREEMAN, KLUTMAN & LACY. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the Nitroimidazole Antimicrobials. **Clin Pharmacokinet** May; 36 (5): 353-373, 1999.
- LEHMAN, PA; RANEY, SG AND FRANZ, TJ, Percutaneous absorption in man: *in vitro-in vivo* correlation, **Skin Pharmacol Physiol**, 24:224-230, 2011.
- LOWE. N. J.. Use of Topical Metronidazole in Moderate to Severe Rosacea. **Advances in Therapy**, Volume 20, Issue 4, pp 177-190, July 2003.
- LUA, YING, KIMA, SUNGWON, PARKA, KINAM, B. . *In vitro-in vivo* correlation: Perspectives on model development. **International Journal of Pharmaceutics** 418 (142–148), 2011.
- MCCLELLAN, K. J., & NOBLE, S.. Topical Metronidazole - A Review of its Use in Rosacea. **Am J Clin Dermatol** , May-Jun; 1 (3): 191-199, 2000.
- MENG, Y.; HUIXIAN, M.; MINGZHU, L.; NAN, L; FENGPING, T.; *In vitro/in vivo* characterization of nanoemulsion formulation of metronidazole with improved skin targeting and anti-rosacea properties. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** V.88, 92–103, 2014.

N'DRI-STEMPFER, B., NAVIDI W. C., GUY, R. H. & BUNGE, A. L.. Optimizing metrics for the assessment of bioequivalence between topical drug products. **Pharm. Res.** 25:1621-1630, 2008.

N'DRI-STEMPFER, BERTHE; WILLIAM C. NAVIDI, RICHARD H. GUY AND ANNETTE L. BUNGE. Improved Bioequivalence Assessment of Topical Dermatological Drug Products Using Dermatopharmacokinetics *Pharmaceutical Research*, Vol. 26, No. 2, February 2009 (# 2008) DOI: 10.1007/s11095-008-9742-9.

NARKAR, Y..Bioequivalence for Topical Products—An Update. **Pharm Res** 27:2590-2601, 2010.

PATHAN, I.B.; SETTY, C.M. Chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery systems. **Trop J Pharm Res**, 8(2):173, april, 2009

POWELL, F. C.. Rosacea. From the Regional Centre of Dermatology, **N Engl J Med**; 352:793-803, 2005.

QUARTERMAN, M. J., MD; JOHNSON, D. W.; ABELE, D.C. *et al.*. Ocular Rosacea Signs, Symptoms, and Tear Studies Before and After Treatment With Doxycycline. **Archives of Dermatology January**, 1, Vol 133, No. 1, 1997.

REINHOLZ, M., TIETZE, J.K., KILIAN, K. *et al.*. Rosacea – S1 Guideline. **J Dtsch Dermatol Ges.** Aug;11(8):768-80, 2013.

S. Wiedersberg *et al.* **Euro. J. Pharmac. And Biopharmac.** 71:362–366, 2009.

SAKORE, SOMNATH & CHAKRABORTY, BHASWAT. *In Vitro–In Vivo* Correlation (IVIVC): A Strategic Tool in Drug Development. **J Bioequiv Availab**; S3,2011.

SCHEINFELD, N., BERK, T.. **Pharmacy and Therapeutics.** A Review of the Diagnosis and Treatment of Rosacea. Volume 122, Issue 1, January 2010.

SCHMADEL L.K, MCEVOY G.K. Topical metronidazole: a new therapy for rosacea. **Clin Pharm**; 94–101,1990.

SCHMOOK, F.P., MEINGASSNER, J. G., BILLICH, A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption **International Journal of Pharmaceutics** 215:51–56, 2001.

SEKKAT, N.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Biophysical study of porcine ear skin *in vitro* and its comparison to human skin *in vivo*. **J Pharm Sci.**, v.91, p.2376-2381, 2002.

SHAH V. P., FLYNN G.L., YACOBI A., MAIBACH H. L., *et al.*, Bioequivalence of Topical Dermatological Dosage Forms-Methods of Evaluation of Bioequivalence, **Pharm. Res**, 15:167-171, 1998.

SHAH, V. P.; ELKINS, J.; WILLIAMS, R. L. Evaluation of the test system used for *in vitro* release of drugs for topical dermatological drug products. **Pharmaceutical Development Technology**, v. 4, n. 3, p. 377-385, 1999.

SHAH, VINOD P.. IV–IVC for topically applied preparations—a critical evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 60:309–314, 2005.

SILVA, A.T.A. **Síntese de pró-fármacos derivados de metronidazol**. Dissertação de mestrado em ciências farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - ARARAQUARA – SP, 2002.

SÍONA NÍ RAGHALLAIGH & FRANK C. POWELL A.D. KATSAMBAS *et al.* (eds.), Rosacea. **European Handbook of Dermatological Treatments**, 2015.

SOARES, K.C.C.; MORAES, M.V.; GELFUSO, G. M.; GRATIERI, T.. Bioequivalência de medicamentos tópicos dermatológicos: o cenário brasileiro e os desafios para a vigilância sanitária. **Ciência & Saúde Coletiva**, 20(11) : 3599-3608, 2015

SONGKRO, S.; PURWO, Y.; BECKET, G.; RADES, T. Investigation of newborn pig skin as an *in vitro* animal model for transdermal drug delivery. **STP Pharma Sci.**, v.13, p.133-139, 2003.

STORPIRTIS, S.; GALM.N.; CAMPOS,D.R.; GONÇALVES, J.E.; **Farmacocinética básica e aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

SUN, LIN, *et al.*. Formulation and *In Vitro/In Vivo* Correlation of a Drug-in-Adhesive Transdermal Patch Containing Azasetron. **Journal of pharmaceutical sciences**, vol. 101, no. 12, dezembro 2012.

SUNA NING, *et al.*. *In vivo* pharmacokinetics and *in vitro* antifungal activity of iodiconazole, a new triazole, determined by microdialysis sampling. **International Journal of Antimicrobial Agents** 41:229– 235, 2013.

TABOSA, M.A.M.. **Microemulsões contendo lapachol: desenvolvimento, caracterização e avaliação biofarmacêutica *in vitro* e *in vivo***. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife – PE , 2014.

TAN, J.& BERG, M.. Rosacea: Current state of epidemiology. **JAAD**. Volume 69, Issue 6, Supplement 1, Pages S27–S35, 2013.

TOSATO, M.G.. **Análise dos constituintes da pele humana sob efeito de cosmecêuticos por espectroscopia ramam**. Dissertação de mestrado em engenharia biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba – São José dos Campos-SP, 2010.

TWO A.M., WU W., GALLO R.L., HATA T.R.. A Rosacea Part I. Introduction, categorization, histology, pathogenesis, and risk factors. **J Am Acad Dermatol**. May; 72(5):749-58; 759-60, 2015.

US FDA (1998). Guidance for industry: Topical dermatological drug product ndas and andas- in vivo bioavailability, bioequivalence, in vitro release, and associated studies. **Draft guidance**, June 1998, US. Development of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER).

VINOD P. SHAH. IV–IVC for topically applied preparations—a critical evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 60 2005 309–314.

WAGNER, N., BERTHAUD, C., LAFFET G, *et al.* Differential penetration of skin by topical metronidazole formulations. **Clinical Pharmacokinetics**; Jul-Aug; 15: 197-205,1998.

WIEDERSBERG, S. **Dermatopharmacokinetics and pharmacodynamics of topical glucocorticoids**. Department of Pharmacy and Pharmacology - University of Bath, 2006.

ZHAO, LIGANG, *ET AL.* Transdermal delivery of tolterodine by O-acylmenthol: In vitro/in vivo correlation. **International Journal of Pharmaceutics** 374: 73–81, 2009.

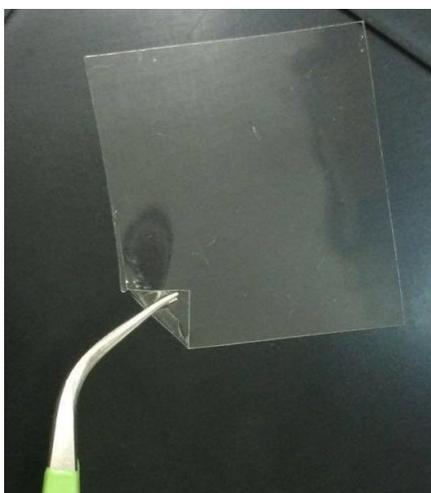
ZLOTOGORSKI A. Distribution of skin surface pH on the forehead and cheek of adults. **Arch Dermatol Res**; 279: 398-401,1987.

APÊNDICE A – Protocolo do tape stripping

Um total de sete locais de aplicação foram selecionados no antebraço de cada voluntário saudável. A área aproximada do local de aplicação foi de 2,54 cm². Uma dessas áreas foi utilizada para determinar a espessura total de estrato córneo, os outros seis foram utilizados para determinar o perfil do metronidazol no estrato córneo.

Local A: Determinação da espessura total do estrato córneo

Foram cortados 30 fitas (Scotch Book Tape, 3M, St. Paul, MN, USA) em pedaços de aproximadamente 2,5 x 2,5 cm² (1) e deixou-se equilibrar por 12h no laboratório. O peso das fitas foi determinado usando uma balança (Sartorius®) de pelo menos 10µg (2).



(1)



(2)

Um molde (Scotch Book Tape, 3M, St. Paul, MN, USA) de 2,54 cm² de área foi cortado e fixado no local da pele não tratada (3). Esse molde manteve a área constante. A perda inicial da água transepidérmica (TEWL) desta área foi medida (4) (Courage + Khazaka eletrônico GmbH -CK eletrônico).

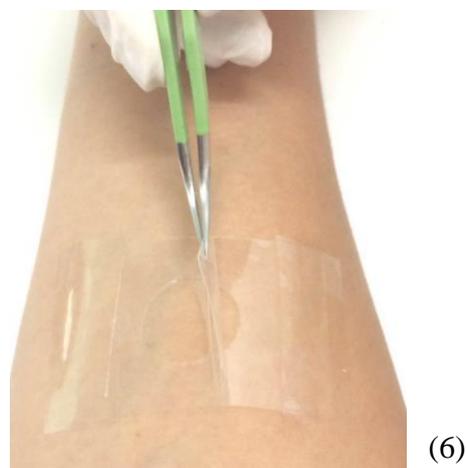


(3)



(4)

Subsequentemente, o EC foi progressivamente removido por repetidos processos de tapes-stripping. As fitas previamente cortadas foram aplicadas no molde e pressionadas com uma força padrão com a ponta de uma pinça (5) e removida com um rápido movimento (6). A perda de água transepidermal foi medida após o processo de tape-stripping.



Cada fita foi novamente pesado após o processo de tape-stripping para que a massa de estrato córneo removida fosse conhecida. A partir dessa massa, e conhecendo a área na qual foi realizado o tape-stripping, e a densidade do EC ($1\text{g}/\text{cm}^3$), foi possível calcular a espessura de estrato córneo removido em cada fita. O total de EC foi calculado a partir do intercepto do eixo X do gráfico $1/\text{TEWL}$ versus a espessura cumulativa de EC removido.

Local B: aplicação das formulações e determinação do perfil de distribuição do MTZ no EC.

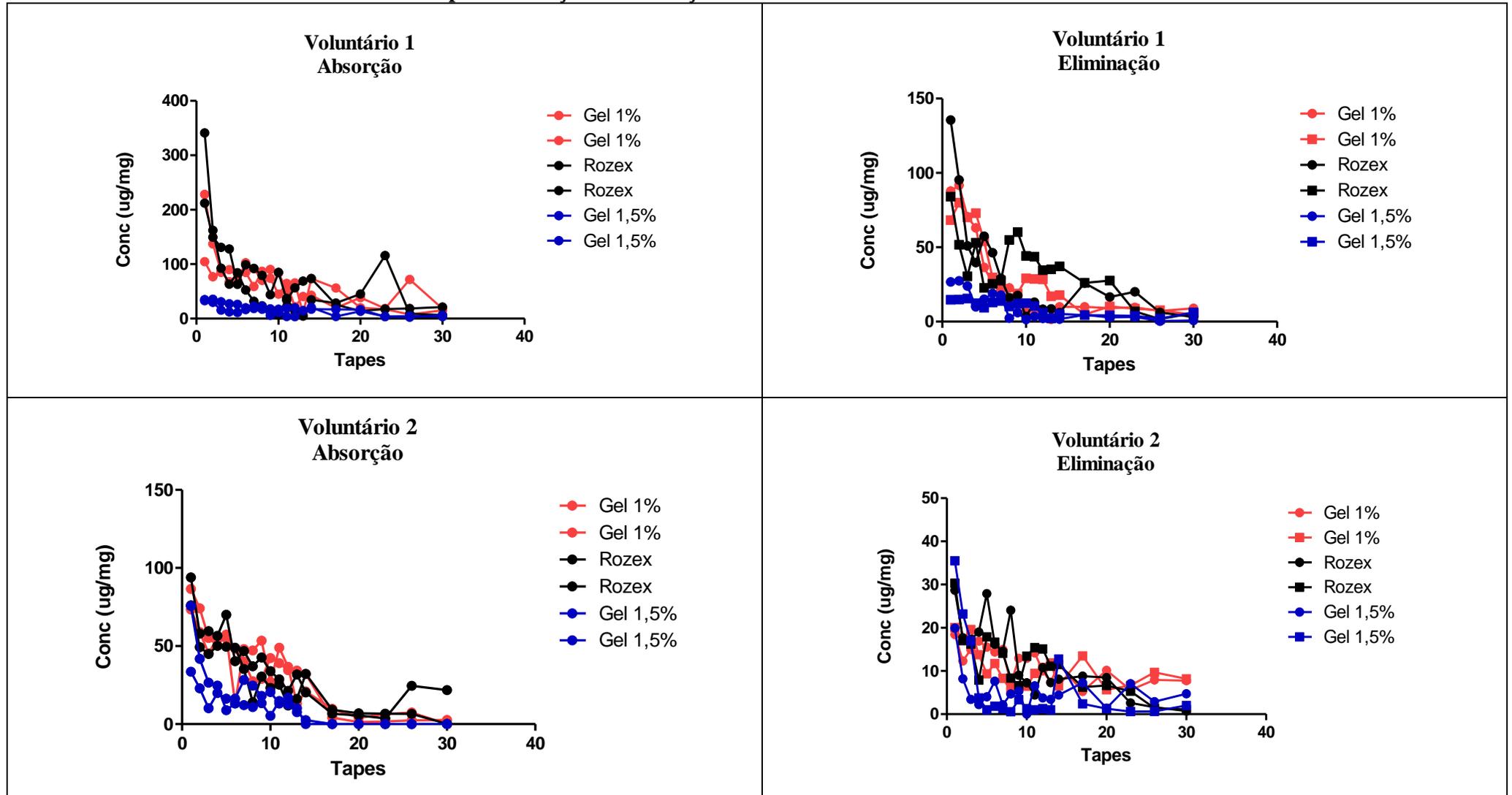
Foram utilizados 30 fitas (Scotch Book Tape, 3M, St. Paul, MN, USA) cortados em pedaços de aproximadamente $2,5 \times 2,5 \text{ cm}^2$ e deixou-se equilibrar por 12h no laboratório. O peso das fitas foi então determinado.

Foram aplicadas 143,5 mg de cada formulação, usando uma área de $2,54 \text{ cm}^2$ do antebraço, pelo menos 4 cm antes de cada pulso ou da dobra do cotovelo. Os moldes foram fixados na pele com fita adesiva (1), os produtos foram aplicados (2). Após a aplicação o local foi ocluído para evitar qualquer perda de formulação (3).

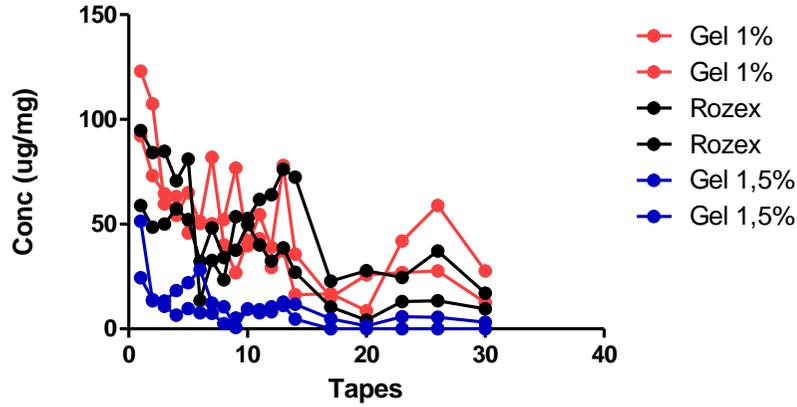


Após o tempo de aplicação, a oclusão foi retirada e o excesso de formulação foi removido utilizando dois swabs com álcool isopropílico 70% (Biossoma[®]). Os moldes foram retirados e outros com área de 1,77 cm² foram colocados em cada local de aplicação. O tape-stripping foi realizado e a perda de água transepidermal foi mensurada para assegurar que 75% do EC fosse removido, mais também que não fosse removido por completo. Após o procedimento as fitas foram pesadas novamente e em seguida o MTZ foi extraído e as soluções obtidas analisadas por CLAE.

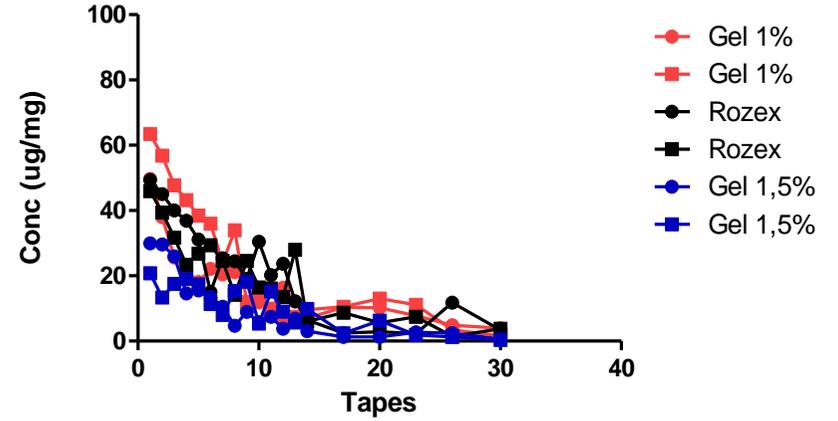
APÊNDICE B – Perfil do MTZ no EC para absorção e eliminação dos 14 voluntários



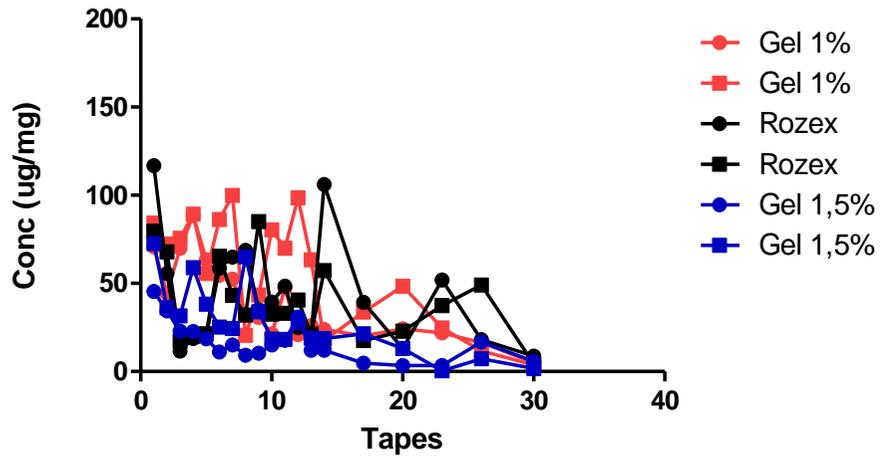
Voluntário 3
Absorção



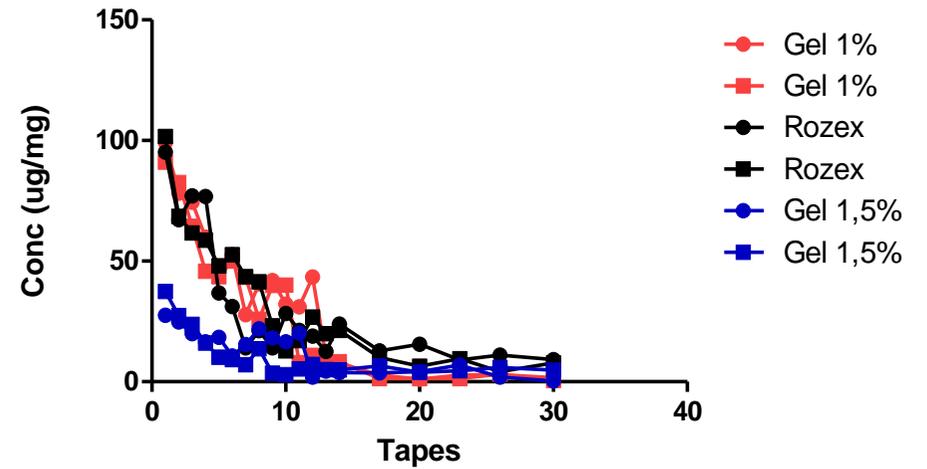
Voluntário 3
Eliminação



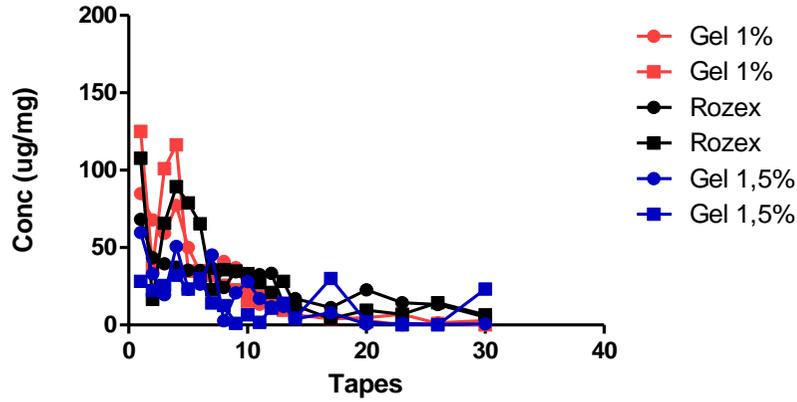
Voluntário 4
Absorção



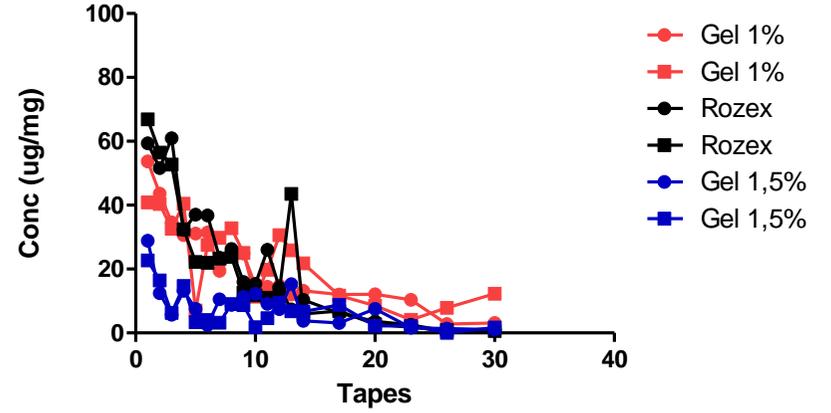
Voluntário 4
Eliminação



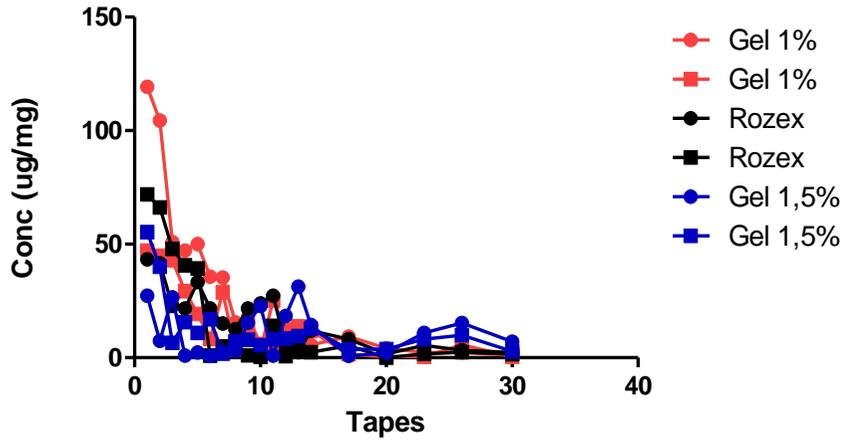
Voluntário 5
Absorção



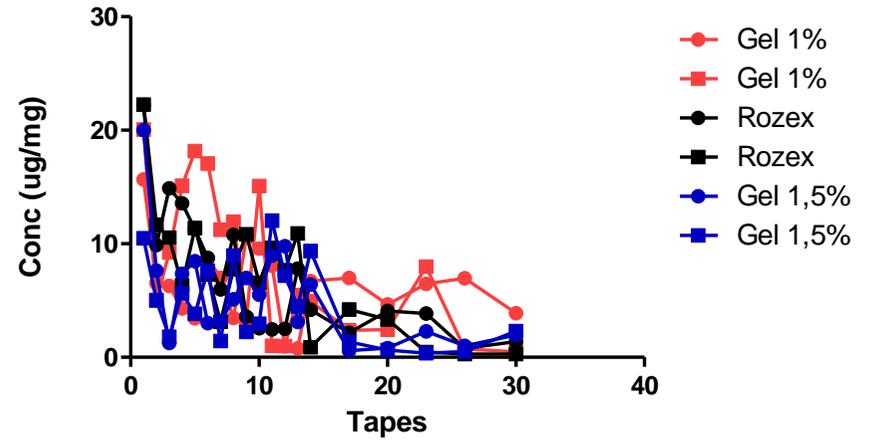
Voluntário 5
Eliminação



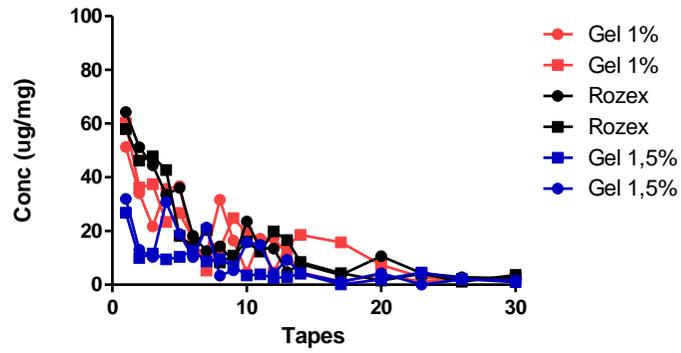
Voluntário 6
Absorção



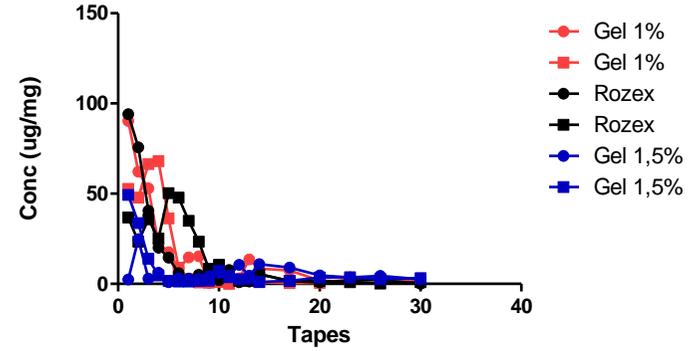
Voluntário 6
Eliminação



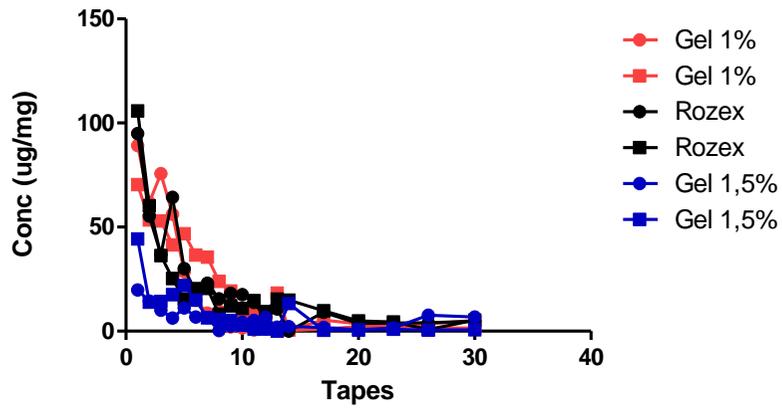
**Voluntário 7
Absorção**



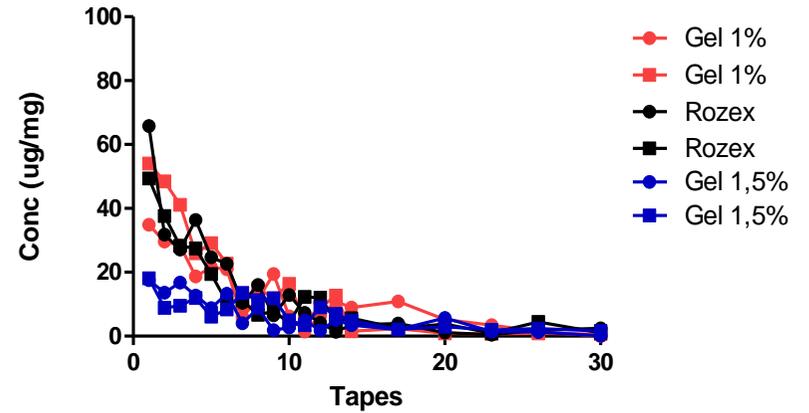
**Voluntário 7
Eliminação**



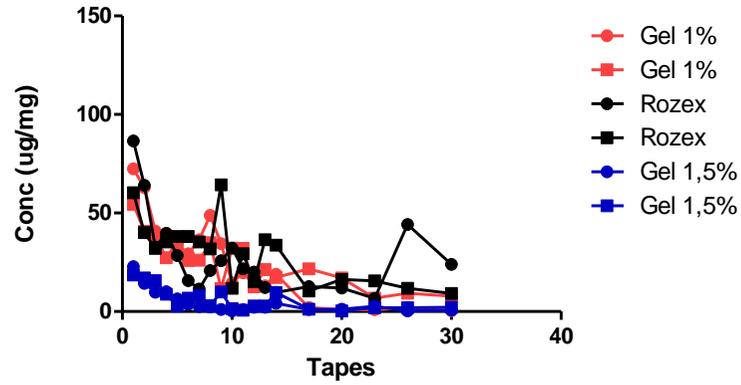
**Voluntário 8
Absorção**



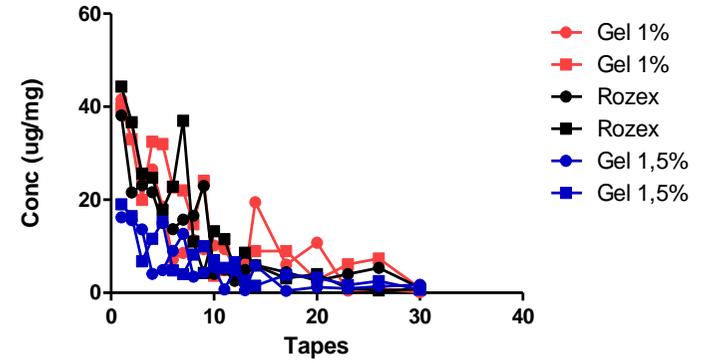
**Voluntário 8
Eliminação**



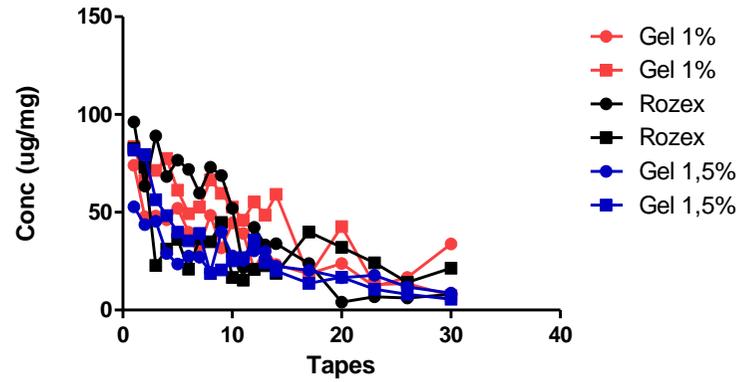
Voluntário 9
Absorção



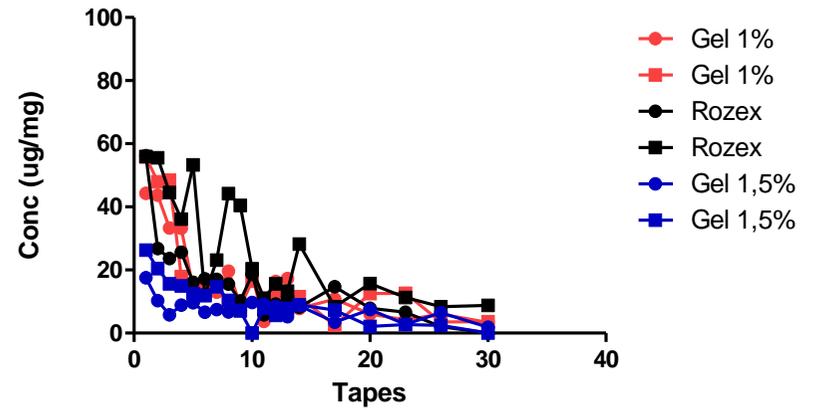
Voluntário 9
Eliminação



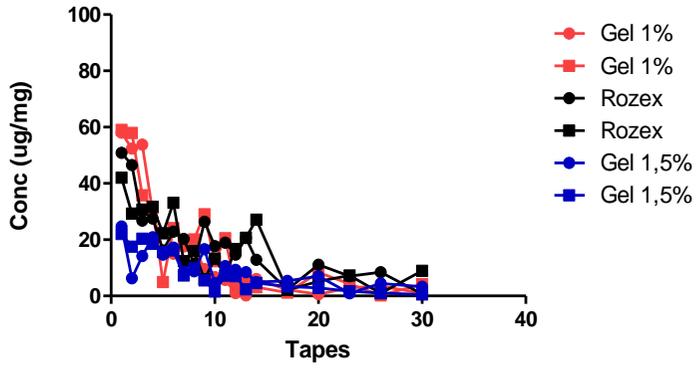
Voluntário 10
Absorção



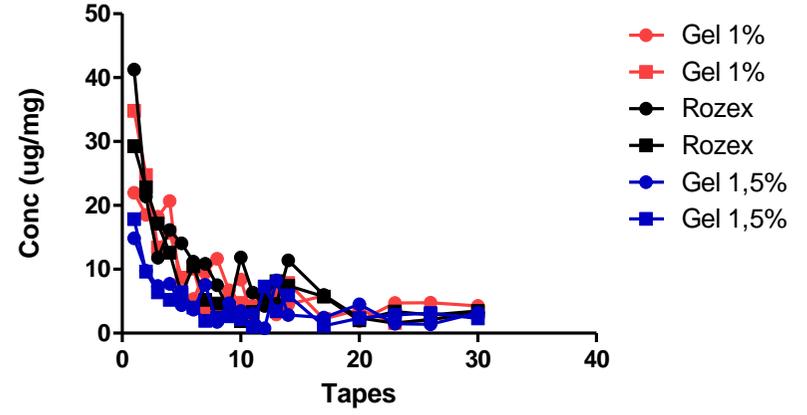
Voluntário 10
Eliminação



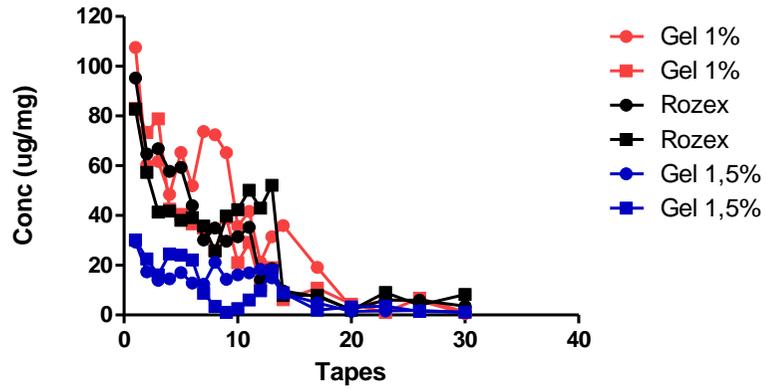
Voluntário 11
Absorção



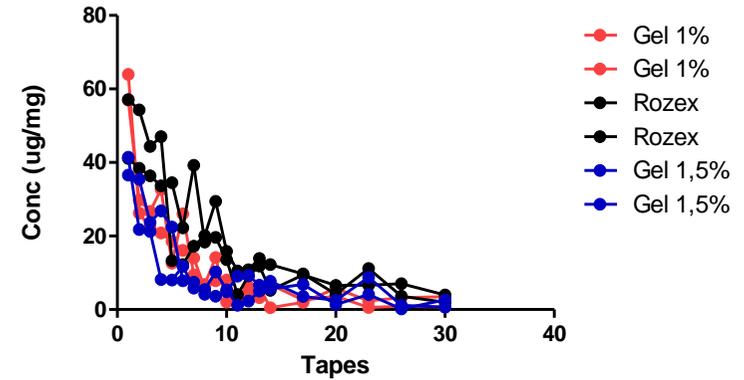
Voluntário 11
Eliminação



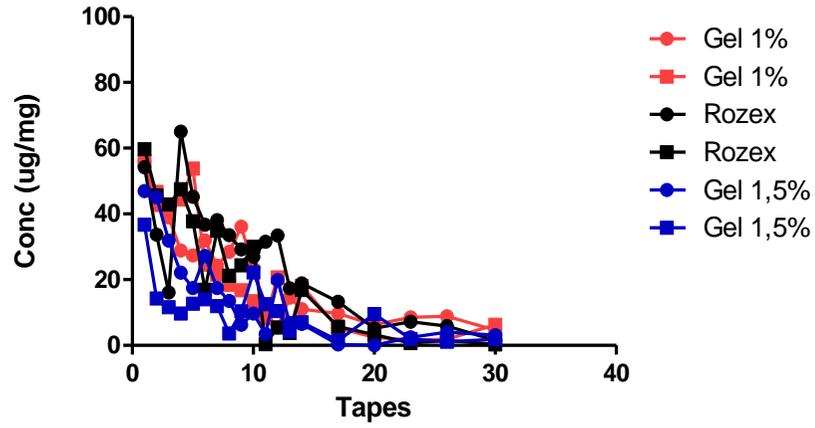
Voluntário 12
Absorção



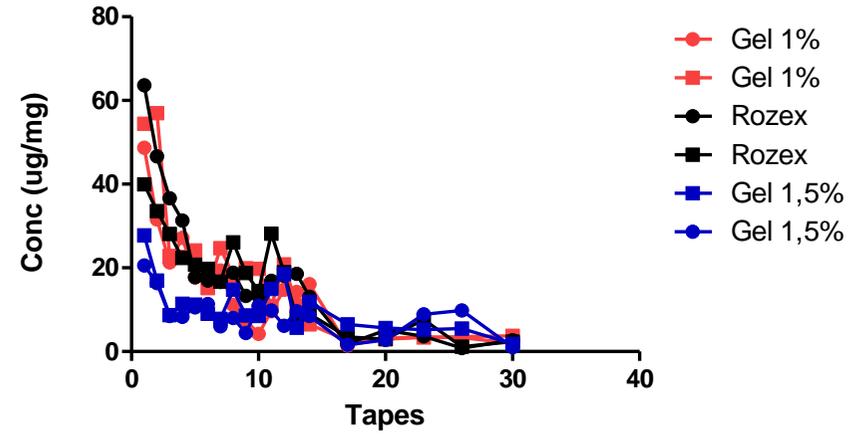
Voluntário 12
Eliminação



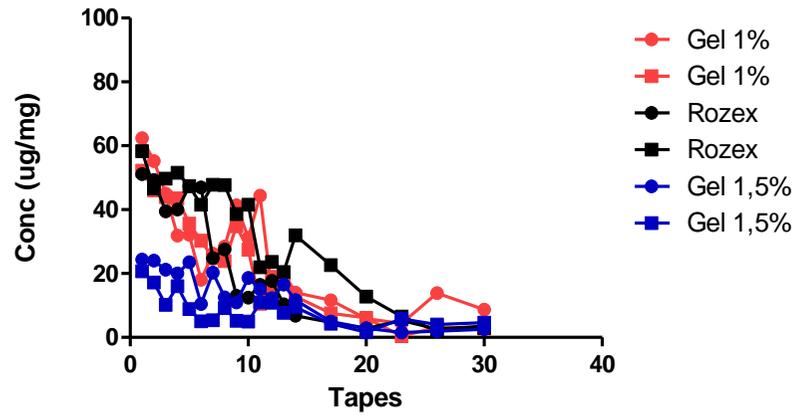
Voluntário 13
Absorção



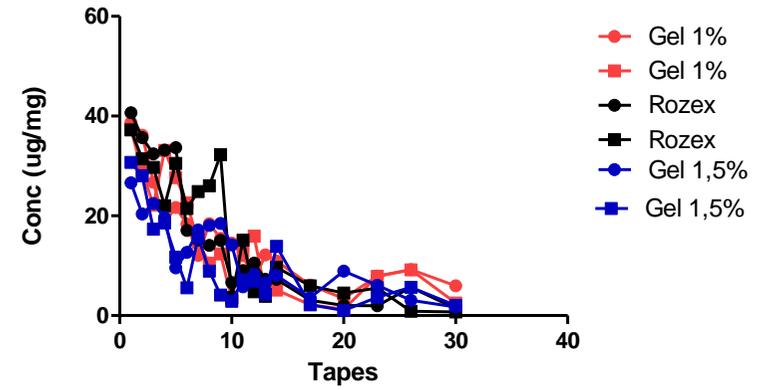
Voluntário 13
Eliminação



Voluntário 14
Absorção



Voluntário 14
Eliminação



ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)**

Convidamos o(a) Sr.(a) para participar como voluntário(a) da pesquisa: **Bioequivalência de medicamentos para administração tópica: desenvolvimento de correlações *in vitro* – *in vivo***, que está sob a responsabilidade da pesquisadora **Profª. Dra. Leila Bastos Leal**, Rua Arthur de Sá, S/N, Recife – PE, CEP: 50740-520, telefone: (81)994516044, e-mail: leila.leal@nudfac.com.br. Também participam também desta pesquisa: Prof. Dr. Davi Pereira de Santana, telefone: (81)999756222 e Thalita Pedon de Araujo, telefone: (81)992636559.

Este Termo de Consentimento pode conter informações que o/a senhor/a não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa que está lhe entrevistando para que o/a senhor/a esteja bem esclarecido (a) sobre sua participação na pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, caso aceite em fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o(a) Sr.(a) não será penalizado (a) de forma alguma. Também garantimos que o(a) Senhor(a) tem o direito de retirar o consentimento da sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade.

O objetivo desta pesquisa é gerar dados dermatofarmacocinéticos (dados que avaliam o perfil da concentração *versus* tempo do fármaco na pele), em voluntários saudáveis, com o propósito de demonstrar que experimentos *in vitro* (não invasivos), relacionados à atuação de produtos tópicos são correlacionáveis com resultados *in vivo* e avaliar a biodisponibilidade relativa e a bioequivalência. O estudo será realizado utilizando abordagens experimentais simples, mas que podem ser confiáveis e reprodutíveis. Dessa forma, poderão ser utilizadas para o estabelecimento da (in)equivalência entre formulações que contêm o mesmo Ingrediente Farmacêutico Ativo (IFA) para aplicação na pele.

As formulações serão aplicadas na pele do seu antebraço. Em seguida (6 horas após), você deverá retornar ao Centro de Pesquisa e Desenvolvimento (CP&D) do Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC), localizado no Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) para remoção da formulação residual de todos os locais de tratamento.

Após a remoção, em metade das áreas expostas às formulações, serão aplicadas fitas adesivas, com o objetivo de remover o estrato córneo. Você, então, voltará ao nosso laboratório, novamente, depois de um período de espera (6 horas) para a remoção, através das fitas adesivas, das formulações nos locais de teste restantes. O procedimento de extração será realizado pressionando a tira de fita adesiva firmemente à pele e, em seguida, removendo-a rapidamente.

Durante a remoção das formulações, serão feitas medidas da taxa de perda de água a partir da pele, utilizando equipamento que avalia a pele de maneira não invasiva, ou seja, sem causar corte ou dor, pois possuem sondas especiais, que são somente encostadas na pele durante a leitura.

Esta pesquisa pode trazer alguns riscos, eventualmente, as formulações podem causar irritação (leve inflamação), hiperpigmentação local, dermatite, vermelhidão e coceira, o que pode ocorrer com o uso de qualquer formulação tópica. Mas, para sua segurança a pesquisadora arcará com TODAS as despesas que forem necessárias, caso você tenha algum problema.

Os voluntários que aceitarem participar contribuirão com o desenvolvimento de uma abordagem de bioequivalência tópica que irá facilitar o desenvolvimento de medicamentos eficazes e menos dispendiosos.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados no Centro de Pesquisa e Desenvolvimento - CP&D/NUDFAC, no endereço acima informado por um período mínimo de 5 anos, sob responsabilidade da pesquisadora principal.

Depois de ter recebido a explicação e tirado minhas dúvidas, concordo em participar da pesquisa **BIOEQUIVALÊNCIA DE MEDICAMENTOS PARA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA: DESENVOLVIMENTO DE CORRELAÇÕES *IN VITRO* – *IN VIVO***. Estou ciente de que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, e deixar de participar do estudo sem que isto me traga alguma penalidade ou prejuízo.

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidos pelos pesquisadores. Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br.**

Profa. Dra. Leila Bastos Leal
Pesquisadora principal

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo **BIOEQUIVALÊNCIA DE MEDICAMENTOS PARA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA: DESENVOLVIMENTO DE CORRELAÇÕES *IN VITRO* – *IN VIVO***, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento).

Recife, ___ de _____ de 20__.

Assinatura do participante: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:

Nome:

Assinatura:

Assinatura:

ANEXO B – Submissão ao Comitê de ética e aprovação do estudo.

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Serres Humanos		UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-	
--	---	---	---

COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: BIOEQUIVALÊNCIA DE FORMULAÇÕES PARA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA
CONTENDO LAPACHOL: DESENVOLVIMENTO DE CORRELAÇÕES IN VITRO
e IN VIVO.

Pesquisador: LEILA BASTOS LEAL

Versão: 1

CAAE: 36315514.2.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 081724/2014

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

← → ↻ aplicacao.saude.gov.br/plataformabrasil/visao/pesquisador/gerirPesquisa/gerirPesquisaAgrupador.jsf 🔍 ☆ 🏠

Saúde
Ministério da Saúde

  [principal](#)  [sair](#)

[Público](#) [Pesquisador](#) [Alterar Meus Dados](#)

Cadastros LEILA BASTOS LEAL - Pesquisador | V3.0
Sua sessão expira em: 39min 22

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

– DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: BIOEQUIVALÊNCIA DE MEDICAMENTOS PARA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA: DESENVOLVIMENTO DE CORRELAÇÕES IN VITRO e IN VIVO
Pesquisador Responsável: LEILA BASTOS LEAL
Área Temática:
Versão: 2
CAAE: 34657814.2.0000.5208
Submetido em: 05/09/2014
Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE
Situação da Versão do Projeto: Aprovado
Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio



Comprovante de Recepção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_365226

– DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA