



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

MAIRA LUDNA DUARTE

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

Recife – PE  
2017

MAIRA LUDNA DUARTE

**Bioequivalência tópica após dose múltipla 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<sup>a</sup>. Dra. Leila Bastos Leal

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

Recife – PE  
2017

Catálogo na fonte:  
bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

D812b Duarte, Maira Ludna.  
Bioequivalência tópica após dose múltipla de produtos contendo metronidazol através da dermatofarmacocinética (DPK) / Maira Ludna Duarte. – Recife: o autor, 2017.  
92 f.; il; 30 cm.

Orientadora: Leila Bastos Leal.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas.  
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Metronidazol. 2. Absorção. 3. Bioequivalência. 4. Dose repetida. I. Leal, Leila Bastos. (orientadora). II. Título.

615.1 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2018 - 038)

MAIRA LUDNA DUARTE

**BIOEQUIVALÊNCIA TÓPICA APÓS DOSE MÚLTIPLA DE PRODUTOS  
CONTENDO METRONIDAZOL ATRAVÉS DA  
DERMATOFARMACOCINÉTICA (DPK)**

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

Aprovada em: 14 de março de 2017.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Davi Pereira de Santana (Presidente)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Danilo César Galindo Bedor (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Danielle Cristine Almeida Silva de Santana (Examinadora Externa)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leila Bastos Leal (Orientadora)  
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

**Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim**

Vice-Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

**Betânia Lucena Domingues Hatzlhofer**

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**Luiz Alberto Lira Soares**

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

**José Lamartine Soares Sobrinho**

*Dedico este trabalho aos meus pais, Francisco Agivan e Maria do Carmo, com todo meu amor e gratidão. Desejo ter sido merecedora do esforço dedicado por vocês em todos os aspectos, especialmente quanto à minha formação.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pelo dom da vida, pelas bênçãos, oportunidades e força.

Aos meus pais, meu porto seguro e fortaleza, minha razão para seguir em frente, vencendo os obstáculos. Obrigada por sempre me ensinarem que estudar é o caminho, orientando e provendo meios para que isso fosse possível, e ainda hoje, permanecem estimulando e incentivando tudo aquilo que possa significar o meu crescimento. Vocês são minha motivação para sempre buscar e dar o que há de melhor em mim.

Ao meu irmão, Eduardo, por sempre estar por perto e por me fazer sentir que nunca estou sozinha mesmo longe de casa.

À toda a minha família, minha avó Dona, meus tios e primos, que me motivam e me proporcionam sempre um ambiente agradável e feliz. É uma enorme alegria ser motivo de orgulho para vocês.

À minha orientadora, a professora Dra. Leila Bastos Leal, pelo acolhimento, paciência e orientação indispensável para a elaboração deste trabalho. Obrigada por ser sempre tão presente e disponível para ajudar. Sua postura profissional é inspiradora.

Ao meu co-orientador, professor Dr. Davi Pereira de Santana, pelo acolhimento e viabilização do projeto.

Ao professor Dr. Danilo Bedor, pela contribuição nas análises de quantificação por CLAE-UV e LC-MS/MS.

Aos meus amigos de graduação, Luan, Camila, Eslia, Rayana e Lays, por todos os momentos compartilhados, pela amizade e por sempre se fazerem presentes. Vocês são responsáveis por tornar meus anos de graduação inesquecíveis.

Aos amigos e parceiros do CP&D, Thalita, Ana Rosa, Isabelle, Gustavo, Wellithom, Irla, Carol Chagas, Giovana, Ellison, Karine, Karol Belém, Juliana, Anellyse, Camila, Asley e Amélia. Vocês foram muito importantes nesta caminhada, cada um deu sua contribuição para realização deste trabalho. Obrigada por toda a ajuda, acolhimento, amizade e momentos compartilhados.

A Isabelle e Thalita pelas enormes contribuições na execução de parte dos experimentos e no presente trabalho.

Aos amigos da Analítica, Carol Costa, Carlos Eduardo, Atamai e Diego, pela ajuda durante as análises em CLAE-UV e LC-MS/MS e pela amizade.

Aos voluntários dos estudos clínicos, sem vocês nada disso seria possível. Obrigada pela disponibilidade e confiança.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/CCS/UFPE, Nerilin e Rilvan.

Aos funcionários da Farmácia Escola Carlos Drummond de Andrade.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

## RESUMO

A administração de medicamentos em doses múltiplas pode ser considerada a modalidade mais frequentemente utilizada na terapêutica farmacológica de inúmeras doenças. Todavia, não há relatos na literatura de estudos em regime de dose múltipla visando o estabelecimento da biodisponibilidade (BD) e bioequivalência (BE) tópica entre produtos usando *tape-stripping*. A BD/BE após um regime de dose múltipla entre três formulações de metronidazol (MTZ) 0,75%, sendo uma delas disponível no Brasil (Rozex<sup>®</sup> - Galderma, Brasil, utilizada neste trabalho como produto de referência) e duas formulações gelificadas extemporâneas (Teste 1 e Teste 2), preparadas em nosso laboratório contendo os mesmos excipientes do Rozex<sup>®</sup>, foram avaliadas por meio de um estudo aberto, randomizado e cruzado, realizado em 14 participantes brasileiros saudáveis. Uma dose de 29 mg de cada formulação tópica (217,5 µg de MTZ) foi aplicada em duplicata nos antebraços de cada participante seguindo um regime de aplicação a cada 12 horas durante 7 dias. O estrato córneo (EC) foi coletado no período de 2 horas pós-aplicação, no sétimo dia do estudo. O perfil de concentração do MTZ após a aplicação foi determinado pela remoção sequencial das camadas de EC utilizando fita adesiva. Em cada local de aplicação foram utilizadas 30 fitas. Após o procedimento de extração do fármaco das fitas, as concentrações do MTZ no EC foram determinadas utilizando LC-MS/MS e a avaliação dos dados foi realizada considerando ou não as duas primeiras fitas removidas. A análise da BE tópica após dose múltipla *in vivo* entre produtos contendo MTZ através da dermatofarmacocinética (DPK) demonstrou com significância de 10% no intervalo de 80%-125% que o produto Teste 1 é bioequivalente ao produto de referência, Rozex<sup>®</sup>, e que o produto Teste 2 não atendeu ao critério de bioequivalência com o Rozex<sup>®</sup>. A avaliação da BE através de DPK após um regime de dose múltipla, realizado neste trabalho, apresentou resultados semelhantes ao estudo de DPK em dose única realizado por Araújo (2016) com as mesmas formulações. Assim, conclui-se que, apenas um aumento de 0,5% de agente espessante, presente no Teste 2, foi suficiente para aumentar a viscosidade e diminuir a espalhabilidade da formulação, levando a um resultado inconclusivo entre o Teste 2 e o produto de referência. Ao mesmo tempo, a avaliação de DPK após um regime de dose múltipla pode ser substituída, para o MTZ, pela DPK em dose única, tornando o procedimento mais fácil, rápido, barato e seguro. No entanto, estudos com outros fármacos são necessários para verificar se esta tendência se mantém.

**Palavras-chave:** Metronidazol. Absorção. Bioequivalência. Dose Repetida.

## ABSTRACT

The most common way to use medicines is as part of a multiple dose regimen. However, there are no reports in the literature of a guidance or studies using a multiple dose regimen aimed at the assessment of topical bioavailability (BA) and bioequivalence (BE) using tape-stripping. BA/BE after a multiple dose regimen among three 0.75% metronidazole (MTZ) formulations, one of them available in Brazil (Rozex<sup>®</sup>-Galderma, Brazil, used as reference product in this study) and two extemporaneous gel formulations (Test 1 and Test 2), prepared in our laboratory containing the same excipients as Rozex<sup>®</sup>, were evaluated through an open, randomized, cross-over study conducted in 14 healthy Brazilian research participants. A dose of 29 mg of each topical formulation (217.5 µg of MTZ) was applied in duplicate in forearms of each participant following an application regimen every 12 hours for 7 days. The stratum corneum (SC) was collected within 2 hours post-application, on the seventh day of the study. The MTZ concentration profile after application was determined by the sequential removal of the SC layers using adhesive tape. 30 tapes were used at each application site. After tape drug extraction procedure, concentrations of MTZ in SC were determined using LC-MS/MS and data were assessed considering whether or not the first two removed tapes. Analysis of the topical BE after multiple dose in vivo among products containing MTZ through dermatopharmacokinetics (DPK) demonstrated with 10% significance in the range 80% -125% that the Test 1 product is bioequivalent to the Rozex<sup>®</sup>, reference product, and that the Test 2 product did not achieve the BE criteria with Rozex<sup>®</sup>. The evaluation of BE through DPK following a multiple dose regimen performed in this study presented similar results to the single dose DPK studies performed by Araújo (2016) using the same formulations. Thus, it was concluded that, only a 0.5% increase in gelling agent present in Test 2 was sufficient to increase viscosity and decrease the spreadability of the formulation, leading to an inconclusive BE result between Test 2 and the reference product. At the same time, the evaluation of DPK after a multiple dose regimen appears to be likely to be replaced, in the case of MTZ, by DPK in a single dose, making the procedure easier, faster, cheaper and safer. However, studies with other drugs are needed to see if this trend holds.

**Keywords:** Metronidazole. Absorption. Bioequivalence. Repeated Dose.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Representação esquemática da estrutura da pele. ....                                                                                                                                                                                                           | 24 |
| Figura 2. Representação esquemática da epiderme. ....                                                                                                                                                                                                                    | 24 |
| Figura 3. Representação esquemática do estrato córneo de acordo com o modelo brick and mortar. ....                                                                                                                                                                      | 25 |
| Figura 4. Representação esquemática das possíveis rotas de penetração de fármacos através da pele. ....                                                                                                                                                                  | 27 |
| Figura 5. Ilustração gráfica da curva de concentração plasmática de um fármaco, destacando os principais parâmetros farmacocinéticos. ....                                                                                                                               | 31 |
| Figura 6. Ilustração do processo de tape-stripping. ....                                                                                                                                                                                                                 | 34 |
| Figura 7. Distribuição de corneócitos nas fitas removidas. ....                                                                                                                                                                                                          | 35 |
| Figura 8. Principais métodos para a determinação da BD/BE de produtos uso tópico. Os métodos em itálico ainda estão sob avaliação do FDA. ....                                                                                                                           | 39 |
| Figura 9. Representação das quantidades máximas ( $X_M$ ) e mínimas ( $X_m$ ) de fármaco no organismo após administração de várias doses; $X_0$ = dose administrada. ....                                                                                                | 42 |
| Figura 10. Estrutura química do metronidazol. ....                                                                                                                                                                                                                       | 44 |
| Figura 11. Tira de fita utilizada no procedimento de tape-stripping. ....                                                                                                                                                                                                | 54 |
| Figura 12. À esquerda, fixação do molde no antebraço do participante e, à direita, aplicação da formulação no local de tratamento. ....                                                                                                                                  | 54 |
| Figura 13. Procedimento de tape-stripping em participante da pesquisa. ....                                                                                                                                                                                              | 55 |
| Figura 14. Desenho esquemático dos antebraços dos participantes, destacando os dias de coleta de EC (2, 3, 4, 7, 10 e 14) e os pontos de absorção e eliminação. ....                                                                                                     | 57 |
| Figura 15. Desenho esquemático dos antebraços dos participantes no teste 1 de avaliação de contaminação, destacando os controles (áreas não aplicadas). ....                                                                                                             | 58 |
| Figura 16. Desenho esquemático dos antebraços dos participantes no teste 2 de avaliação da contaminação, destacando os controles (áreas não aplicadas). ....                                                                                                             | 58 |
| Figura 17. Desenho esquemático dos antebraços dos participantes no estudo de bioequivalência, destacando a distribuição das formulações nas áreas de aplicação. ....                                                                                                     | 60 |
| Figura 18. Gráfico da quantidade de metronidazol permeada por área ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) no líquido receptor em função do tempo para cada formulação. Cada ponto equivale ao valor médio de 6 ensaios $\pm$ DP. ....                                             | 64 |
| Figura 19. Gráfico da quantidade de metronidazol retida por área ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) no estrato córneo para cada formulação. ....                                                                                                                              | 65 |
| Figura 20. Gráfico da quantidade de metronidazol retida por área ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) na epiderme viável e derme para cada formulação. ....                                                                                                                     | 66 |
| Figura 21. Gráfico do perfil dermatofarmacocinético do metronidazol após aplicação tópica de Rozex® e medição da concentração pós-aplicação e pós-remoção na pele humana. Cada ponto equivale ao valor médio de 14 ensaios $\pm$ DP. ....                                | 67 |
| Figura 22. Gráfico do perfil do metronidazol após aplicação múltipla de Rozex® durante 14 dias e medição de uma concentração pós-aplicação e uma pós-remoção na pele humana nos dias 2, 3, 4, 7, 10 e 14. Cada ponto equivale ao valor médio de 6 ensaios $\pm$ DP. .... | 70 |
| Figura 23. Antebraço de um participante com descamação da pele a partir do 10º dia de aplicação do produto de referência. ....                                                                                                                                           | 70 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Composição das formulações denominadas de Produtos A e C (teste 1 e 2, respectivamente) e produto B (Rozex®). .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 49 |
| Tabela 2. Condições cromatográficas do método utilizado para a quantificação do metronidazol por CLAE-UV. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 50 |
| Tabela 3. Condições cromatográficas do método utilizado para a quantificação do metronidazol por LC-MS/MS. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 59 |
| Tabela 4. Valores médios de pH, viscosidade aparente e teor das formulações estudadas. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 62 |
| Tabela 5. Médias superior e inferior com intervalo de confiança 90% para a quantidade de fármaco por cm <sup>2</sup> de EC após 2 h de absorção (Q <sub>i</sub>   absorção). ....                                                                                                                                                                                                                                                        | 72 |
| Tabela 6. Avaliação de bioequivalência de produtos com MTZ 0,75% (Testes 1 e 2) em comparação com o produto de referência determinada em 14 participantes considerando todas fitas removidas por tape-stripping. Bioequivalência foi avaliada através da razão entre o log transformado da concentração de fármaco no EC (média ± 90% de intervalo de confiança) após 2 h de absorção no sétimo dia de aplicação múltipla. ....          | 73 |
| Tabela 7. Avaliação de bioequivalência de produtos com MTZ 0,75% (Testes 1 e 2) em comparação com o produto de referência determinada em 14 participantes excluindo as duas primeiras fitas removidas por tape-stripping. Bioequivalência foi avaliada através da razão entre o log transformado da concentração de fármaco no EC (média ± 90% de intervalo de confiança) após 2 h de absorção no sétimo dia de aplicação múltipla. .... | 73 |

## 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

CLAE-UV – Cromatografia Líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta

DP – Desvio Padrão Relativo

DPK – Dermatofarmacocinética

EC – Estrato córneo

FDA – *Food and Drug Administration*

IFA – Insumo Farmacêutico Ativo

IMC – Índice de massa corpórea

LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de massas triploquadrupolar

LIQ – Limite Inferior de quantificação

MTZ –Metronidazol

MTZ-D4 – Metronidazol deuterado

USP – Farmacopeia dos Estados Unidos

UV – Ultravioleta

## LISTA DE SÍMBOLOS

% – porcentagem

µg – micrograma

µL – microlitro

µm - micrometro

cm – centímetro

g – grama

h – hora

J – fluxo

K<sub>p</sub> – coeficiente de permeabilidade

mg – miligrama

min – minuto

mL – mililitro

mV – milivolts

° – graus

°C – graus Celsius

Pa.s – Pascal segundo

pH – potencial hidrogeniônico

r<sup>2</sup> – Coeficiente de determinação

s – segundo

T – temperatura

v – volume

## SUMÁRIO

|                                                                                     |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                           | <b>17</b> |
| <b>2 OBJETIVOS .....</b>                                                            | <b>19</b> |
| <b>2.1 Objetivo Geral .....</b>                                                     | <b>19</b> |
| <b>2.2 Objetivos Específicos .....</b>                                              | <b>19</b> |
| <b>3 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>                                                  | <b>20</b> |
| <b>3.1 Pele humana .....</b>                                                        | <b>20</b> |
| <b>3.2 Penetração de fármacos através da pele .....</b>                             | <b>27</b> |
| <b>3.3 Biodisponibilidade Tópica .....</b>                                          | <b>30</b> |
| 3.3.1 <i>Conceito de Biodisponibilidade.....</i>                                    | 30        |
| 3.3.2 <i>Biodisponibilidade sob a ótica dos produtos tópicos de ação local.....</i> | 31        |
| <b>3.4 Dermatofarmacocinética .....</b>                                             | <b>33</b> |
| 3.4.1 <i>Tape-stripping .....</i>                                                   | 34        |
| 3.5.1 <i>Design de estudos de BE em dose múltipla .....</i>                         | 41        |
| <b>3.6 Metronidazol.....</b>                                                        | <b>43</b> |
| 3.6.1 <i>Aspectos farmacocinéticos .....</i>                                        | 45        |
| 3.6.2 <i>Aspectos farmacodinâmicos .....</i>                                        | 45        |
| 3.6.3 <i>Efeitos adversos.....</i>                                                  | 46        |
| <b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                                   | <b>47</b> |
| <b>4.2 Material .....</b>                                                           | <b>47</b> |
| 4.2.1 <i>Amostras.....</i>                                                          | 47        |
| 4.2.2 <i>Padrões.....</i>                                                           | 47        |
| 4.2.3 <i>Matérias-primas, reagentes e materiais .....</i>                           | 47        |
| 4.2.4 <i>Equipamentos .....</i>                                                     | 48        |
| <b>4.3 Controle de qualidade das formulações.....</b>                               | <b>48</b> |
| 4.3.1 <i>Determinação do pH .....</i>                                               | 49        |
| 4.3.2 <i>Avaliação da viscosidade .....</i>                                         | 49        |
| 4.3.3 <i>Determinação do teor de metronidazol .....</i>                             | 49        |
| <b>4.4 Estudos de permeação cutânea e dermatofarmacocinética in vitro .....</b>     | <b>50</b> |
| 4.4.1 <i>Preparo do meio receptor e obtenção da biomembrana .....</i>               | 50        |
| 4.4.2 <i>Condições de realização do ensaio de permeação in vitro .....</i>          | 51        |
| 4.4.3 <i>Procedimento do estudo de DPK (tape-stripping) in vitro .....</i>          | 51        |

|                                                                                                                     |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.4.4 Avaliação da retenção epidérmica e dérmica .....                                                              | 52        |
| <b>4.5 Procedimento do estudo de dermatofarmacocinética in vivo em participantes sadios.....</b>                    | <b>52</b> |
| 4.5.1 Comitê de Ética e seleção dos participantes da pesquisa .....                                                 | 52        |
| 4.5.2 Determinação do fototipo de pele e tolerabilidade .....                                                       | 53        |
| 4.5.3 Protocolo de execução da técnica de tape-stripping in vivo .....                                              | 53        |
| 4.5.4 Determinação dos parâmetros dermatofarmacocinéticos in vivo do metronidazol no estrato córneo após dose única | 55        |
| 4.5.5 Determinação da biodisponibilidade do metronidazol no estrato córneo após dose múltipla.....                  | 56        |
| 4.5.6 Investigação da contaminação .....                                                                            | 57        |
| 4.5.7 Estudo de Bioequivalência de formulações contendo metronidazol através da dermatofarmacocinética              | 59        |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                                                                | <b>62</b> |
| <b>5.2 Controle de qualidade das formulações.....</b>                                                               | <b>62</b> |
| <b>5.3 Estudos de permeação cutânea e dermatofarmacocinética in vitro .....</b>                                     | <b>63</b> |
| 5.3.1 Avaliação da quantidade de metronidazol permeada .....                                                        | 63        |
| 5.3.2 Estudo de dermatofarmacocinética (tape-stripping) in vitro .....                                              | 64        |
| 5.3.3 Avaliação da retenção epidérmica e dérmica .....                                                              | 65        |
| <b>5.4 Estudo de dermatofarmacocinética in vivo em participantes sadios.....</b>                                    | <b>66</b> |
| 5.4.1 Fototipo de pele e Tolerabilidade .....                                                                       | 66        |
| 5.4.2 Determinação dos parâmetros dermatofarmacocinéticos do metronidazol no estrato córneo após dose única         | 67        |
| 5.4.3 Determinação da biodisponibilidade do metronidazol no estrato córneo após dose múltipla.....                  | 69        |
| 5.4.4 Investigação da contaminação .....                                                                            | 71        |
| 5.4.5 Estudo de Bioequivalência de formulações contendo metronidazol através da dermatofarmacocinética              | 72        |
| <b>6 CONCLUSÃO .....</b>                                                                                            | <b>75</b> |
| <b>7 PERSPECTIVAS.....</b>                                                                                          | <b>77</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                                            | <b>78</b> |
| <b>APÊNDICE A – Perfil do MTZ no EC após dose múltipla em 6 participantes adultos sadios .....</b>                  | <b>88</b> |
| <b>ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido.....</b>                                                    | <b>89</b> |
| <b>ANEXO B – Submissão ao Comitê de ética e aprovação do estudo.....</b>                                            | <b>92</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Os medicamentos de uso tópico dermatológico pertencem à classe de fármacos de ação local, ou seja, sua ação está focada na pele (SCHAEFER; ZESCH; STÜTTGEN, 1982). Os produtos dermatológicos tópicos são preparações semissólidas tais como cremes, pomadas e géis que veiculam fármacos para prevenir, tratar e/ou aliviar sintomas de desordens cutâneas locais. Tais preparações incluem antibacterianos, antifúngicos, antivirais, corticosteroides e retinoides. O início, a duração e a magnitude da resposta terapêutica a qualquer fármaco de ação tópica dependem da eficiência relativa de três processos sequenciais: liberação do fármaco do produto, penetração/difusão do fármaco através do estrato córneo (EC) e ativação do efeito farmacológico desejado no local de ação (SHAH; HOWARD; MAIBACH, 2014).

A garantia da qualidade de um produto genérico, seja ele de ação local ou sistêmica, requer um complexo conjunto de estudos que atestem a equivalência contínua em relação ao produto referência registrado no órgão regulatório responsável. Dentre esses estudos têm-se os estudos de biodisponibilidade (BD) e bioequivalência (BE) (SHAH; HOWARD; MAIBACH, 2014). Em geral, a administração tópica resulta em baixas concentrações sistêmicas, reduzindo, assim, os possíveis efeitos tóxicos do fármaco, mas dificultando a determinação de sua concentração em níveis plasmáticos (STORPIRTIS et al., 2009). Diante disso, o conceito clássico de BD/BE, aplicável para os fármacos de ação sistêmica, não reflete de forma apropriada a farmacocinética de ativos dermatológicos de ação local (HERKENNE et al., 2007).

Diversas técnicas vêm sendo investigadas com propósito do estabelecimento adequado da BD/BE tópica, algumas delas são: biópsia cutânea, sucção de bolhas, microscopia confocal de varredura, espectroscopias Raman e infravermelho próximo, microdiálise e a dermatofarmacocinética (DPK) (NARKAR, 2010). A DPK é uma abordagem cinética baseada na terapia tópica, onde o fármaco é administrado na barreira limitante da difusão da pele, o EC, para exercer a sua atividade farmacológica. O método utiliza o EC em lugar do sangue como matriz de amostragem, juntamente com um ensaio bioanalítico validado para quantificar o(s) fármaco(s) (SHAH et al., 1998). A técnica envolve a determinação da quantidade de fármaco presente no EC em função do tempo pós-aplicação e pós-remoção da formulação ensaiada, utilizando a metodologia de *tape-stripping* para coleta de amostra (HERKENNE et al., 2007).

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 BE entre estes medicamentos e seus respectivos medicamentos de referência através de estudos clínicos ou farmacodinâmicos, no caso dos corticosteroides (FDA, 1998). No que diz respeito à utilização mundial da DPK na avaliação de medicamentos genéricos para uso tópico, atualmente, apenas o Japão e África do Sul aceitam seu uso para este fim (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 BE ou estudos clínicos para candidatos a genérico. A equivalência terapêutica é, então, atestada pela realização da 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).

Na realização de alguns testes de BE, a escolha de um regime de dose única e/ou múltipla é de suma importância para assegurar uma extrapolação confiável dos resultados, tendo em vista as características do fármaco (por exemplo, a meia-vida de eliminação), a indicação terapêutica e o esquema terapêutico. De acordo com a agência reguladora nacional em seu guia para testes de BD/BE para produtos de uso oral, estudos de dose múltipla geralmente não são recomendados, uma vez que os estudos de dose única são mais sensíveis a diferenças entre formulações. No entanto, os estudos de dose múltipla podem ser utilizados em casos onde é certo que os mesmos reduzem a variabilidade interindividual no processo de absorção de fármacos (BRASIL, 2006).

Sob o ponto de vista da BE tópica de produtos, não há relatos na literatura sobre orientação e/ou a realização propriamente dita de estudos que adotem um regime de dose múltipla. Diante de uma lacuna na literatura, a realização de estudos envolvendo BD/BE tópica após dose múltipla mostra-se importante a fim de corroborar com o que já é preconizado para produtos orais ou propor novas orientações voltadas às peculiaridades dos produtos dermatológicos de aplicação tópica.

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou realizar um estudo de bioequivalência tópica após dose múltipla de produtos contendo MTZ através da DPK e comparar os resultados obtidos com dados anteriores de bioequivalência das mesmas formulações após dose única.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a bioequivalência tópica após dose múltipla de produtos contendo metronidazol através da dermatofarmacocinética.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a permeação cutânea *in vitro* do metronidazol a partir das formulações tópicas no período de 48h;
- Determinar os parâmetros dermatofarmacocinéticos *in vivo* do metronidazol no estrato córneo após dose única, segundo o esboço de guia do FDA “*Topical dermatological drug product NDAs and ANDAs - In vivo bioavailability, bioequivalence, in vitro release, and associated studies*” (1998);
- Avaliar a biodisponibilidade do metronidazol no estrato córneo após dose múltipla;
- Delinear o estudo de bioequivalência tópica após dose múltipla;
- Determinar a bio(in)equivalência tópica após dose múltipla de produtos contendo metronidazol através da dermatofarmacocinética.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Pele humana

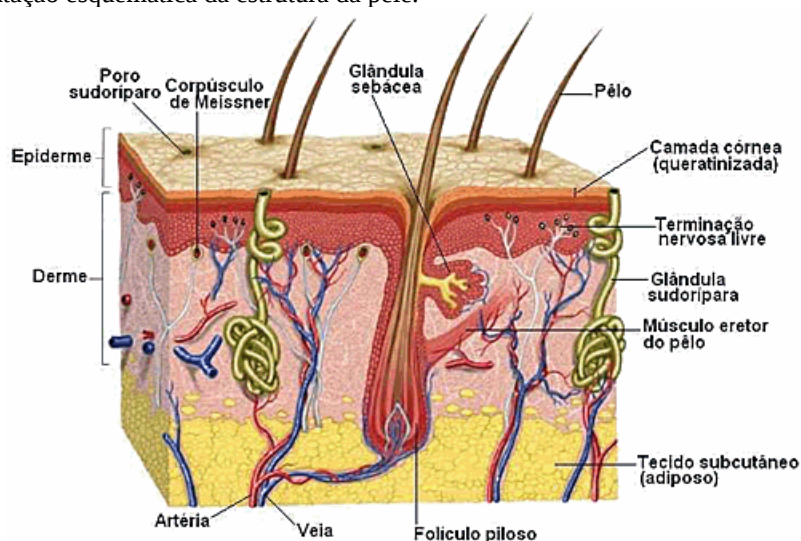
A pele é o manto de revestimento do organismo, indispensável à vida e que isola os componentes orgânicos do meio exterior. A pele é o órgão mais extenso do corpo humano, com uma área de superfície entre 1,2 e 2,3 m<sup>2</sup>, espessura variável (1 a 4 mm) conforme a região, constituindo aproximadamente 16% do peso total de um adulto (SAMPAIO; RIVITI, 2008; SILVERTHORN, 2010).

Trata-se de um órgão de revestimento heterogêneo, caracterizado por uma estrutura própria que se apresenta em camadas interdependentes e graças a essa complexa estrutura, a pele pode exercer diferentes funções:

- Manutenção da sua própria integridade e do organismo;
- Proteção contra agressões e agentes externos;
- Manutenção da homeostasia através da regulação da temperatura;
- Barreira à prova d'água;
- Absorção de luz ultravioleta, protegendo de seus efeitos nocivos;
- Produção de vitamina D quando exposta à luz ultravioleta (UV);
- Informação sensorial, pois contem receptores sensoriais capazes de detectar o calor, o frio, o tato, a pressão e a dor;
- Informação imunitária, reconhecimento de características antigênicas pelas células de Langerhans;
- Funções estéticas (HARRIS, 2009; FERNANDES, 2012).

Estruturalmente, a pele consiste de três partes principais (Figura 1). A porção mais externa, mais delgada, que é composta de epitélio, é denominada epiderme. A epiderme está fixada à parte de tecido conjuntivo interno, mais espessa que é denominada derme. Sob a derme está uma tela subcutânea, também chamada de hipoderme, constituída de tecido adiposo e tecido conjuntivo alveolar, que fixa a pele às estruturas subjacentes (TORTORA; GRABOWSKI, 2002).

Figura 1. Representação esquemática da estrutura da pele.

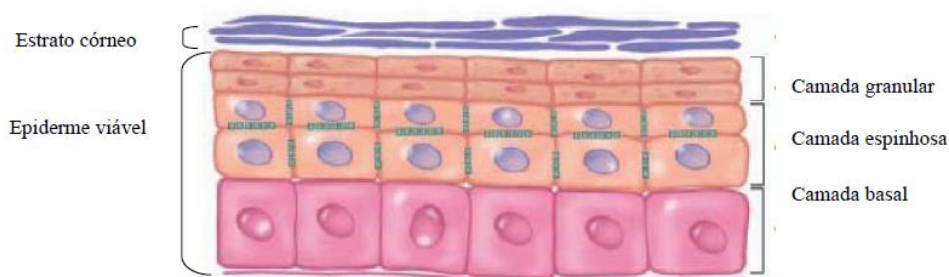


Fonte: <http://www.auladeanatomia.com/novosite/sistemas/sistema-tegumentar/> (Acesso em 27/12/2016).

A epiderme é, basicamente, um tecido epitelial estratificado queratinizado, avascular. A epiderme apresenta variações estruturais e funcionais significativas na dependência do seu sítio anatômico; sua espessura, por exemplo, varia de valores médios de 77  $\mu\text{m}$  no antebraço, valores mínimos de 30  $\mu\text{m}$  na pálpebra e valores máximos de 1,6 mm na região plantar (BATISSE et al., 2002).

A epiderme é constituída por queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans (apresentação de antígenos) e células de Merkel (sensoriais). No entanto, o tipo celular mais numeroso é o queratinócito, cerca de 90% (SILVERTHORN, 2010). A epiderme pode ser dividida em duas camadas principais: epiderme viável e estrato córneo (EC), conforme ilustrado na figura 2 (HADGRAFT, 2001).

Figura 2. Representação esquemática da epiderme.



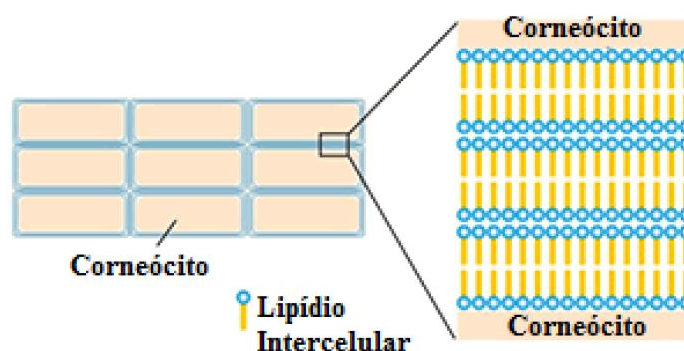
Fonte: Adaptado de TOSATO, 2010.

O EC é composto de células mortas, achatadas, entrelaçadas e ricas em queratina (corneócitos), imersas numa matriz lipídica e sua constituição é o resultado final da

diferenciação dos queratinócitos (MENON; CLEARY; LANE, 2012). No processo de queratinização, as células formadas nas camadas basais são empurradas para a superfície. À medida que as células se movem nessa direção, acumulam queratina, proteína fibrosa maleável responsável pela impermeabilidade cutânea. Ao mesmo tempo, o citoplasma, o núcleo e outras organelas desaparecem, e as células morrem. Eventualmente, as células queratinizadas descamam e são substituídas pelas células subjacentes que, por sua vez, tornam-se queratinizadas (TORTORA; GRABOWSKI, 2002; SILVERTHORN, 2010).

Os corneócitos encontram-se empilhados em 18-20 camadas dependendo da localização anatômica no corpo, unidos por corneodesmossomos, por lipídeos, por enzimas lipolíticas e proteolíticas, e por conteúdos secretados pelos corpos lamelares (MENON, CLEARY, LANE, 2012). Cerca de 5-15% da constituição do EC é de lipídeo (incluindo fosfolipídios, glicofosfolípideos e colesterol) e 75-85% de proteína, principalmente a queratina (PATHAN; SETTY, 2009). De forma simplificada, sua organização estrutural é semelhante a uma “parede de tijolos e argamassa”, modelo *brick and mortar* proposto por Michaels e colaboradores (1975), onde os corneócitos compreendem os tijolos, e os lipídios epidérmicos que preenchem o espaço entre as células mortas são a argamassa ou cimento, conforme ilustrado na figura 3 (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012).

Figura 3. Representação esquemática do estrato córneo de acordo com o modelo *brick and mortar*.



Fonte: Adaptado de YUAN, 2009.

Os lipídios estão dispostos em bicamadas ordenadas, e essas bicamadas estruturadas conferem um elevado grau de impermeabilidade da pele à água e a outros agentes de penetração (HADGRAFT, 2001). Portanto, o estrato córneo atua essencialmente como uma barreira hidrofóbica (LANGER, 2004; PRAUSNITZ; MITRAGOTRI; LANGER, 2004). Graças a essa função de barreira, o EC atua prevenindo a perda de água transepidérmica (MARKS, 2004) e mantendo um nível de hidratação adequado. Os dois principais

componentes que permitem que o EC desempenhe este papel são os lipídios extracelulares e o Fator de Hidratação Natural, localizado intracelularmente (JOHNSON, 2004; RAWLINGS; HARDING, 2004).

Graças a sua complexa composição, o EC é visto como um desafio no transporte transdérmico de fármacos (MENON; CLEARY; LANE, 2012), podendo em determinadas situações atuar como um reservatório para formulações aplicadas na pele (FOLDVARI, 2000; STORPIRTIS et al., 2009).

A epiderme viável é formada por células em constante atividade proliferativa, dividida em camadas ou estratos: camada lúcida, camada granulosa, camada espinhosa e camada basal ou germinativa. Em movimento ascendente de diferenciação da camada basal, as células metabolicamente ativas se alteram, de forma ordenada, originando os corneócitos que se dispõem no EC (STORPIRTIS et al., 2009). O tempo de renovação epidérmica, desde a divisão celular na camada basal até a passagem dos corneócitos pelo EC pode ser estimado em 59 a 75 dias (HARRIS, 2009).

Abaixo da epiderme, fica a principal massa de pele, a derme, um tecido forte, maleável, com propriedades viscoelásticas, e que consiste em um tecido conjuntivo frouxo composto de proteínas fibrosas (colágeno e elastina) embebidas em substância basal amorfa (GOLDMAN; BENNETT, 2001). Na derme situam-se algumas fibras elásticas e reticulares, bem como muitas fibras colágenas, sendo suprida por vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos. Também contém glândulas especializadas e órgãos do sentido (GUIRRO; GUIRRO, 2004). Tem espessura variável ao longo do organismo, desde 1 mm até 4 mm, e compõe-se de três porções: a derme papilar, a perianexial e a reticular (SAMPAIO; RIVITI, 2008).

A derme papilar ou superficial é mais delgada e preenche as concavidades entre as cristas epidérmicas, dando origem as papilas ou cristas dérmicas. Constituída de tecido conjuntivo frouxo, é formada por feixes delicados de fibras colágenas, reticulares e elásticas, dispostas em uma rede frouxa (CUCÉ; NETO, 2001). A derme perianexial é estruturalmente idêntica à papilar, dispondo-se, porém, em torno dos anexos (SAMPAIO; RIVITI, 2008). A derme reticular ou profunda é a mais espessa, constituída por tecido conjuntivo denso, e é assim denominada devido ao fato de que os feixes de fibras colágenas que a compõem entrelaçam-se em um arranjo semelhante a uma rede (GUIRRO; GUIRRO, 2004). Como todo tecido conjuntivo, a derme contém muitos tipos diferentes de células incluindo fibroblasto e

fibrócitos, macrófagos teciduais, mastócitos e leucócitos sanguíneos, particularmente neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos e plasmócitos (CUCÉ; NETO, 2001).

A derme está conectada com a fáscia dos músculos subjacentes por uma camada de tecido conjuntivo frouxo e tecido adiposo, a hipoderme. Quando desenvolvida, esta camada forma o panículo adiposo, responsável pela modelagem corporal. Além disso, o tecido adiposo confere ainda isolamento térmico e proteção mecânica (LIRA, 2007; TOSATO, 2010).

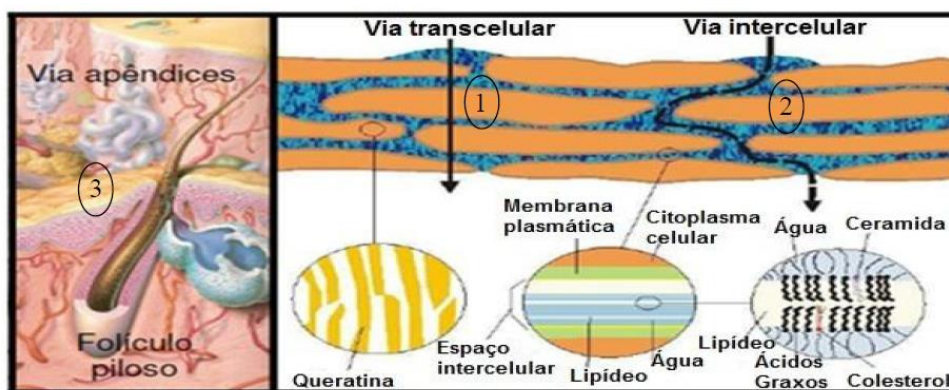
### 3.2 Penetração de fármacos através da pele

Apesar da natureza quase impermeável da pele, conferida especialmente pelo EC, algumas substâncias são capazes de penetrá-la. Dessa forma, a pele torna-se uma potencial via de administração de fármacos (HADGRAFT, 2001; DEGIM, 2006).

O EC frequentemente controla processos de absorção percutânea, sendo uma etapa limitante na velocidade de difusão de fármacos (GEINOZ et al., 2002; STORPIRTIS et al., 2009). Uma demonstração disso ocorre quando a última camada da pele é removida (*stripped*) com fita adesiva, acarretando em um aumento na permeabilidade à água e outros componentes (ASBILL; MICHNIAK, 2000).

Potencialmente, há três percursos possíveis para a penetração de fármacos na pele, as vias: transcelular (através dos corneócitos), intercelular (ao redor dos corneócitos), e transexal (através dos apêndices cutâneos) (Figura 4) (HADGRAFT, 2001; STORPIRTIS et al., 2009).

Figura 4. Representação esquemática das possíveis rotas de penetração de fármacos através da pele.



1 – Via transcelular, 2 – Via intercelular e 3 – Via apêndices.

Fonte: Adaptado de GRATIERI; GELFUSO; LOPEZ, 2008.

Sabe-se que em circunstâncias normais, a via intercelular é a predominante, considerando a espessura da pele, e consiste em um caminho tortuoso ao redor dos corneócitos envolvidos por bicamadas lipídicas intercelulares (SIMONETTI et al., 1995; HADGRAFT, 2001; STORPIRTIS et al., 2009). A rota transcelular é possível para pequenas substâncias hidrofílicas como a água (GRAMS; BOUWSTRA, 2005). A penetração transanexal foi, no passado, pouco considerada no processo de absorção percutânea, uma vez que os apêndices cutâneos ocupam uma baixa fração de área da pele, aproximadamente 0,1% da superfície total (WILLIAMS; BARRY, 2004). A contribuição dos apêndices foi considerada como uma difusão *shunt* (desvio), enquanto que a principal difusão *bulk* ocorre através do EC (SCHAEFER; ZESCH; STÜTTGEN, 1982). No entanto, esta via pode ser relevante para os esteroides polares que mostram uma baixa difusão através do EC (SCHEUPLEIN, 1967; PELLANDA, 2006).

São vários os fatores que influenciam a eficiência da pele como barreira à penetração de substâncias exógenas. Tais fatores podem ser de ordem biológica (integridade da pele, idade, diferenças raciais, fluxo sanguíneo, metabolismo) e de natureza físico-química (hidratação, temperatura e pH da pele). Podem ser fatores relacionados às características dos permeantes (forma e tamanho molecular, coeficientes de difusão e partição ou até mesmo a concentração aplicada). E por fim, os fatores relacionados à própria formulação, que podem afetar a entrada do fármaco na pele de tal maneira, que, na ausência da formulação adequada, o fármaco dificilmente conseguiria penetrar as camadas mais profundas da pele e atingir concentrações adequadas no sítio de ação (AULTON, 2005; NAIK; KALIA; GUY, 2000).

Após a aplicação de um medicamento sobre a pele, o fármaco aplicado pode difundir lateralmente na superfície do EC, ao longo do plano horizontal das bicamadas lipídicas dentro do EC, assim como ser transportado de uma bicamada para uma bicamada paralela através de canais lipídicos adjacentes entre os corneócitos (GEE et al., 2012). A difusão lateral pode, portanto, aumentar a área de exposição da pele ao fármaco, o que é relatado na literatura como sendo de crucial importância na avaliação do comportamento de distribuição das substâncias aplicadas topicamente (WEIGMANN et al., 1999; SCHICKSNUS; MULLER-GOYMANN, 2004). Do ponto de vista da segurança, a difusão lateral também tem potencial para aumentar o risco de transferência secundária de fármaco para terceiros, migrando para além do local de aplicação (GEE et al., 2014).

A difusão lateral parece ser dependente das propriedades físico-químicas do fármaco aplicado (GEE et al., 2012), mas também se sugere que a capacidade dos fármacos se

espalharem lateralmente e penetrarem através do EC é dependente de excipientes co-aplicados (GEE et al., 2014).

A massa de compostos transferida da superfície da pele para o interior do corpo através do EC é controlada por simples difusão passiva. Esta difusão pode ser explicada por meio de três etapas:

- 1) O fármaco difunde-se dentro da formulação (ou do veículo) para a superfície do EC;
- 2) Ocorre passagem do fármaco para o interior do EC, controlada pelo coeficiente de partição;
- 3) O fármaco difunde-se através do EC. Esta é provavelmente a etapa de maior importância nos estudos de permeação cutânea (PELLANDA, 2006; STORPIRTIS et al., 2009).

A difusão através da pele pode ser descrita pela primeira lei de Fick:

$$J = -D \frac{dc}{dx} = \frac{dm}{dt} \cdot \frac{1}{A}$$

(Equação 1)

Onde **J** é o fluxo no estado estacionário da massa do composto (**m**) através do EC por unidade de área (**A**) e por unidade de tempo (**t**) ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{s}$ ), **D** é o coeficiente de difusão do composto no EC ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ), **c** é a concentração do fármaco, e **x** é a posição (LEUENBERGER et al., 2001 *apud* PELLANDA, 2006). A solução da equação fornece:

$$J = \frac{K D}{h} \cdot \Delta c = k_p \cdot \Delta c$$

(Equação 2)

Onde **K** é o coeficiente de partição do composto entre veículo e o EC, **h** é o comprimento do percurso de difusão (cm), **k<sub>p</sub>** é o coeficiente de permeabilidade, e **Δc** é a diferença de concentração ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) através do EC entre a concentração aplicada e concentração abaixo do EC (*in vivo*) ou no meio receptor (*in vitro*) (HADGRAFT, 2001). Em circunstâncias normais, a concentração aplicada é muito maior do que a concentração em camadas mais profundas da pele, e **Δc** pode ser substituído por **C<sub>aplicada</sub>**. O real percurso de difusão (**h**) é uma via tortuosa ao longo dos lipídios intercelulares, que é mais longo do que a espessura do EC. No entanto, a espessura do EC é mais utilizada, uma vez que é facilmente mensurável (PELLANDA, 2006).

No entanto, a primeira Lei de Fick descreve o processo de difusão sob condições de estado estacionário, ou seja, quando o gradiente de concentração não varia com o tempo. Esta situação é aplicável apenas para membranas homogêneas, não sendo observável em membranas biológicas heterogêneas. Na determinação experimental da quantidade de fármaco permeada em função do tempo, observa-se que esta relação não é totalmente linear, como se esperaria na abordagem do estado estacionário. Na realidade, observa-se, nos tempos iniciais, uma pequena curvatura, onde não há constância do fluxo em relação ao tempo. Este tempo necessário para que a passagem de um fármaco, através de uma membrana, atinja o equilíbrio é definido como *lag time* ou tempo de latência, obtido através da extrapolação da linha do estado estacionário até o eixo do tempo. Desta forma, o processo de difusão em membranas biológicas pode ser mais bem explicado pela segunda Lei de Fick que expressa a velocidade de alteração da concentração do fármaco em função do tempo e da área, ou seja, duas variáveis importantes na determinação do coeficiente de difusão (NETZ; ORTEGA, 2002).

### **3.3 Biodisponibilidade Tópica**

#### **3.3.1 Conceito de Biodisponibilidade**

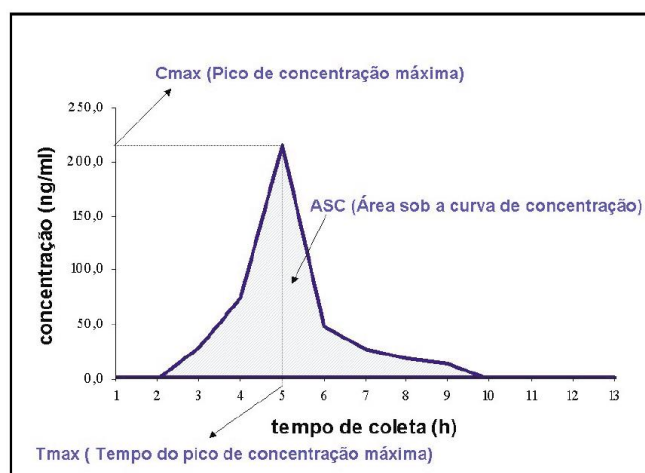
A ação terapêutica de um fármaco depende da existência de uma concentração efetiva no seu local de ação durante um determinado período de tempo. Quando a concentração do fármaco atinge o chamado equilíbrio farmacocinético, definido como o equilíbrio dinâmico onde a concentração plasmática é um reflexo quantitativo do que ocorre em todo o organismo, pode-se utilizar a concentração plasmática como uma medida indireta, porém preditiva da concentração do fármaco no sítio de ação (STORPIRTIS et al., 2011; BRASIL, 2002).

O termo biodisponibilidade (BD), *bioavailability*, do inglês, inserido na literatura científica em 1970, é uma contração de disponibilidade ou avaliação biológica. Conceitua-se BD como sendo a velocidade e a extensão na qual o fármaco contido em uma forma farmacêutica é absorvido e torna-se disponível no seu sítio de ação (BRASIL, 2002; CHOW; LIU, 2009).

A BD é determinada através da medida da concentração do princípio ativo do medicamento em sangue total, soro, plasma ou outro fluido biológico apropriado, em função do tempo. A partir da construção de uma curva de concentração *versus* tempo obtêm-se os principais parâmetros farmacocinéticos utilizados para a avaliação da BD (Figura 5), tais parâmetros são relacionados ao processo de absorção do fármaco a partir da forma farmacêutica administrada. São eles:

- O pico de concentração máxima do fármaco atingido experimentalmente ( $C_{\text{máx}}$ );
- O tempo no qual foi alcançada a concentração máxima ( $T_{\text{máx}}$ );
- A área sob a curva ( $ASC_{0-t}$ ) que revela a quantidade de fármaco absorvida ou exposição do fármaco no organismo (STORPIRTIS et al., 1999; BRASIL, 2002; BRASIL, 2006).

Figura 5. Ilustração gráfica da curva de concentração plasmática de um fármaco, destacando os principais parâmetros farmacocinéticos.



Fonte: BRASIL, 2002.

### 3.3.2 Biodisponibilidade sob a ótica dos produtos tópicos de ação local

Os medicamentos dermatológicos tópicos pertencem à classe de fármacos de ação local (SCHAEFER; ZESCH; STÜTTGEN, 1982). Neste caso, o local de ação farmacológica é a pele. O objetivo da aplicação tópica desses produtos é maximizar a concentração do fármaco no local de ação com, idealmente, uma captação sistêmica mínima, reduzindo, assim, os seus possíveis efeitos tóxicos (BORSADIA et al., 1992; HERKENNE et al., 2008; STORPIRTIS et al., 2009).

Essa captação sistêmica mínima explica-se em parte porque as doses tópicas tendem a ser tão pequenas que as concentrações no soro e/ou urina são frequentemente indetectáveis utilizando técnicas de ensaio convencionais (MARKS; DYKES, 1994; HERKENNE et al., 2008). Outro fator de complicação nesse contexto é a falta de conhecimento da concentração de fármaco necessária para realizar o efeito terapêutico no sítio alvo da pele (com exceção de agentes antifúngicos cujo local alvo é a superfície do EC) (BORSADIA et al., 1992; HERKENNE et al., 2008).

Diante disso o conceito clássico de BD, já citado no item anterior, aplicável para os fármacos de ação sistêmica, por exemplo, aqueles administrados pelas vias oral ou transdérmica, não reflete de forma apropriada a farmacocinética de ativos dermatológicos aplicados e direcionados para tratar desordens cutâneas locais (BORSADIA et al., 1992; HERKENNE et al., 2007).

Até que a relevância das concentrações sistêmicas comparativamente as do fármaco dentro, por exemplo, da epiderme viável, possa ser demonstrada, a avaliação da BD tópica deve envolver a quantificação no próprio tecido-alvo, isto é, em um ou mais componentes da pele adjacentes ao local de aplicação (MARKS; DYKES, 1992; HERKENNE et al., 2008). Embora a biópsia cutânea seja uma solução lógica para este desafio, a abordagem é invasiva e inaceitável para uso rotineiro, assim como a necessidade de realizar biópsias repetidas para caracterizar a farmacocinética, ou seja, concentração da droga em relação ao perfil temporal. Estratégias alternativas são limitadas. Por exemplo, a utilização da resposta farmacodinâmica de um fármaco, por exemplo, a vasoconstrição induzida por corticosteroides, é uma estratégia legítima, mas infelizmente limitada aos fármacos pertencentes a esta classe (HAIGH; KANFER, 1984; CHAN; LI WAN PO, 1992; SHAH, 1998).

A microdiálise cutânea é outra técnica que tem atraído um interesse significativo neste momento e pode ser utilizada *in vivo* em humanos (AULT et al., 1994, BENFELDT; SERUP; MENNE, 1999). No entanto, o método é relativamente exigente quanto ao aparato necessário e resulta em desafios significativos de química analítica quando a lipofilicidade do fármaco é alta e sua permeação na pele é lenta (uma combinação não incomum) (HERKENNE et al., 2007), além de ser uma técnica invasiva (NARKAR, 2010). A sucção de bolhas, microscopia confocal de varredura, espectroscopias Raman e infravermelho próximo também têm sido investigadas visando o estabelecimento da concentração do fármaco na pele em função do tempo (PELLANDA, 2006; STORPIRTIS et al., 2009; NARKAR, 2010).

Tem-se discutido que a camada córnea é a mais indicada para uma medida adequada e mensurável da BD tópica do fármaco, objetivando avaliar o perfil de concentração *versus* tempo do fármaco na pele (STORPIRTIS et al., 2009). De acordo com Shah e colaboradores (1998), esta abordagem vem sendo denominada dermatofarmacocinética, em inglês *dermatopharmacokinetic* (DPK).

### 3.4 Dermatofarmacocinética

A DPK é uma abordagem cinética baseada na terapia tópica que requer que o fármaco seja administrado na barreira limitante da velocidade de difusão da pele, o EC, para exercer a sua atividade farmacológica. O método utiliza o EC no lugar do sangue como matriz de amostragem, juntamente com um ensaio bioanalítico validado para quantificar o(s) fármaco(s) (SHAH et al., 1998). A DPK envolve a determinação da quantidade de fármaco presente no EC em função do tempo pós-aplicação e pós-remoção da formulação ensaiada, utilizando a metodologia de *tape-stripping* para coleta de amostra (HERKENNE et al., 2007).

A essência de uma técnica viável para a avaliação da DPK de um fármaco, segundo o FDA, envolve a avaliação de parâmetros clássicos, tais como a quantidade máxima de fármaco no EC ( $C_{\text{máx}}$ ), o momento em que esse nível máximo é atingido ( $T_{\text{máx}}$ ) e a área sob a curva referente ao perfil do fármaco no EC em função do tempo (ASC). Ao contrário do que se observa com a administração oral de fármaco,  $C_{\text{máx}}$ ,  $T_{\text{máx}}$  e ASC no EC não são apenas dependentes da cinética de absorção, são também influenciados de forma importante pelo tempo em que a aplicação do fármaco é interrompida pela remoção de qualquer formulação restante na superfície da pele, tempo este determinado pelo pesquisador. Uma vez que a absorção percutânea é frequentemente um processo lento, é bastante concebível, e usualmente o caso, que o produto aplicado seja removido (deliberadamente ou inadvertidamente) antes da fase de absorção ser completa (NICOLI et al., 2009).

Ao contrário dos estudos de concentração sanguínea, nos quais podem ser obtidas amostras múltiplas após administração oral do fármaco, apenas uma amostra de pele pode ser obtida a partir de um local após aplicação tópica do fármaco. Para obter as amostras múltiplas necessárias para definir um perfil de curva concentração no EC *versus* tempo, um estudo de DPK requer a aplicação em múltiplos locais em cada indivíduo. Cada local produz uma concentração única de fármaco no EC (SHAH; HOWARD; MAIBACH, 2014).

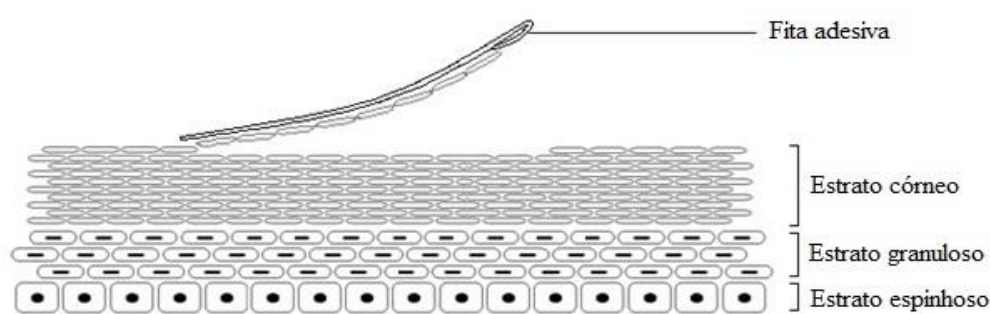
Sob o ponto de vista regulamentar, em 1998 a agência americana, *Food and Drug Administration* (FDA), publicou um projeto de guia relativo à avaliação da BD em produtos dermatológicos tópicos com base no procedimento de *stripping* na pele. Em 2002, o FDA retirou este documento e planejou explorar possíveis melhorias nos métodos atuais além de desenvolver novos métodos para avaliar a bioequivalência de medicamentos dermatológicos tópicos (FDA, 2002; BOIX-MONTANES; 2011).

Não obstante, a DPK tem demonstrado reprodutibilidade na coleta de EC, e sua aplicação a antifúngicos, antibacterianos, e produtos corticosteroides dermatológicos utilizando a face anterior do antebraço humano (PERSHING et al, 2003). Trata-se, portanto, de uma abordagem alternativa aos custosos estudos de bioequivalência utilizando parâmetros clínicos e pode ser aplicável a uma variedade de classes terapêuticas de produtos dermatológicos tópicos. No entanto, a aceitabilidade desta abordagem ainda é dificultada em virtude de questões metodológicas o que a tem tornado alvo frequente de investigação e otimização pela comunidade científica (BOIX-MONTANES; 2011; YACOBI et al., 2014).

### 3.4.1 *Tape-stripping*

A técnica de *tape-stripping* envolve a remoção sequencial de camadas microscópicas (tipicamente 0,5 – 1 mm) de EC, conforme ilustrado na figura 6. Geralmente, é realizada colocando uma fita adesiva na superfície da pele, seguida por uma pressão suave para assegurar um bom contato e subsequentemente remoção por um movimento ascendente agudo. O procedimento é relativamente indolor e não invasivo, dado que apenas as células mortas (corneócitos) incorporadas na sua matriz lipídica são removidas. Mesmo que a remoção das fitas cause injúria na pele, uma resposta de reparação homeostática na epiderme é rapidamente suscitada (MENON; FEINGOLD; ELIAS, 1998; HERKENNE et al., 2008), o que resulta no restabelecimento rápido da função barreira (DENDA et al., 1996).

Figura 6. Ilustração do processo de *tape-stripping*.



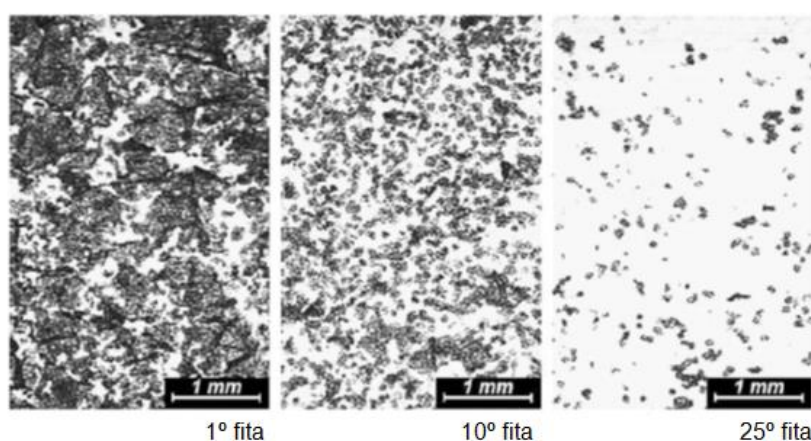
Fonte: Adaptado de AU; SKINNER; KANFER, 2010.

A técnica de *tape-stripping* foi introduzida no início dos anos 40 por Wolf. Ele investigou a topografia da pele removendo camadas de corneócitos com fitas adesivas transparentes e examinando-as microscopicamente (WOLF, 1940 *apud* PELLANDA, 2006). Na década de 50, Pinkus aplicou a nova técnica para investigar o processo de regeneração epidérmica (PINKUS, 1951). Na década de 80, a metodologia foi padronizada por Dupuis e

colaboradores (1986), fazendo do *tape-stripping* um método amplamente utilizado em pesquisas dermatológicas para investigar de forma não invasiva a BD tópica e a penetração percutânea de substâncias aplicadas topicamente.

As fitas resultantes do procedimento de *tape-stripping* contêm quantidades de EC e quantidades da(s) substância(s) aplicada(s) topicamente que pode(m) ser quantificada(s) com um método analítico apropriado (por exemplo, CLAE, espectroscopia, etc.) (PELLANDA, 2006; LADEMANN et al., 2009). A distribuição típica dos corneócitos nas tiras de fita removidas de diferentes profundidades do EC é mostrada na figura 7. As primeiras fitas contêm quase uma camada completa de corneócitos. Com o aumento do número de fitas removidas, a presença dos corneócitos e seus agregados torna-se cada vez menor. As propriedades das formulações aplicadas topicamente têm uma forte influência na quantidade de EC removido em cada fita (LADEMANN et al., 2009).

Figura 7. Distribuição de corneócitos nas fitas removidas.



Fonte: Adaptado de LADEMANN et al., 2009.

Sabe-se que fármacos de uso tópico se distribuem primeiramente pelo EC e a partir dele, alcançam a epiderme e a derme. Por conseguinte, a concentração de fármaco presente no EC está diretamente relacionada com a concentração que se difunde para as demais camadas, de modo que a BD na pele pode ser estimada ao se medir a quantidade de fármaco presente no EC pela técnica de *tape-stripping* (SHAH, 1998).

Experimentos de *tape-stripping* são relativamente fáceis e simples de serem executados, no entanto, alguns parâmetros podem influenciar a quantidade de fármaco e EC removidos pela fita adesiva. Estes parâmetros incluem fatores intrínsecos como hidratação da

pele, coesão entre as células, região anatômica e diferenças interindividuais; e fatores extrínsecos, os quais abrangem a pressão com qual a fita é aplicada na pele, a duração da pressão e o processo de remoção da fita (ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2008). Verificou-se que na face anterior do antebraço, são necessárias cerca de 30 tiras de fita para retirar a maior parte da camada córnea (PINKUS, 1951). Tiras múltiplas removem uma barreira cutânea substancial, como evidenciado por aumentos de 20 a 25 vezes na perda de água transepidérmica (TEWL) (TSAI et al., 1991). Geralmente, a quantidade de EC removido por *tape-stripping* não é linearmente proporcional ao número de fitas removidas (PINKUS, 1951).

A metodologia de *tape-stripping* é utilizada em vários campos da biologia cutânea: por exemplo, para avaliar a função barreira (VAN DER WALK; MAIBACH, 1990), investigar dermatopatologias como distúrbios inflamatórios ou neoplásicos ou condições xeróticas (PIERARD-FRANCHIMONT; PIERARD, 1987), monitorar a expressão gênica (MARIONNET et al., 2003; OU-YANG et al., 2004), para avaliar a pele animal como um substituto para a pele humana (SEKKAT; KALIA; GUY, 2002), determinar a eficácia de protetores solares *ex vivo*, determinar perfis de penetração das substâncias aplicadas topicamente, e assim por diante (LADEMANN et al., 2009).

Basicamente, o *tape-stripping* como método de avaliação da penetração cutânea pode ser realizado de duas formas, *in vivo* ou *in vitro*. O método *in vitro* apresenta uma série de vantagens sobre o *in vivo*, pois podem ser utilizadas tanto pele humana quanto pele de outras espécies. Diversas replicatas podem ser avaliadas, diversas formas farmacêuticas podem ser estudadas e o impacto dos danos na pele pode ser ponderado evitando aspectos éticos. Uma das únicas limitações associadas à abordagem *in vitro* é que as condições *sink* ocasionadas pelo fluxo sanguíneo periférico na derme podem não ser totalmente reproduzidas. Entretanto, considerando que a permeação de substâncias através da pele é primariamente um processo passivo e que diversos estudos utilizando essa abordagem *in vitro* foram realizados, acredita-se que esse método seja bastante útil e difundido para o estudo de produtos de aplicação tópica (DIEMBECK et al., 1999; OECD, 2004).

Geralmente, em experimentos de permeação cutânea *in vitro*, utilizando-se células de difusão de Franz, têm-se um compartimento doador, uma membrana natural, que pode ser de pele humana retirada de cirurgia plástica (ALVES et al., 2007), pele humana de cadáveres (GOOSEN et al., 2002), pele de rato (MELO, 2016) ou pele de porco (ARAÚJO, 2016) e um compartimento receptor. As membranas naturais podem ser utilizadas, pois as propriedades de

permeabilidade da pele são mantidas após a excisão do corpo, visto que a principal barreira de difusão é o EC (DIEMBECK et al., 1999).

Com relação à escolha do tipo de membrana natural a ser utilizada em experimentos de *tape-stripping* com célula de difusão de Franz, a pele humana é a mais indicada para melhor predizer a penetração cutânea. Esta pele pode ser obtida através de cirurgias plásticas ou de cadáveres, contudo, muitas vezes, a disponibilidade é limitada e os aspectos éticos devem ser levados em consideração (SARTORELLI et al., 2000).

A pele animal difere da pele humana em algumas características, de modo que os resultados obtidos não podem ser correlacionados diretamente com a pele humana (SHAH et al., 1998). No entanto, a pele animal é mais fácil de ser adquirida e padronizada. A pele de porco é a mais recomendada por se assemelhar morfolologicamente à pele humana além da maior facilidade de aquisição (DIEMBECK et al., 1999; SEKKAT; KALIA; GUY, 2002). A pele animal pode ser utilizada tanto para avaliar a permeabilidade relativa de fármacos quanto para realizar comparações/correlações *in vitro* e *in vivo* (SARTORELLI et al., 2000).

A escolha do fluido receptor também influencia a penetração cutânea de fármacos e tem como objetivo, mimetizar a circulação sanguínea *in vivo*. Como principal exigência, o fármaco deve ser suficientemente solúvel na solução receptora para garantir condições *sink*, sem permitir que a solubilidade limite a difusão (SARTORELLI et al., 2000; OECD, 2004).

Diversos estudos que utilizam a técnica de *tape-stripping* para avaliação da penetração cutânea de fármacos *in vitro*, utilizando pele humana e pele de porco, bem como a comparação da penetração entre modelos *in vivo* e *in vitro*, têm sido relatados na literatura (BETTONI, 2009). Herkenne e colaboradores (2006) investigaram a possibilidade de substituir a pele humana na avaliação da BD de produtos tópicos em estudos de bioequivalência por pele de orelha de porco, de modo que experimentos *in vitro* utilizando a pele de porco foram comparados com estudos *in vivo* em voluntários humanos. No estudo foi possível concluir que a pele de porco utilizada *in vitro* é uma ferramenta promissora para avaliação e otimização de formulações de uso tópico. Leal e colaboradores (2017) obtiveram resultados semelhantes de correlação *in vitro/in vivo* utilizando formulações tópicas contendo econazol e a valerato de betametasona (LEAL et al., 2017).

### 3.5 Bioequivalência de produtos tópicos

Um estudo comparativo de BD refere-se à comparação de BDs de diferentes formulações contendo o mesmo fármaco. Quando dois medicamentos são comprovados bioequivalentes, assume-se que eles vão alcançar o mesmo efeito terapêutico, ou que são terapêuticamente equivalentes, tendo a mesma eficácia clínica e o mesmo potencial para gerar efeitos adversos e, por isso, podem ser intercambiáveis (CHOW; LIU, 2009).

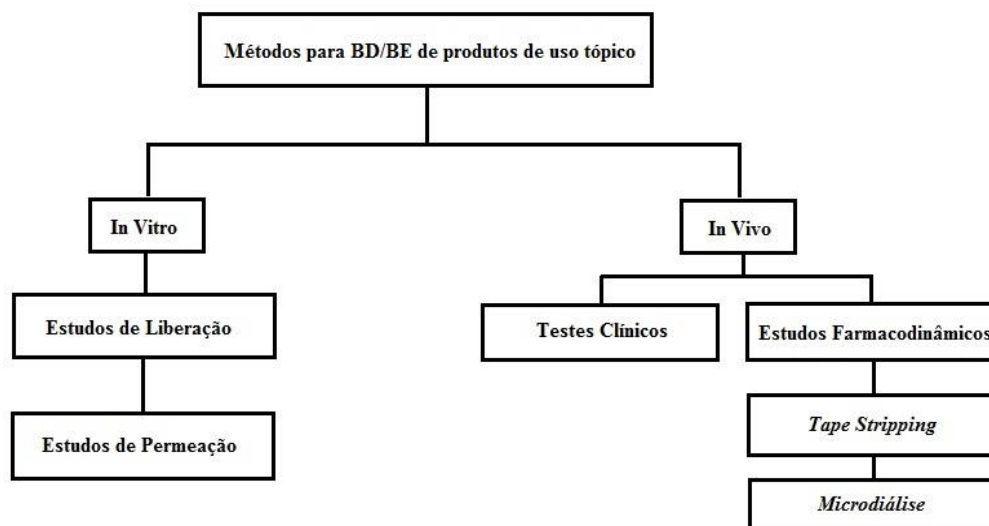
Medicamentos genéricos e similares são comparáveis a um referência, e geralmente são produzidos após a expiração ou renúncia da proteção patentária ou de outros direitos de exclusividade (BRASIL, 2014a; SOARES et al., 2015). Para um medicamento ser registrado como genérico ou similar, deve ser demonstrado o mesmo grau de eficácia, segurança e qualidade que o produto inovador. A comprovação da eficácia e segurança desses produtos é dada por meio dos estudos de equivalência farmacêutica e bioequivalência (BE) (BRASIL, 2014a).

A BE é documentada através da realização de diferentes tipos de estudos comparando um Teste (T) e um produto referência (R). Estes estudos são categorizados por ordem de preferência pelo FDA como:

- Estudos farmacocinéticos, nos quais o fármaco ou os seus metabólitos são medidos em um fluido biológico acessível;
- Estudos de efeitos farmacodinâmicos, nos quais uma ou mais medidas de efeito do fármaco são comparados entre o genérico e o produto referência;
- Ensaios clínicos comparativos;
- Estudos *in vitro* (SHAH; HOWARD; MAIBACH, 2014).

Os principais métodos disponíveis 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 DPK (ex.: *tape-stripping*) e a microdiálise dérmica (ARAÚJO, 2016), como é mostrado na figura 8.

Figura 8. Principais métodos para a determinação da BD/BE de produtos uso tópico. Os métodos em *itálico* ainda estão sob avaliação do FDA.



Fonte: Araújo, 2016.

No que diz respeito às abordagens *in vitro*, com utilização de células de Franz, propõe-se a utilização do método para a avaliação da cinética de liberação do(s) componente(s) ativo(s) a partir de formulações semissólidas. A inabilidade deste teste *in vitro* em se correlacionar com os resultados *in vivo* é devida a impossibilidade da obtenção de dados acerca da interação entre a formulação (incluindo os excipientes) e a pele, em particular, com o EC (FDA, 1998).

Embora, por si só o ensaio de liberação *in vitro*, "não seja um substituto para os testes de BD e BE", 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). Uma vez que, nos EUA, os ingredientes inativos numa formulação tópica genérica devem ser qualitativamente (Q1) os mesmos e essencialmente quantitativamente (Q2) semelhante ( $\pm 5\%$ ) em comparação com o produto inovador (SHAH; HOWARD; MAIBACH, 2014).

Atualmente, estudos clínicos comparativos são utilizados para estabelecer a BE para a maioria das formulações tópicas, com exceção dos corticosteroides, onde uma abordagem farmacodinâmica *in vivo* desenvolvida pela FDA em 1995 tornou-se disponível (SHAH;

HOWARD; MAIBACH, 2014). Os ensaios clínicos são geralmente caros, tem baixa sensibilidade e consomem muito tempo, é necessária ainda uma grande população de doentes nesses ensaios. No entanto, os ensaios clínicos são considerados "padrão ouro" (SHAH, 2001).

Neste contexto, a caracterização em voluntários saudáveis da penetração tópica de fármacos pela DPK tem resultado, em alguns casos, como uma opção promissora para substituir os ensaios clínicos comparativos (N'DRI-STEMPFER et al., 2009; LEAL et al., 2017). No entanto, uma das críticas à utilização da metodologia de DPK na avaliação da BE tem sido a sua relevância para a segurança/eficácia clínica (PERSHING et al., 2003).

Ao longo do último quarto de século vários *workshops* internacionais foram realizados para discutir as metodologias para avaliar BE de produtos tópicos dermatológicos. A intensidade desses diálogos sem resolução clara reflete o desafio geral de documentar BE para formulações tópicas dermatológicas (SHAH; HOWARD; MAIBACH, 2014).

Até o momento, os únicos métodos aceitos pelo FDA para avaliar a BD/BE de produtos tópicos são ensaios clínicos e farmacodinâmicos. A técnica de *tape-stripping* (DPK) é aceita em determinadas circunstâncias no Japão e África do Sul. Em outros países, inclusive no Brasil, quase não há requisitos específicos (BRADDY et al., 2015; ARAÚJO, 2016).

De acordo com a legislação sanitária brasileira vigente, “os medicamentos de aplicação tópica, não destinados a efeitos sistêmicos, que contenham o mesmo fármaco, na mesma concentração em relação ao medicamento de referência (equivalentes farmacêuticos) e excipientes de mesma função que aqueles presentes no medicamento comparador” são bioisentos pela RDC 37/2011 (BRASIL, 2011). Ou seja, a comprovação da BE para estes produtos não é obrigatória, sendo assim, o estudo de equivalência farmacêutica é o único comparativo exigido para registro das formulações tópicas genéricas no Brasil. No entanto, tal estudo avalia apenas os parâmetros físico-químicos e microbiológicos estabelecidos em farmacopeias, preferencialmente a brasileira. Muitas vezes, os testes realizados se resumem a determinação de aspecto, teor, identificação, peso médio, pH, viscosidade e densidade (BRASIL, 2010), de modo que nem a liberação do fármaco a partir da formulação, nem sua permeabilidade cutânea, são avaliadas no momento do registro (BRASIL, 2014b; SOARES et al., 2015; BRASIL, 2016).

Considerando que, no Brasil, os excipientes presentes nos medicamentos cópia podem diferir qualitativamente e quantitativamente do que serve de referência, existem no mercado

brasileiro produtos considerados genéricos e similares com variações na sua composição. Estas variações, somadas ao fato de os medicamentos de aplicação tópica serem bioisentos pela RDC 37/2011, agravam a dúvida sobre a igualdade da eficácia dessas formulações (SOARES et al., 2015).

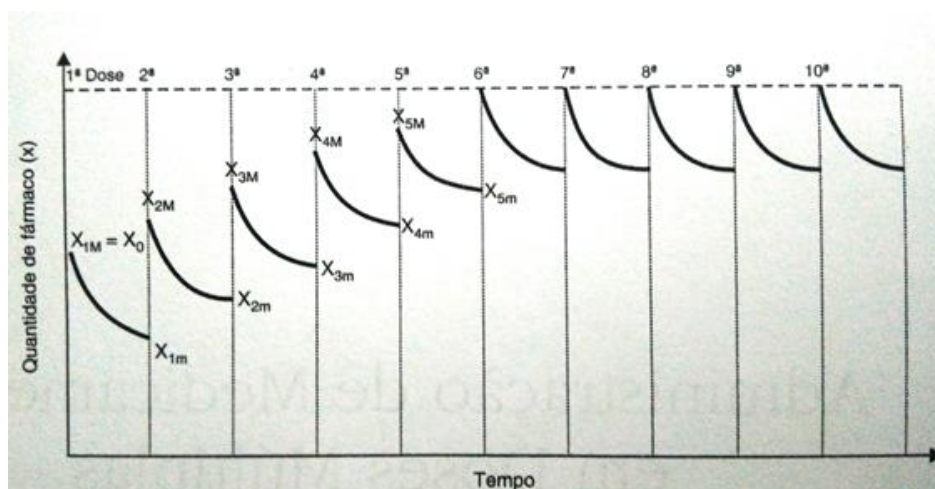
### 3.5.1 *Design de estudos de BE em dose múltipla*

A administração de medicamentos em dose múltipla pode ser considerada a modalidade mais frequentemente empregada na terapêutica farmacológica, seja para o tratamento de uma condição clínica aguda (anti-inflamatórios ou antibióticos, por exemplo, que são administrados por determinado período de tempo), ou para a terapia de pacientes que apresentam enfermidades crônicas. Para essas situações é fundamental a manutenção de concentrações plasmáticas dentro da faixa ou margem terapêutica (STORPIRTIS et al., 2011).

O estabelecimento do esquema terapêutico normalmente tem como base as informações constantes na bula do medicamento, que são derivadas dos ensaios clínicos multicêntricos (fases II e III), por meio dos quais a indústria farmacêutica responsável pelo desenvolvimento comprovou sua eficácia clínica e segurança por ocasião do registro sanitário (ALLEN Jr; POPOVICH; ANSEL, 2007).

Ao administrar doses idênticas a intervalos regulares, o fármaco é introduzido no organismo a uma velocidade constante. Esse tipo de administração resulta na flutuação das concentrações, que deve ocorrer dentro da margem terapêutica estabelecida para o fármaco, até o alcance do estado de equilíbrio (*steady-state*), ilustrado na figura 9. Nesse estágio a quantidade que entra no organismo pela administração da dose se iguala àquela que é eliminada (STORPIRTIS et al., 2011).

Figura 9. Representação das quantidades máximas ( $X_M$ ) e mínimas ( $X_m$ ) de fármaco no organismo após administração de várias doses;  $X_0$  = dose administrada.



Fonte: STORPIRTIS et al., 2011.

O guia do FDA (2014) que trata dos ensaios de BD e BE de produtos orais recomenda a realização de estudos de farmacocinética de dose única, pois eles são geralmente mais sensíveis do que os estudos de estado de equilíbrio na avaliação da taxa e extensão da liberação do fármaco para a circulação sistêmica. Ainda segundo o FDA, estudos de BE de doses múltiplas podem ser necessários quando:

- Há uma diferença na taxa de absorção, mas não na extensão da absorção;
- Existe alta variabilidade interindividual;
- A concentração do ingrediente ativo ou fração terapêutica, ou dos seus metabólitos, no sangue resultante de uma dose única é demasiado baixa para a determinação exata pelo método analítico;
- O produto farmacêutico é uma forma de dosagem de liberação prolongada (FDA, 2014).

Na legislação brasileira, os estudos de doses múltiplas também não são, geralmente, recomendados, uma vez que estudos de dose única são mais sensíveis a diferenças entre as formulações. Entretanto, os estudos de dose múltipla podem ser utilizados nos casos em que, reconhecidamente, os mesmos reduzam a variabilidade interindividual no processo de absorção do fármaco (BRASIL, 2006).

Sob o ponto de vista da BE tópica de produtos, não há relatos na literatura sobre orientação ou a realização propriamente dita de estudos que adotem um regime de dose múltipla. Todavia a BD sistêmica de produtos dermatológicos tópicos após dose múltipla já

foi relatada por Kienzler et al. (2010) e Brunner et al. (2011) utilizando uma formulação tópica de diclofenaco; Jarratt et al. (2013), utilizando o retinoide tazarotene; e por Gropper et al. (2014), utilizando um creme a 1% de ozenoxacina. Todos utilizaram o sangue como matriz de amostragem sendo que o estudo de Brunner et al. (2011) também realizou experimentos de microdiálise subcutânea. Os estudos Kienzler et al. (2010) e Brunner et al. (2011) utilizaram indivíduos saudáveis, enquanto os demais utilizaram indivíduos doentes em seus estudos clínicos.

O estabelecimento da BD tópica propriamente dita só apresentou um único relato na literatura investigada. O estudo foi realizado por Pellanda e colaboradores (2006), que avaliou o efeito da dose e da aplicação múltipla na biodisponibilidade tópica da triancinolona acetona em indivíduos adultos saudáveis, utilizando a DPK através da realização de *tape-stripping*. Diante dessa lacuna na literatura, a realização de estudos envolvendo BD/BE tópica após dose múltipla mostra-se importante a fim de corroborar com o que já é preconizado para produtos orais ou propor novas orientações voltadas às peculiaridades dos produtos dermatológicos de aplicação tópica.

### 3.6 Metronidazol

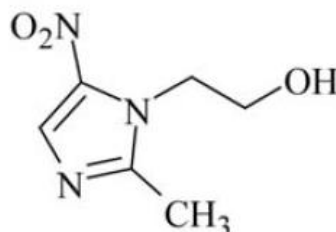
O metronidazol (2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-etanol) é um fármaco sintético derivado do nitroimidazol que possui amplo espectro contra protozoários e bactérias anaeróbias Gram-positivas e Gram-negativas. É clinicamente eficaz na tricomoníase, na amebíase e na giardíase, bem como em várias infecções causadas por bactérias anaeróbias obrigatórias, incluindo *Bacteroides*, *Clostridium* e espécies de *Helicobacter* (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012).

O isolamento do antibiótico azomicina (2-nitroimidazol) a partir de um estreptomiceto por Maeda e colaboradores em 1953 e a posterior demonstração de suas propriedades tricomonocidas levou à síntese química e ao teste biológico de muitos nitroimidazóis (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012). O metronidazol (MTZ) foi sintetizado pela primeira vez em 1957, quando pesquisadores do laboratório Rhône-Poulenc na França tentavam obter a azomicina (FREEMAN; KLUTMAN; LAMP, 1997).

Do ponto de vista químico, o MTZ possui fórmula molecular  $C_6H_9N_3O_3$ , apresenta-se macroscopicamente como um pó cristalino, branco ou levemente amarelado, com faixa de fusão 159°C a 163°C (BRASIL, 2010). O fármaco pertence à classe I do sistema de

classificação biofarmacêutica (SCB), ou seja, apresenta alta permeabilidade através de membranas biológicas e alta solubilidade em água (ISSA, 2011). A estrutura química do metronidazol está ilustrada na figura abaixo:

Figura 10. Estrutura química do metronidazol.



Fonte: Farmacopeia Brasileira, 2010.

O MTZ embora, originalmente introduzido na terapia humana para o tratamento de tricomoniase, 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). Comercialmente, o fármaco encontra-se disponível no Brasil em especialidades farmacêuticas de uso oral (comprimidos revestidos), intravenosa, vaginal (gel e creme) e tópica (gel), associado ou não a outros compostos (MELO, 2016).

O MTZ veiculado em gel para aplicação tópica tem sido utilizado para o tratamento de rosácea há mais de 30 anos (ZIP, 2006). 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; POWELL, 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, reatividade vascular anormal e respostas imunes a microrganismos tais como *Demodex folliculorum* e *Helicobacter pylori*. Como resultado da limitada compreensão da fisiopatologia multifatorial da doença, as opções de tratamento não têm como alvo os mecanismos patogênicos e por isso não são curativos (BARCO; ALOMAR, 2008; FULLER; MARTIN, 2012; TAN & BERG, 2013; RAGHALLAIGH; POWELL, 2015).

A eficácia clínica do MTZ no tratamento da rosácea tem sido atribuída à sua capacidade de reduzir a geração de oxigênio reativo e inativar a sua produção. Ao ser

comparado 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 nas formulações de creme e gel disponíveis em duas concentrações (0,75% e 1%) mostrou-se igualmente eficaz 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 (LOWE, 2003; BARCO; ALOMAR, 2008; TWO et al., 2015).

### 3.6.1 Aspectos farmacocinéticos

O MTZ é um pró-fármaco que necessita da ativação do seu grupo nitro para exercer seu efeito sob os patógenos suscetíveis (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012). Quando administrado oralmente é completamente absorvido, atingindo pico de concentração plasmática em 1-3 horas, com meia-vida de cerca de 7 horas. O fármaco é distribuído rapidamente pelos tecidos, atingido altas concentrações nos líquidos corporais, incluindo o líquido cefalorraquidiano. Uma parte é metabolizada, porém a maior parte é eliminada na urina (RANG et al., 2007).

No que tange à aplicação do MTZ por 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 MTZ aumenta quando administrado em formulações com um elevado teor de água. Neste estudo, a penetração cutânea de MTZ era significativamente maior quando administrado em formulações de gel a 0,75% do que em um creme a 1% (WAGNER et al., 1998).

### 3.6.2 Aspectos farmacodinâmicos

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 à morte celular (EDWARDS, 1993; JOHNSON; HOOPER; THORNER, 2010).

O mecanismo pelo qual o MTZ 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).

### 3.6.3 Efeitos adversos

O fármaco deixa sabor metálico e amargo na boca, porém causa poucos efeitos adversos, em doses terapêuticas. Foram relatados distúrbios gastrintestinais menores, bem como sintomas do sistema nervoso central (tonturas, cefaleia, neuropatias sensitivas). O fármaco interfere com o metabolismo do álcool, e o uso concomitante desta substância deve ser estritamente evitado. O MTZ é contraindicado durante a gravidez (RANG et al., 2007).

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 MTZ absorvidas sistemicamente após aplicação tópica são insignificantes, o que evita possíveis reações associadas ao uso do MTZ por via oral a longo prazo. Além disso, interações medicamentosas são improváveis (MCCLELLAN; NOBLE, 2000).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2 Material

#### 4.2.1 Amostras

Foram utilizadas especialidades farmacêuticas do gel tópico de metronidazol 0,75%, Rozex® - Galderma, adquiridas em drogaria (lote: 5079128, validade 09/2018). Dois géis magistrais de metronidazol 0,75% manipulados em laboratório de pesquisa também foram utilizados para investigação da bioequivalência.

#### 4.2.2 Padrões

O metronidazol 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.

Para as análises realizadas em LC-MS/MS utilizou-se o metronidazol deuterado (MED-UMR S 1070) como padrão interno, doado pela Universidade de Poitiers – França.

#### 4.2.3 Matérias-primas, reagentes e materiais

- O metronidazol foi cedido pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE). Lote nº16754;
- Propilenoglicol proveniente de diferentes fornecedores;
- Carbomer 940 (Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda);
- EDTA dissódico (Fagron do Brasil Farmacêutica LTDA);
- Parabenos (metil e propil) (Fagron do Brasil Farmacêutica LTDA);
- Fosfato de sódio monobásico (Fagron do Brasil Farmacêutica LTDA);
- Ácido fórmico (Vetec Química, Sigma-Aldrich Brasil);
- Hidróxido de sódio proveniente de diferentes fornecedores;
- N,N-dimetilformamida (Moderb®);
- Água purificada obtida por destilação seguida de deionização (Milli-Q® Merck Millipore Ltd.);
- Fita adesiva (Scotch Book Tape, 3M, St. Paul, MN, USA);
- Frascos de borosilicato (Clear Sep Cap Vials, 12 x 32mm, National Scientific Company);
- Inserts flat bottom - 300 µL (Allcrom);
- Membrana filtrante de nitrocelulose, 0,45µm (Merck Millipore Ltd.);
- Seringa para insulina 1mL (Saldama Rodrigues Ltda. SR®);

- Filtro de seringa, 0,45µm (Merck Millipore Ltd.);
- Sache de álcool isopropílico 70% (Biosoma<sup>®</sup>).

Todos os demais solventes e reagentes utilizados nas análises foram de grau analítico.

#### 4.2.4 Equipamentos

- Balança analítica AX 200 (Shimadzu<sup>®</sup>);
- Chapa magnética com aquecimento (Fisatom<sup>®</sup>);
- Agitador mecânico modelo 752A (Fisatom<sup>®</sup>);
- Agitador tipo vortex (Fisatom<sup>®</sup>);
- pHmetro digital modelo pH 21 (Hanna Instruments<sup>®</sup>);
- Viscosímetro rotacional (Rheology International);
- Banho Dubnoff microprocessado Q226M2 (Quimis<sup>®</sup>);
- Banho Ultrassom (Quimis<sup>®</sup>);
- Evaporímetro Tewameter<sup>®</sup> TM 300 (Courage-Khazaka, Cologne, Alemanha);
- Dermatometro (Zimmerair dermatome, Dover, Delaware);
- Coluna Shim-pack C18 150 x 4,60 mm (Shimadzu<sup>®</sup>);
- Coluna C18 125 x 4,60 mm 5 µm (Ace<sup>®</sup>);
- Pré-coluna Gemini C18 4 x 3 mm (Phenomenex<sup>®</sup>);
- Sistema automatizado de células de difusão de Franz Vision<sup>®</sup> Microette TM (Hanson);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu<sup>®</sup> equipado com detector ultravioleta (UV);
- Espectrômetro de massas SCIEX API 3200 LC/MS/MS System (Applied Biosystems, Foster).

### 4.3 Controle de qualidade das formulações

As formulações utilizadas no presente estudo consistiram na formulação tópica com 0,75% de metronidazol disponível comercialmente no Brasil, Rozex<sup>®</sup> (produto C), e duas formulações desenvolvidas por Araújo (2016), produtos A e B. Estes apresentam a mesma composição qualitativa do produto de referência, e variam entre si no percentual de agente gelificante, conforme exposto na tabela 1. Formulações placebo foram preparadas contendo a mesma composição qualitativa e quantitativa dos produto teste 1 e 2.

Tabela 1. Composição das formulações denominadas de Produtos A e C (teste 1 e 2, respectivamente) e produto B (Rozex®).

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

x= percentual desconhecido utilizado no produto de referência.

Fonte: Araújo, 2016.

Os géis testes utilizados foram manipulados em laboratório conforme descrito por Araújo (2016). Para fins de controle de qualidade das formulações estudadas foram avaliadas as características organolépticas, pH, viscosidade e teor dos géis.

#### 4.3.1 Determinação do pH

O pH das formulações foi determinado através de pHmetro digital previamente calibrado com as soluções tampão pH 7,0 e pH 4,0, à temperatura ambiente.

#### 4.3.2 Avaliação da viscosidade

A viscosidade dos géis foi determinada em viscosímetro rotacional. Para isto, adicionou-se a amostra a ser analisada no recipiente coletor do aparelho, até a marca desejada; programou-se o aparelho, utilizando o *spindle* de número 7 e uma rotação de 30 rpm; imergiu-se o *spindle* na amostra a ser analisada; o aparelho foi acionado e, após estabilização do valor apresentado no *display* do aparelho, o valor gerado foi anotado.

#### 4.3.3 Determinação do teor de metronidazol

Para a análise do teor das formulações procedeu-se com a extração do metronidazol da malha do gel utilizando metodologia descrita por Bedor e colaboradores (2008). O metronidazol foi extraído a partir de 500 mg do gel com 5 mL de N,N-dimetilformamida e aquecimento durante 8 min a temperatura de 60 °C. Após o aquecimento as amostras foram

diluídas em metanol: água (1:1), filtradas e analisadas por método de cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (CLAE-UV) publicado por Melo e colaboradores (2016), cujas condições de análise estão expressas abaixo (Tabela 2).

Tabela 2. Condições cromatográficas do método utilizado para a quantificação do metronidazol por CLAE-UV.

| <b>Condições Cromatográficas (MELO et al., 2016)</b> |                                                                |
|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| <b>Coluna</b>                                        | Coluna Shim-pack C18 150 x 4,60 mm (Shimadzu®)                 |
| <b>Modo de eluição</b>                               | Isocrático                                                     |
| <b>Fase móvel</b>                                    | Fosfato de sódio monobásico 20 mM pH 3,0: acetonitrila (88:12) |
| <b>Fluxo</b>                                         | 1,0 mL/min                                                     |
| <b>Volume de injeção</b>                             | 20 µL                                                          |
| <b>Comprimento de onda</b>                           | 320nm                                                          |
| <b>Temperatura</b>                                   | 35°C                                                           |
| <b>Tempo de retenção</b>                             | 4,5 min.                                                       |

#### 4.4 Estudos de permeação cutânea e dermatofarmacocinética *in vitro*

##### 4.4.1 Preparo do meio receptor e obtenção da biomembrana

O meio receptor utilizado nos estudos de permeação consistiu em uma solução tampão de fosfato de sódio monobásico (20 mM) pH 7,4, cuja garantia da manutenção das condições *sink* foi comprovada em estudo anterior com o metronidazol realizado por Araújo (2016), acrescida de 0,02% de azida sódica como conservante.

A biomembrana utilizada nos estudos de permeação cutânea e DPK *in vitro* foi a pele da região dorsal do porco, obtida em abatedouro local (Paulista, Pernambuco/Brasil). Para garantir sua integridade, a pele foi removida pós-sacrifício antes que fosse exposta ao processo de limpeza habitual em alta temperatura. As peças de pele foram lavadas com água, e os pelos cortados com tesoura. Depois disso, a pele teve sua espessura padronizada em 750 µm utilizando dermatômetro. As biomembranas foram armazenadas a -20°C até o momento do uso. Antes da utilização, a pele foi mantida à temperatura durante 15 minutos para descongelar e posteriormente a função de barreira da pele foi verificada através da medição da perda de água transepidérmica (TEWL), realizada com o Tewameter®.

#### 4.4.2 Condições de realização do ensaio de permeação *in vitro*

As secções de pele suína foram dispostas nas células de Franz vertical (Vision® Microette TM), e mantidas assim com o auxílio de uma garra; a área de pele exposta foi de 1,77 cm<sup>2</sup>. Uma dose única de 100 mg de formulação tópica (teste 1, 2 e Rozex®) foi aplicada no compartimento doador. O lado dérmico da pele foi mantido em contato com o líquido receptor. O sistema foi mantido sob agitação magnética (300 rpm) e em banho circulante a 32 ± 1°C. As permeações tiveram duração de 48 horas, sendo realizadas sete coletas de 1mL de líquido receptor em cada experimento, nos seguintes tempos: 9, 12, 15, 18, 24, 30 e 48 hs. Um número de seis réplicas foi ensaiado para cada formulação.

As amostras de líquido receptor foram quantificadas através de CLAE-UV (método descrito no item 4.2.3.) e utilizadas nos cálculos da quantidade real permeada (equação 4).

$$Q_{real,t} = Ct \cdot Vr \sum Vc \cdot Cc \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:  $Q_{real,t}$  = quantidade real permeada em função do tempo t;

$C_t$  = concentração obtida referente ao tempo t;

$V_r$  = volume do líquido receptor;

$C_c$  = concentração da amostragem anterior;

$V_c$  = volume coletado.

Para a avaliação do modelo cinético de permeação do metronidazol, os resultados foram compilados em gráficos de dispersão xy, característicos de três modelos de cinética:

- Ordem zero: quantidade permeada por área (µg/cm<sup>2</sup>) versus tempo (h);
- Primeira ordem: log da quantidade permeada por área (µg/cm<sup>2</sup>) versus tempo (h);
- Higuchi: quantidade permeada por área (µg/cm<sup>2</sup>) versus raiz quadrada do tempo (h).

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.

#### 4.4.3 Procedimento do estudo de DPK (*tape-stripping*) *in vitro*

Após o término da permeação de 48 horas, a formulação residual foi removida das secções de pele com swabs contendo álcool isopropílico Biosoma® (procedimento realizado duas vezes). Imediatamente após, cada secção de pele foi delimitada por um molde (1,77 cm<sup>2</sup> em área) e foi realizado o procedimento de *tape-stripping*. O EC foi progressivamente obtido pela remoção sequencial das fitas após a aplicação de uma pressão constante. Trinta fitas foram utilizadas em cada secção de pele. Nenhuma das fitas foi descartada, assumindo que qualquer fármaco não removido da superfície da pele pelo processo de limpeza ao final do tratamento estaria eventualmente biodisponível.

As fitas passaram por um processo de extração, no qual as fitas 1 a 14 foram extraídas individualmente e as fitas 15-17, 18-20, 21-23, 24-26 e 27-30 foram agrupadas para a extração. A extração foi realizada colocando-se as fitas em frascos de borosilicato, adicionando 1,0 mL de acetonitrila em cada frasco, em seguida, as amostras permaneceram sob agitação por um período de 6 horas a 32°C.

A solução extraída foi então filtrada (filtro de 0,45µm), transferida para *vials* e encaminhada para análise em CLAE-UV, utilizando o método citado no item 4.3.3.

#### 4.4.4 Avaliação da retenção epidérmica e dérmica

Após a remoção do EC de cada secção de pele suína através do procedimento de *tape-stripping*, procedeu-se com a quantificação do metronidazol retido na região de epiderme viável e derme. Para isso, cada secção de pele foi triturada (com auxílio de tesoura) e individualmente extraída em frasco de borosilicato com 1,0 mL de acetonitrila, em seguida, as amostras permaneceram sob agitação por um período de 6 horas a 32°C.

A solução extraída foi então filtrada (filtro de 0,45µm), transferida para *vials* e encaminhada para análise em CLAE-UV, utilizando o método citado no item 4.3.3.

### 4.5 Procedimento do estudo de dermatofarmacocinética *in vivo* em participantes sadios

#### 4.5.1 Comitê de Ética e seleção dos participantes da pesquisa

O estudo foi realizado em conformidade com os princípios da Resolução nº 466 de 2012 do Conselho Nacional de Saúde, da Declaração de Helsinki e suas alterações (Associação Médica Mundial, 2008) e da Conferência Internacional sobre Harmonização Guia para Boas Práticas Clínicas (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 18-72 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 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 e ao cronograma do estudo; possuir 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 fossa antecubital.

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 ou evidente para o investigador; excesso de pigmentação, pelo, defeitos da pele, queimaduras solares, manchas ou tatuagens, que possam interferir com a avaliação do fármaco; grávida ou lactantes; obesos com  $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ; fumante e/ou ter consumido álcool nas 24 horas anteriores ao estudo com base em informações fornecidas pelo participante; participação em qualquer outro ensaio clínico ou estudo de cosmético; utilização simultânea de quaisquer medicamentos de uso tópico na área do local de teste, ter realizado exercício extenuante durante o período do estudo; planejar expor os antebraços à luz solar / UV na semana seguinte participação; incapacidade de atender a todos os pontos de tempo de coleta de dados; qualquer reação adversa prévia ou hipersensibilidade ao fármaco em estudo ou aos outros excipientes das formulações testadas ou às fitas adesivas utilizadas durante o ensaio; por último, os participantes foram instruídos a abster-se de tomar qualquer medicação 30 dias antes e durante o período do estudo (com exceção do uso de contraceptivos nas participantes do sexo feminino).

#### 4.5.2 *Determinação do fototipo de pele e tolerabilidade*

Para a determinação do fototipo de pele dos participantes da pesquisa utilizou-se a escala de Fitzpatrick (SACHDEVA, 2009).

A tolerabilidade foi avaliada registrando os eventos adversos relatados espontaneamente pelos participantes e visualmente observadas pelo pesquisador durante o tempo do estudo.

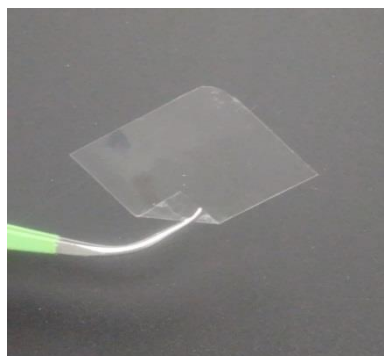
#### 4.5.3 *Protocolo de execução da técnica de tape-stripping in vivo*

O procedimento de *tape-stripping* utilizado pode ser dividido nas seguintes etapas:

##### 1) Produção das fitas e moldes utilizados

As tiras de fita (Scotch Book Tape, 3M, St. Paul, MN, USA) foram cortadas em tamanho de 1,5 x 1,5 cm (Figura 11) com auxílio de um molde, pinças e tesoura. As fitas foram armazenadas em gavetas apropriadas de forma a evitar sua contaminação até o momento da utilização. Os moldes para aplicação e *tape-stripping*, ambos com  $1,77\text{cm}^2$  de área, foram confeccionados em material de acetato.

Figura 11. Tira de fita utilizada no procedimento de *tape-stripping*.



Fonte: Acervo pessoal.

## 2) Preparo, aplicação das formulações e limpeza da pele

Após higienização da pele, o molde foi fixado na face anterior do antebraço do participante e, anteriormente à aplicação das formulações ensaiadas, a função de barreira da pele foi verificada através da medição da perda de água transepidérmica (TEWL), realizada com o Tewameter<sup>®</sup>. Após isso, a formulação foi aplicada com o dedo calçado com luva no local de tratamento, conforme ilustrado abaixo. Após aplicação da formulação, o molde foi retirado do antebraço do participante.

Figura 12. À esquerda, fixação do molde no antebraço do participante e, à direita, aplicação da formulação no local de tratamento.



Fonte: Acervo pessoal.

Decorrido o tempo de contato necessário, os locais de tratamentos especificados no design do estudo foram limpos com o auxílio de *swabs* contendo álcool isopropílico (procedimento realizado duas vezes).

### 3) *Tape-stripping*

Imediatamente após a limpeza, as áreas foram delimitadas utilizando um molde circular ( $1,77 \text{ cm}^2$ ) para realização do *tape-stripping*. O EC foi progressivamente obtido pela remoção sequencial das fitas, após a aplicação de uma pressão constante realizada com o dedo polegar (Figura 13). Trinta fitas foram utilizadas em cada local de aplicação. A TEWL foi novamente medida com o auxílio do Tewameter<sup>®</sup>.

Figura 13. Procedimento de *tape-stripping* em participante da pesquisa.



Fonte: Acervo pessoal.

#### 4.5.4 *Determinação dos parâmetros dermatofarmacocinéticos in vivo do metronidazol no estrato córneo após dose única*

Para avaliar os tempos apropriados de absorção e eliminação do metronidazol no EC após dose única, foi aplicado 100 mg do medicamento de referência (Rozex<sup>®</sup>) na pele de 14 participantes sadios segundo metodologia descrita no guia preliminar do FDA (1998) “*Topical dermatological drug product NDAs and ANDAs - In vivo bioavailability, bioequivalence, in vitro release, and associated studies*”. Quatro melhorias propostas por N'DriStempfer (2008) para o método de *tape-stripping* foram incluídas no procedimento executado neste trabalho, são elas: (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 coletados combinado a um método que garanta a remoção de quase todo o EC; e (4) procedimento de análise que possibilite a determinação do fármaco em todos os tapes, sozinhos ou associados em grupos.

A absorção e eliminação *in vivo* do MTZ foram determinadas medindo os níveis de fármaco no EC em função do tempo de pós-aplicação (1, 2, 4, 6 hs) e pós-remoção (8, 12, 17, 20, 24 e 28 hs).

Os seguintes parâmetros farmacocinéticos foram calculados utilizando um método de análise não compartimental:  $C_{\text{máx}}$ ,  $T_{\text{máx}}$ ,  $ASC_{0-t}$  e  $ASC_{0-\infty}$ . A  $C_{\text{máx}}$  e o  $T_{\text{máx}}$  foram obtidos diretamente a partir da curva de concentração-tempo no EC após uma única dose de MTZ (100 mg de formulação). A  $ASC_{0-t}$  e a  $ASC_{0-\infty}$  foram calculadas utilizando o método linear trapezoidal e a equação  $ASC_{0-t} + C_t/\lambda_z$ , respectivamente, onde  $C_t$  foi a última concentração medida e  $\lambda_z$  foi a inclinação da regressão linear da fase final da curva de concentração-tempo log-transformada. Os parâmetros farmacocinéticos de meia-vida de eliminação no EC -  $t_{1/2}$  - e a constante de eliminação no EC -  $k_{el}$  - foram calculados utilizando o software estatístico Phoenix WinNonlin Professional versão 5.0 (Certara, Princeton, NJ, EUA).

#### 4.5.5 Determinação da biodisponibilidade do metronidazol no estrato córneo após dose múltipla

O delineamento deste ensaio teve como objetivo determinar a biodisponibilidade do metronidazol no EC humano após exposição a um regime de dose múltipla e para isso utilizou-se o produto de referência, Rozex<sup>®</sup>. Com base nas informações posológicas disponíveis na bula do Rozex<sup>®</sup>, o estudo piloto foi projetado para duração de 14 dias com aplicações do gel a cada 12 horas em um total de seis participantes.

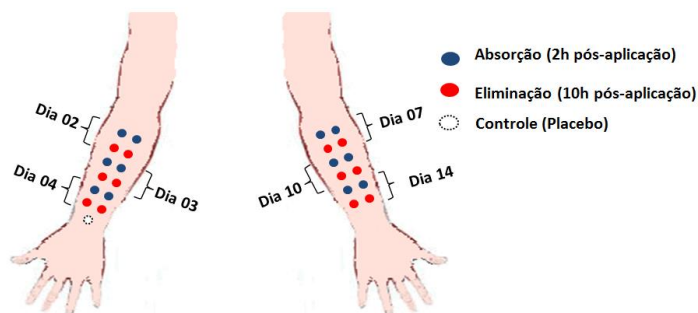
Os participantes foram orientados por escrito e verbalmente pelo pesquisador responsável sobre o protocolo a ser seguido no decorrer dos 14 dias de estudo, no que diz respeito às orientações básicas, cronograma de coletas e direitos do participante durante o estudo.

No primeiro dia do estudo, o antebraço do participante foi devidamente higienizado. Após 1 hora, o produto de referência foi aplicado em 12 locais de tratamento em cada antebraço. Os locais de aplicação foram demarcados com um molde, mostrado na figura 12, e uma dose de 100 mg do produto foi aplicada. As áreas aplicadas foram mantidas expostas ao ambiente, ou seja, sem oclusão. O procedimento de aplicação foi realizado duas vezes por dia, a cada doze horas, durante um período máximo de 14 dias. Em cada voluntário uma área adicional foi utilizada como controle, sendo esta tratada com a formulação placebo durante todo o estudo.

Nos dias 2, 3, 4, 7, 10 e 14 foram realizadas coletas de EC por *tape-stripping*, duas coletas em cada e em duplicata. Duas horas (absorção) após a aplicação do gel foi realizado o procedimento de limpeza em quatro áreas de aplicação, nesta etapa a formulação residual era removida. Imediatamente após a limpeza, duas áreas foram delimitadas por um molde e foi realizado o procedimento de *tape-stripping*.

A coleta seguinte foi realizada nas duas áreas restantes, 8 horas após a remoção da formulação residual (eliminação). O mesmo procedimento de coleta de EC descrito acima foi utilizado nos demais dias de coleta. A área utilizada como controle foi submetida à limpeza e *tape-stripping* na última coleta do 14º dia. A figura abaixo ilustra de forma simplificada os locais de aplicação e cronograma de coletas do estudo.

Figura 14. Desenho esquemático dos antebraços dos participantes, destacando os dias de coleta de EC (2, 3, 4, 7, 10 e 14) e os pontos de absorção e eliminação.



Fonte: Autoria própria.

O metronidazol presente nas fitas foi extraído em seis grupos: fitas 1 e 2, 3-7, 8-12, 13-17, 18-22, e 23-30 com 1mL de acetonitrila, as amostras permaneceram sob agitação por um período de 6 horas a 32°C. A solução extraída foi então filtrada (filtro de 0,45µm), transferida para *vials* e encaminhada para análise em CLAE-UV, utilizando o método citado no item 4.2.3.

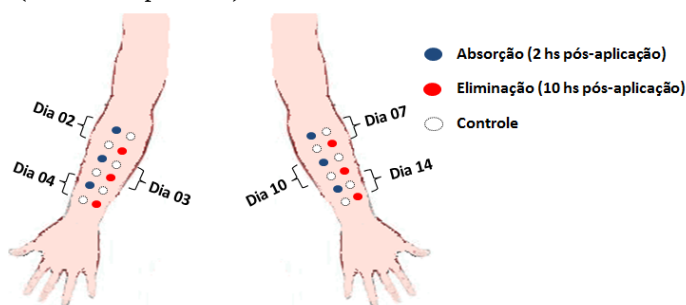
#### 4.5.6 Investigação da contaminação

Com a finalidade de investigar a possibilidade de difusão lateral do fármaco de um local de aplicação para os circunvizinhos e/ou contaminação proveniente da rotina de aplicação da formulação na execução do estudo descrito no item 4.5.5, procedeu-se com dois ensaios de determinação da contaminação em áreas controle (aplicação do placebo) em 12 participantes, 6 em cada ensaio.

##### 4.5.6.1 Avaliação da contaminação por CLAE-UV

Nesta avaliação, foram mantidas as condições do teste original (quantidade aplicada, tempos de coletas, distância entre os locais de aplicação, molde utilizado, duração), no entanto, as áreas de aplicação foram alternadas com brancos (áreas sem aplicação do gel), conforme ilustrado abaixo. As áreas utilizadas como controle foram submetidas ao mesmo procedimento de *tape-stripping* que as demais.

Figura 15. Desenho esquemático dos antebraços dos participantes no teste 1 de avaliação de contaminação, destacando os controles (áreas não aplicadas).



Fonte: Autoria própria.

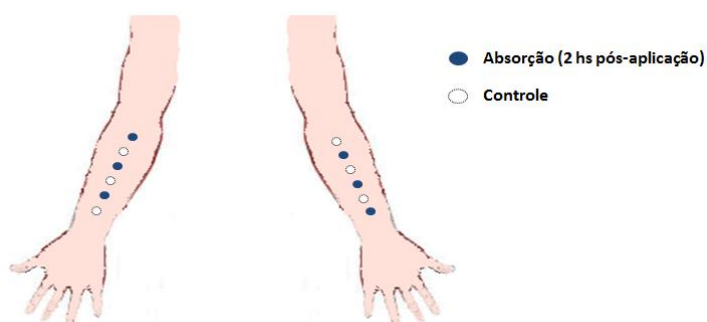
O metronidazol presente nas fitas foi extraído conforme já descrito no item 4.5.5.

#### 4.5.6.2 Avaliação da contaminação por LC-MS/MS

Uma nova avaliação de contaminação foi realizada a fim de otimizar o design do experimento para o estudo de bioequivalência entre as formulações.

Nesta abordagem o produto de referência (29 mg de formulação/ 217,5 µg de MTZ) foi aplicado a cada 12 horas durante 7 dias em seis locais de aplicação, três em cada antebraço, intercalados com áreas de branco (sem aplicação), como ilustrado na figura abaixo. A coleta de EC foi realizada em todas as áreas (6 aplicadas e 6 não-aplicadas) no sétimo dia de aplicação duas horas pós-remoção das formulações.

Figura 16. Desenho esquemático dos antebraços dos participantes no teste 2 de avaliação da contaminação, destacando os controles (áreas não aplicadas).



Fonte: Autoria própria.

O metronidazol presente nas fitas foi extraído em três grupos: fitas 1 e 2, 3-16 e 17-30 com 1mL de acetonitrila. A quantificação do fármaco foi realizada em LC-MS/MS, utilizando o método desenvolvido e validado por Melo (2016), sintetizado na tabela abaixo.

Tabela 3. Condições cromatográficas do método utilizado para a quantificação do metronidazol por LC-MS/MS.

| <b>Condições de Análise em LC-MS/MS (MELO, 2016)</b> |                                                        |
|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| <b>Coluna</b>                                        | Coluna C18 125 x 4,60 mm 5 $\mu$ m (Ace <sup>®</sup> ) |
| <b>Modo de eluição</b>                               | Isocrático                                             |
| <b>Fase móvel</b>                                    | Acetonitrila / Água /<br>Ácido fórmico (25: 75: 0,1)   |
| <b>Fluxo</b>                                         | 0,8 mL/min                                             |
| <b>Volume de injeção</b>                             | 20 $\mu$ L                                             |
| <b>Fonte de ionização</b>                            | Eletrospray Positivo                                   |
| <b>Padrão interno</b>                                | Metronidazol deuterado<br>(MTZ-D4)                     |
| <b>Analisador de Massas</b>                          | MRM (monitoramento de<br>múltiplas reações)            |
| <b>Tipo de varredura</b>                             |                                                        |
| <b>Íons monitorados</b>                              | m/z 172.1>128 (MTZ) e<br>176.1>128 (MTZ-D4)            |
| <b>Tempo de retenção</b>                             | 2,5 min.                                               |

#### 4.5.7 Estudo de Bioequivalência de formulações contendo metronidazol através da dermatofarmacocinética

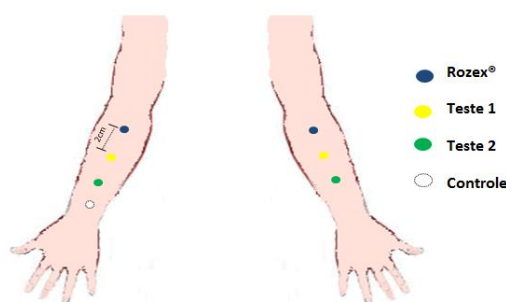
A bioequivalência entre as três formulações (Testes 1, 2 e Rozex<sup>®</sup>) foi estabelecida após um regime de dose múltipla, que consistiu na aplicação dos géis a cada 12 horas durante 7 dias.

Os participantes foram orientados por escrito e verbalmente pelo pesquisador responsável sobre o protocolo a ser seguido no decorrer dos 7 dias de estudo, no que diz respeito às orientações básicas, cronograma de coletas e direitos do participante durante o estudo.

No primeiro dia do estudo, o antebraço do participante foi devidamente higienizado. Após 1 hora, as formulações foram aplicadas em 6 locais de tratamento (três formulações por participante, um local de aplicação por antebraço e formulação) que foram randomizados, mas

a mesma ordem foi mantida por antebraços de cada participante (figura 17). Cada local de aplicação foi demarcado com molde e uma dose de 29 mg de formulação foi aplicada em cada um dos locais. As áreas aplicadas ficaram expostas ao ambiente, ou seja, sem oclusão. O procedimento de aplicação foi realizado duas vezes por dia, a cada 12 horas durante os 7 dias do estudo.

Figura 17. Desenho esquemático dos antebraços dos participantes no estudo de bioequivalência, destacando a distribuição das formulações nas áreas de aplicação.



Fonte: Autoria própria.

No sétimo dia de estudo, os participantes retornaram ao laboratório para a realização do procedimento de coleta de EC. Duas horas após a primeira aplicação do 7º dia, tempo correspondente a absorção, foi realizado o procedimento de limpeza em todas as áreas de aplicação e controle. Imediatamente após a limpeza, todas as áreas, uma a uma, foram delimitadas por um molde ( $1,77 \text{ cm}^2$  de área) e foi realizado o procedimento de *tape-stripping*.

O metronidazol presente nas fitas foi extraído utilizando o método descrito no item 4.5.6.2.

#### 4.5.7.1 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 participantes para duas 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 ( $Q_{ref}$ );

Ambos  $Q_i$  e  $R_i$  foram calculados para 2 horas de absorção no sétimo dia de aplicação.

Considerando, que as medidas de absorção cutânea apresentam uma distribuição log-normal. Portanto, 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 participante  $j$ , foram calculados os valores médios das concentrações encontradas no EC log-transformadas. O logaritmo da relação  $R_i$  foi calculado para cada participante  $j$ .

Para as duas 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.

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, 1998). Assim, os produtos teste 1 e 2 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 (GERBINO, 2005).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.2 Controle de qualidade das formulações

Após obtenção das formulações, uma delas disponível comercialmente (Rozex<sup>®</sup>) e as demais manipuladas em laboratório (Testes 1 e 2), procedeu-se com a realização de ensaios básicos de controle de qualidade a fim de garantir que os produtos testes são semelhantes ao produto referência, no que diz respeito aos parâmetros avaliados, e que todos estão com teor de fármaco dentro dos limites especificados.

Sobre as características organolépticas, todos os géis apresentaram-se levemente amarelados, inodoros e com aspecto padrão de formulação gelificada. A tabela abaixo traz os resultados encontrados para os demais parâmetros de qualidade avaliados:

Tabela 4. Valores médios de pH, viscosidade aparente e teor das formulações estudadas.

| PARÂMETRO                                 | Rozex <sup>®</sup> | Teste 1     | Teste 2    |
|-------------------------------------------|--------------------|-------------|------------|
| <b>pH ±DP</b>                             | 4,39±0,01          | 4,12±0,18   | 4,00±0,03  |
| <b>Viscosidade aparente<br/>(Pa·s)±DP</b> | 39,50±0,7          | 36,43±0,03  | 52,61±2,25 |
| <b>Teor (%)±DP</b>                        | 97,82±3,98         | 100,09±8,48 | 95,30±4,65 |

Os resultados de pH dos testes 1 e 2 foram semelhantes entre si e semelhantes ao produto de referência ( $p < 0,05$ ), embora todos estejam um pouco fora da faixa de pH da pele (4,6 – 5,8)(GASPAR;CAMPOS, 2003).

A viscosidade, atributo crítico de qualidade que influencia a aparência física, a estabilidade e o desempenho de produtos tópicos, é uma medida da resistência de uma formulação ao fluxo e é uma avaliação das propriedades reológicas de semissólidos. Uma vez que apenas os fluidos newtonianos possuem uma viscosidade mensurável, as formas de dosagem farmacêuticas semissólidas são produtos não newtonianos e, por isso, exibem uma viscosidade aparente (SHAH; HOWARD; MAIBACH, 2014). Sobre a avaliação da viscosidade aparente, o teste 1 e o produto de referência (Rozex<sup>®</sup>) mostraram-se semelhantes estatisticamente, já o teste 2 e o produto de referência e o teste 1 e o teste 2 foram diferentes estatisticamente com 95% de confiança. A viscosidade do teste 2 foi maior em comparação aos outros produtos, o que, em parte, já era esperado, tendo em vista o maior percentual de

agente gelificante na sua composição (Tabela 1). Esse resultado corrobora com o que foi observado por Araújo (2016), onde a viscosidade aparente do gel com 1,5% de Carbomer 940 foi 1,4 vezes maior que a o gel com 1% do mesmo agente gelificante e do Rozex<sup>®</sup>, o que resultou em uma diminuição de 3 vezes na espalhabilidade do teste 2.

Os géis apresentaram teor de metronidazol dentro dos limites aceitos (90-110%), segundo a Farmacopeia dos Estados Unidos (USP-30).

Diante das conclusões dos controles de qualidade realizados e dos estudos de estabilidade acelerada das duas formulações magistrais relatados por Araújo (2016), as formulações foram consideradas aptas para o prosseguimento nos ensaios *in vitro* e *in vivo*.

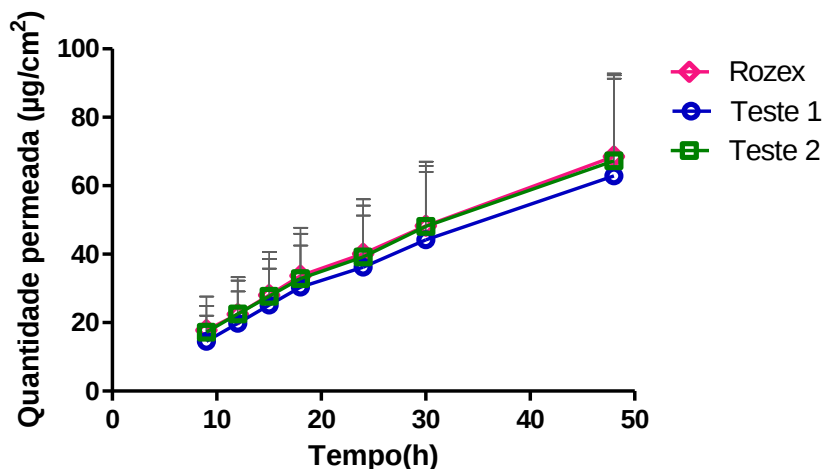
### **5.3 Estudos de permeação cutânea e dermatofarmacocinética *in vitro***

#### **5.3.1 Avaliação da quantidade de metronidazol permeada**

Os ensaios *in vitro* de permeação cutânea tem se tornado um dos mais importantes estudos na administração tópica e transdérmica de fármacos, tendo por objetivo a caracterização do perfil de permeação de formulações durante o desenvolvimento farmacotécnico, bem como no controle de qualidade (BARRY, 1983). A avaliação da permeação cutânea do metronidazol a partir das formulações estudadas foi realizada em aparato de células de difusão vertical de Franz, utilizando a pele dorsal suína como biomembrana. O experimento de permeação teve duração de 48 horas e nesse período o fármaco foi capaz de alcançar o líquido receptor em concentrações mensuráveis, tal resultado não foi verificado na avaliação da permeação, realizada por Araújo (2016), no período de 6 horas utilizando as mesmas formulações e condições de ensaio.

O gráfico apresentado na figura 18 traz a quantidade permeada de metronidazol por área em função do tempo para cada formulação. Após tratamento estatístico por ANOVA one-way ( $p < 0,05$ ) no intervalo de confiança de 95%, os resultados demonstram que não houve diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de fármaco permeada para as diferentes formulações.

Figura 18. Gráfico da quantidade de metronidazol permeada por área ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) no líquido receptor em função do tempo para cada formulação. Cada ponto equivale ao valor médio de 6 ensaios  $\pm$  DP.



O modelo cinético de Higuchi, traduzido na equação 5, mostrou-se o mais adequado para descrever o perfil do fármaco no estudo de permeação, apresentando o maior coeficiente de correlação para todas as formulações avaliadas. O mesmo modelo cinético foi determinado por Araújo (2016) na realização de cinéticas de liberação com membrana sintética de acetato de celulose utilizando as mesmas formulações.

$$M_t = \sqrt{DC_s(2A - C_s)t} \quad (\text{Equação 5})$$

Onde:  $M_t$ = quantidade cumulativa do soluto liberada;  $D$ = coeficiente de difusão na matriz

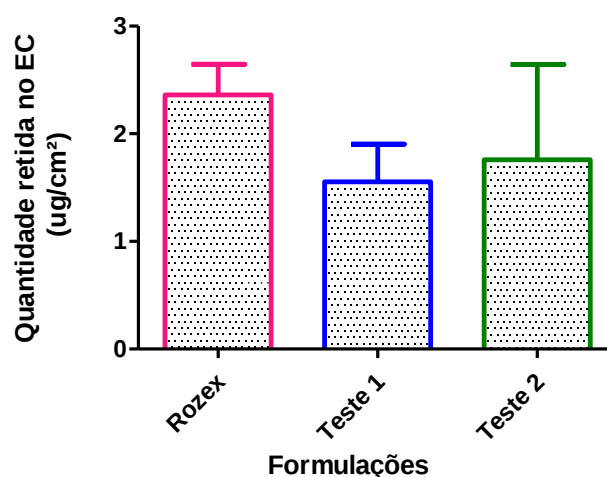
Esta equação aborda a taxa de liberação de um soluto, tipicamente um fármaco, a partir de uma matriz onde o carregamento de soluto,  $A$ , excede a sua solubilidade,  $C_s$ , na matriz, num fluido circundante. O entendimento da equação requer a visualização física da divisão da matriz em uma região interna onde existem partículas não dissolvidas e uma região externa, onde todo o fármaco é dissolvido, mas há um gradiente de concentração que pela lei de Fick regula a taxa de liberação de soluto para o fluido circundante. O modelo ainda prevê que esta fronteira se mova para dentro, à medida que o fármaco não dissolvido é completamente convertido em fármaco dissolvido e eventualmente liberado da matriz para o fluido circundante. Higuchi usou uma análise de um "pseudo estado de equilíbrio" combinada com um balanço de massas global para obter esse resultado (PAUL, 2011).

### 5.3.2 Estudo de dermatofarmacocinética (tape-stripping) in vitro

Para obtenção dos resultados referentes à quantidade de fármaco presente no EC foi realizado *tape-stripping* nas secções de pele após o período de permeação de 48 hs e após remoção da formulação residual. O gráfico da figura 19 traz a quantidade total de

metronidazol ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) retido no EC para cada formulação, medida através da extração do fármaco a partir das fitas. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os produtos, considerando ou não a quantidade de fármaco extraída nas duas primeiras fitas, fato este que demonstra que o procedimento de limpeza adotado foi eficiente, confirmando um dos melhoramentos para a técnica de DPK descrito por N'Dri-Stempfer et al., 2008. Resultado divergente foi encontrado por Araújo (2016) ao avaliar DPK *in vitro* após permeação de 6 hs, onde o produto referência e o Teste 2 apresentaram resultados de quantidade de fármaco retida no EC estatisticamente diferentes. Fato este que pode ser justificado pela menor cedência do fármaco a partir da formulação que apresenta uma maior consistência. Com o aumento do tempo do experimento de permeação (48 hs), provavelmente, as cedências tornam-se semelhantes.

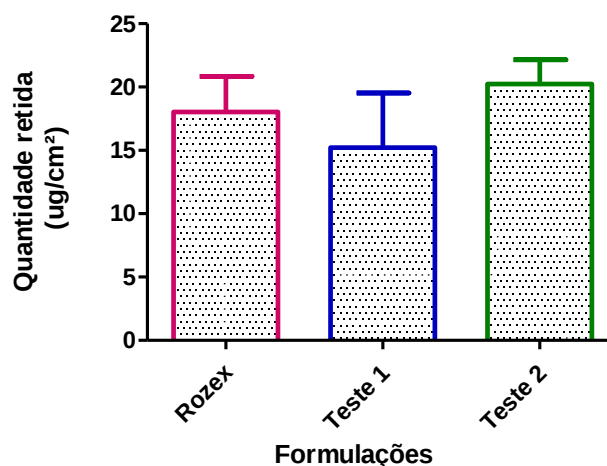
Figura 19. Gráfico da quantidade de metronidazol retida por área ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) no estrato córneo para cada formulação.



### 5.3.3 Avaliação da retenção epidérmica e dérmica

A figura 20 mostra a quantidade de metronidazol retida na epiderme viável e derme após o procedimento de *tape-stripping*, para cada formulação. Após tratamento estatístico por ANOVA one-way ( $p < 0,05$ ) no intervalo de confiança de 95%, mais uma vez, não houve diferença estatisticamente significativa entre os produtos.

Figura 20. Gráfico da quantidade de metronidazol retida por área ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) na epiderme viável e derme para cada formulação.



Quando os ingredientes ativos e inativos numa forma de dosagem tópica, produtos teste e referência, são qualitativa (Q1) e quantitativamente (Q2) os mesmos, a única diferença possível entre os dois é o método de produção e a microestrutura da formulação (Q3). Para aqueles produtos que Q1 e Q2 são iguais estudos *in vitro* são sugeridos como um dos métodos para avaliar BE (alterações de nível 2 - SUPAC) nos EUA (FDA, 1997; SHAH; HOWARD; MAIBACH, 2014). No entanto, as formulações estudadas no presente trabalho são apenas Q1 idênticas, portanto, estudos *in vitro* podem não refletir com segurança a bioequivalência ou não entre as formulações. Sendo necessário, portanto, a realização de outros testes para estabelecer a BE entre as formulações.

#### 5.4 Estudo de dermatofarmacocinética *in vivo* em participantes saudáveis

##### 5.4.1 Fototipo de pele e Tolerabilidade

Um total de 46 participantes saudáveis, 42 mulheres e 4 homens, foram incluídos no estudo após a assinatura de um termo de consentimento. A média (faixa) da idade, do peso e da altura dos participantes foram: 25 anos (19-38); 63 (46-80) kg; e 164 (152-174) cm, respectivamente. Quatro participantes apresentaram fototipo de pele II, sete fototipo V e os demais apresentaram fototipo III e IV.

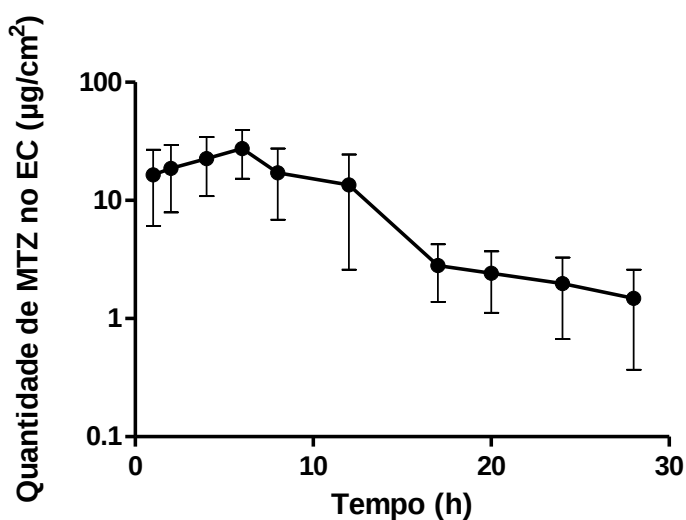
Ao final do estudo observou-se nos antebraços dos participantes uma vermelhidão temporária nos locais de aplicação após o procedimento de *tape-stripping*, no entanto a pigmentação normal da pele retornou aproximadamente 30 minutos depois. Quatro participantes do estudo descrito no item 4.5.5 apresentaram descamação moderada nos locais de aplicação das formulações.

#### 5.4.2 Determinação dos parâmetros dermatofarmacocinéticos do metronidazol no estrato córneo após dose única

Os parâmetros farmacocinéticos preconizados pelo FDA no seu esboço de guia (FDA, 1998) foram determinados para o metronidazol através de um estudo realizado com produto de referência (Rozex®) em 14 participantes adultos saudáveis.

O perfil médio da DPK do MTZ é mostrado na figura 21. O  $T_{m\acute{a}x}$  foi de 6 h, sendo este tempo determinado pelo pesquisador no momento da remoção da formulação. A  $C_{m\acute{a}x}$  medida foi  $27,66 \pm 10,06 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  e as  $ASC_{0-t}$  e  $ASC_{0-\infty}$  foram  $288,12 \pm 133,14$  e  $313,61 \pm 147,09 (\mu\text{g}\cdot\text{h})/\text{cm}^2$ , respectivamente. Verificou-se que a meia-vida de eliminação do MTZ do EC foi de  $9,54 \pm 5,48$  h, indicando que o nível de fármaco tecidual parece não diminuir rapidamente no EC. A  $k_{el}$  medida por regressão linear da fase terminal do perfil farmacocinético (17, 20, 24 e 28h) foi de  $0,089 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$ . A concentração logarítmica no EC *versus* tempo produziu uma linha reta com um valor  $r^2$  elevado de 0,9841, sugerindo que a eliminação MTZ do EC seguiu um modelo cinético de primeira ordem.

Figura 21. Gráfico do perfil dermatofarmacocinético do metronidazol após aplicação tópica de Rozex® e medição da concentração pós-aplicação e pós-remoção na pele humana. Cada ponto equivale ao valor médio de 14 ensaios  $\pm$  DP.



De posse dos parâmetros dermatofarmacocinéticos do MTZ e analisando o design do estudo de bioequivalência projetado por Araújo (2016) para formulações gelificadas contendo 0,75% de MTZ, observa-se que o tempo de eliminação adotado (12 h pós-aplicação) para coleta de amostras não condiz com esta etapa farmacocinética, pois neste tempo o fármaco ainda encontrava-se possivelmente em fase de distribuição no EC, o que pode ser visualizado no gráfico da figura 21 e conhecendo-se a meia-vida de eliminação do fármaco do EC

(9,54±5,48 h). Todavia, o estabelecimento da bioequivalência no estudo citado não foi comprometido, pois *in vivo* as concentrações provenientes do tempo de 12 h pós-aplicação foram inferiores aos do tempo de absorção utilizado (6 h pós-aplicação).

Unindo as constatações obtidas no estudo de Araújo (2016), onde a escolha de dois tempos de coleta foi suficiente para o estabelecimento da BE após dose única de formulações gelificadas contendo metronidazol, com os dados obtidos no ensaio seguindo o protocolo do FDA, conclui-se que o design proposto pela agência americana é desnecessário, mais dispendioso e demorado.

O texto original do guia do FDA especifica que cada formulação deve ser aplicada em pelo menos oito locais divididos igualmente para estudar a cinética de absorção e eliminação do fármaco. Para avaliar a absorção, a formulação é limpa a partir de quatro locais de tratamento em quatro tempos diferentes após a aplicação e, em seguida, imediatamente é realizado o procedimento de *tape-stripping*. A eliminação é medida nos quatro locais restantes removendo o fármaco da superfície da pele em quatro tempos diferentes, e decorridos os tempos pós-remoção escolhidos, em seguida, é realizado o procedimento de *tape-stripping*. Em cada um dos 8 locais de tratamento são removidas 12 fitas e as fitas 3-12 são combinadas e quantificadas para a fármaco. A quantidade de fármaco nas primeiras duas fitas não é incluída na avaliação devido à possibilidade de remoção incompleta do produto aplicado topicamente da superfície da pele (FDA, 1998).

Segundo N'Dri-Stempffer e colaboradores (2008), não há evidência experimental de que a avaliação de BE confiável de produtos tópicos requer determinações de nível de fármaco em oito locais de tratamento medidos a quatro tempos de captação e quatro tempos de eliminação. De fato, em vários estudos utilizando a amostragem de *tape-stripping* do EC, comparações significativas entre formulações foram alcançadas utilizando medições resumidas a apenas um tempo após a aplicação (PIROT et al., 1997; ALBERTI et al., 2001) ou apenas um tempo pós-remoção (REDDY et al., 2002).

Embora esses estudos não sigam o protocolo do FDA, eles fornecem dados encorajadores de que uma avaliação de BE pode ser possível de ser realizada com medições em menos pontos de tempo. Embora "não justificada", a recomendação para oito locais de coleta foi presumivelmente escolhida para proporcionar um número suficiente de pontos de tempo para a análise da ASC. Este número de pontos não é necessário para determinar a  $C_{m\acute{a}x}$ , que é sempre determinada pelo pesquisador, e está relacionado com o maior tempo de absorção, ou seja, o maior tempo de contato da formulação com a pele. Embora a ASC inclua tanto o período de absorção como o de eliminação, os dois são ponderados de forma desigual

e a ponderação relativa, depende do tempo de aplicação máxima escolhido. Por exemplo, no estudo da tretinoína, o tempo de eliminação foi oito vezes maior do que o tempo de absorção (PERSHING et al., 2003). Dependendo do protocolo do estudo, a ASC pode ser dominada pela absorção ou pela eliminação, tornando-a um parâmetro pouco sensível às diferenças entre formulações nos estudos de BE, estando via de regra, mais ligados às características físico-químicas dos fármacos (N'DRI-STEMPFER et al., 2008).

Vale ressaltar que a realização de um estudo piloto em número de participantes reduzido que determine o perfil do fármaco estudado no EC pode ser importante para a escolha do(s) tempo(s) de coleta, ou seja, do tempo de absorção e de eliminação, estudo este não realizado por Araújo (2016).

As melhorias metodológicas propostas por N'Dri-Stempfer e colaboradores (2008), corroboradas por Leal et al., 2017, e seguidas no protocolo deste ensaio foram bem sucedidas, conforme também relatado por Araújo (2016).

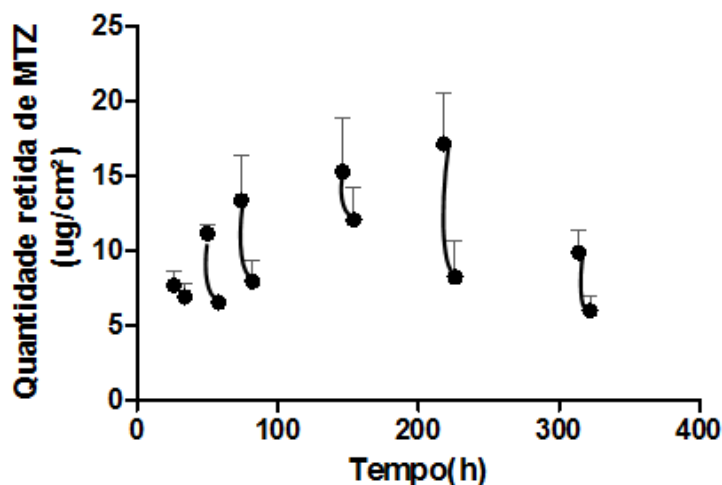
#### *5.4.3 Determinação da biodisponibilidade do metronidazol no estrato córneo após dose múltipla*

A avaliação da biodisponibilidade tópica do metronidazol após um regime de dose múltipla foi realizada utilizando o produto referência (Rozex<sup>®</sup>) em 6 participantes adultos saudáveis.

Segundo a bula do medicamento Rozex<sup>®</sup>, o produto deve ser utilizado aplicando uma camada fina do gel na pele limpa, com massagem suave, duas vezes por dia, de manhã e à noite, ou a critério médico. A duração recomendada de tratamento é em geral de 3 a 4 meses, podendo ser prolongado por igual período, se for observada melhora, dependendo da gravidade da afecção e a critério médico (GALDERMA, 2015).

Por questões de conveniência para os participantes e tolerabilidade das formulações, o tempo de duração do estudo piloto foi de 14 dias com duas aplicações diárias, a cada 12 horas. A figura 22 ilustra a biodisponibilidade do metronidazol no EC ao longo do estudo em dois tempos de coleta (absorção, eliminação) nos dias 2, 3, 4, 7, 10 e 14.

Figura 22. Gráfico do perfil do metronidazol após aplicação múltipla de Rozex® durante 14 dias e medição de uma concentração pós-aplicação e uma pós-remoção na pele humana nos dias 2, 3, 4, 7, 10 e 14. Cada ponto equivale ao valor médio de 6 ensaios  $\pm$  DP.



O estado de equilíbrio esperado em perfis farmacocinéticos de regimes de dose múltipla (STORPIRTIS et al., 2011) foi alcançado. Os valores de absorção nos dias 3, 4, 7 e 10 foram estatisticamente semelhantes (ANOVA e pós-teste de Tukey) entre si e diferentes dos dias 2 e 14. Foi observada, por volta do 10º dia de aplicação, a ocorrência de efeito descamativo provocado por todas as formulações em quatro dos seis participantes (Figura 23) o que resultou em comprometimento da integridade da barreira cutânea e perda de camada superficial da epiderme. O que resultou em maior variabilidade para os dados apresentados no 10º dia e um decaimento significativo da concentração do fármaco ( $9,85 \pm 3,58 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ ) no EC no dia 14, como mostrado na figura 22. Os gráficos contendo os resultados obtidos para cada indivíduo neste estudo estão apresentados no apêndice A.

Figura 23. Antebraço de um participante com descamação da pele a partir do 10º dia de aplicação do produto de referência.



Fonte: Acervo pessoal.

Segundo a bula do medicamento de referência, dentre os efeitos adversos que acometem com frequência a pele e o tecido subcutâneo durante o uso do Rozex®, destacam-se: pele seca, eritema, prurido, desconforto cutâneo (ardência, dor na pele/sensação de

picada), irritação na pele, piora da rosácea; e com frequência desconhecida, são citadas a dermatite de contato, esfoliação da pele, inchaço da face (GALDERMA, 2015).

#### 5.4.4 *Investigação da contaminação*

A investigação da contaminação no design do estudo descrito no item 4.4.5. foi realizada através da inclusão de áreas de controle, sem aplicação de formulação.

A contaminação proveniente, possivelmente, de difusão lateral, foi evidenciada. No entanto, a contaminação observada nas áreas controle foi maior do que 5% e menor do que 10%. É importante lembrar que no design do estudo de dose múltipla, as formulações foram aplicadas de 12 em 12h, e ficavam expostas ao ambiente simulando o uso real, de forma que os antebraços ficavam em contínua potencial exposição ao fármaco, seja pelos resquícios dele em objetos de uso diário (lençol, toalha, roupas, etc.) ou pelo contato acidental em áreas aplicadas na realização de atividades cotidianas (banho e sono, por exemplo). Isto é, a difusão lateral provavelmente não foi a única fonte de contaminação. De qualquer forma, neste design de estudo realizado, é impossível separar estas possíveis fontes de contaminação.

Diante do resultado encontrado, uma nova avaliação de contaminação foi realizada, a fim de otimizar o design para o estudo de bioequivalência entre as formulações. Nesta avaliação utilizou-se uma quantidade menor (29 mg) do produto de referência a fim de melhorar a espalhabilidade no local destinado a aplicação e a duração do estudo foi diminuída para 7 dias, tempo este onde não fora observado descamação na pele de nenhum voluntário. A utilização de uma quantidade reduzida de gel impossibilitou a quantificação do fármaco por CLAE-UV, uma vez que as novas concentrações se encontravam abaixo do LIQ (Limite Inferior de Quantificação) do método analítico. Em decorrência disto, a quantificação foi realizada em LC-MS/MS utilizando um método já validado no grupo de pesquisa (NUDFAC).

A contaminação nas áreas utilizadas como controle no novo design foi de  $3,5 \pm 1,2\%$ . Este valor foi considerado satisfatório tendo em vista as condições de execução do estudo. Ao mesmo tempo, vale salientar que não foi encontrado, na literatura consultada, um valor aceitável para que a existência da difusão lateral não seja considerada um problema para a avaliação comparativa entre diferentes formulações. De forma geral, segundo Weigmann et al. (1999), deve ser observada uma distância suficiente entre as áreas de aplicação de diferentes formulações para evitar erros devido a uma possível dispersão lateral dos fármacos sob investigação.

#### 5.4.5 Estudo de Bioequivalência de formulações contendo metronidazol através da dermatofarmacocinética

Utilizando o último design descrito no item 5.3.4., o estudo de bioequivalência entre as três formulações (Rozex<sup>®</sup>, teste 1 e teste 2) foi realizado após um regime de dose múltipla durante 7 dias.

Apenas um tempo de coleta (tempo de absorção - 2hs pós-aplicação e imediatamente após a remoção da formulação) foi realizado, e em duplicata, para estabelecimento da bioequivalência. Outros estudos utilizando avaliação mediante *tape-stripping* do EC também realizaram comparações significativas entre formulações utilizando medições em um único tempo (PIROT et al., 1997; ALBERTI et al., 2001; REDDY et al., 2002; LEAL et al, 2017). A maioria das investigações descritas na literatura até então foram centradas na fase de absorção da DPK (KALIA et al., 2001; REDDY et al., 2002; HERKENNE et al., 2006; HERKENNE et al., 2007).

O cálculo do valor médio e os intervalos superior e inferior com 90% de confiança para a razão ( $R_i$ ) entre a concentração de fármaco no EC do produto  $i$  ( $Q_i$ ) e a concentração de fármaco do produto de referência ( $Q_{ref}$ ) está demonstrada na tabela abaixo.

Tabela 5. Médias superior e inferior com intervalo de confiança 90% para a quantidade de fármaco por cm<sup>2</sup> de EC após 2 h de absorção ( $Q_i$  | absorção).

| Concentração de MTZ            |             | Teste1 | Referência | Teste2 |
|--------------------------------|-------------|--------|------------|--------|
| Absorção (µg/cm <sup>2</sup> ) | Média       | 1,294  | 1,320      | 1,159  |
|                                | Superior CI | 0,952  | 1,096      | 0,858  |
|                                | Inferior CI | 1,759  | 1,589      | 1,565  |

A bioequivalência foi avaliada usando a razão do log transformado da quantidade de fármaco/cm<sup>2</sup> (média ± intervalo de confiança de 90%) após 2 h de absorção considerando todas as fitas removidas e/ ou excluindo as duas primeiras (Tabelas 6 e 7, respectivamente).

Tabela 6. Avaliação de bioequivalência de produtos com MTZ 0,75% (Testes 1 e 2) em comparação com o produto de referência determinada em 14 participantes considerando todas fitas removidas por *tape-stripping*. Bioequivalência foi avaliada através da razão entre o log transformado da concentração de fármaco no EC (média  $\pm$  90% de intervalo de confiança) após 2 h de absorção no sétimo dia de aplicação múltipla.

|                     | Produto Teste 1 |             |             | Produto Teste 2 |             |              |
|---------------------|-----------------|-------------|-------------|-----------------|-------------|--------------|
|                     | Média           | CI superior | CI inferior | Média           | CI superior | CI inferior  |
| <b>Medida da BE</b> | 0,980           | 1,177       | 0,816       | 0,878           | 1,179       | <b>0,654</b> |

Tabela 7. Avaliação de bioequivalência de produtos com MTZ 0,75% (Testes 1 e 2) em comparação com o produto de referência determinada em 14 participantes excluindo as duas primeiras fitas removidas por *tape-stripping*. Bioequivalência foi avaliada através da razão entre o log transformado da concentração de fármaco no EC (média  $\pm$  90% de intervalo de confiança) após 2 h de absorção no sétimo dia de aplicação múltipla.

|                     | Produto Teste 1 |             |             | Produto Teste 2 |             |              |
|---------------------|-----------------|-------------|-------------|-----------------|-------------|--------------|
|                     | Média           | CI superior | CI inferior | Média           | CI superior | CI inferior  |
| <b>Medida da BE</b> | 0,959           | 1,128       | 0,815       | 0,804           | 1,093       | <b>0,592</b> |

Tradicionalmente, para serem considerados bioequivalentes, com intervalo de confiança de 90% a razão deve estar inteiramente no intervalo indicado de 0,8 a 1,25. O Teste 1 foi considerado bioequivalente, considerando ou não as duas primeiras fitas. O Teste 2 demonstrou resultado inconclusivo pois a  $R_{i,90\%,inferior}$ , considerando ou não as duas primeiras fitas, ficou abaixo de 0,8, logo o critério de bioequivalência entre o produto referência e o teste 2 não foi satisfeito. Tais resultados corroboram com os achados de Araújo (2016) avaliando as mesmas formulações após dose única e em dois tempos de coleta, absorção (6hs pós-aplicação) e eliminação (12hs pós-aplicação), onde o teste 1 mostrou-se bioequivalente e o teste 2 não-bioequivalente ao produto de referência (Rozex<sup>®</sup>).

Os resultados convergentes entre a BE após dose única e dose múltipla permitem inferir que o design de dose múltipla se torna desnecessário, pouco conveniente experimentalmente e dispendioso para o fármaco estudado quando se pode lançar mão de um estudo de dose única, uma vez que as mesmas conclusões foram obtidas. No entanto, novas investigações sobre a BE após dose múltipla devem ser realizadas para produtos dermatológicos contendo outros fármacos.

Neste trabalho, a diferença entre o Teste 1 e Teste 2 foi de apenas 0,5% de agente gelificante. Esta quantidade foi suficiente para aumentar a viscosidade e diminuir a espalhabilidade levando a uma não-bioequivalência entre o teste 2 e o produto de referência. Tendo em vista que no Brasil estudos de bioequivalência não são necessários para o registro de medicamentos dermatológicos tópicos genéricos, incluindo aqueles contendo

corticosteroides, este resultado demonstra que esses produtos poderiam entrar no mercado brasileiro de acordo com a legislação atual.

Grupos de pesquisa focados em DPK têm trabalhado em busca de resolver questões metodológicas, aperfeiçoar e comprovar a aplicabilidade da técnica para estabelecimento de BD/BE de produtos dermatológicos de aplicação tópica. As melhorias na técnica trazidas por N'driStempferet al.(2008), e corroboradas por Araújo (2016) e Leal et al. (2017) são um exemplo disto. Essas melhorias foram adotadas em nosso protocolo de pesquisa e mostraram resultados satisfatórios.

## 6 CONCLUSÃO

- Nos estudos de permeação cutânea *in vitro*, utilizando pele dorsal suína, as formulações seguiram o modelo cinético de Higuchi. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na quantidade de metronidazol permeada entre as formulações Rozex<sup>®</sup>, Teste 1 e Teste 2;
- A análise dos dados *in vitro* demonstrou ainda que a quantidade de MTZ presente no EC e aquela retida na epiderme viável e derme da pele de porco foi semelhante para os produtos avaliados. No entanto, como as formulações estudadas são apenas Q1 idênticas, de acordo com o FDA, os estudos *in vitro* podem não refletir com segurança a equivalência ou não entre as formulações;
- Os parâmetros dermatofarmacocinéticos do metronidazol foram determinados seguindo as orientações do guia do FDA e melhorias publicadas por N'Dri-Stempfer e colaboradores (2008);
- A avaliação da biodisponibilidade tópica do metronidazol após um regime de dose múltipla realizada em 6 participantes adultos saudáveis demonstrou que o estado de equilíbrio no EC foi alcançado, mas não foi apropriadamente observado, provavelmente em decorrência de efeito descamativo dos géis;
- A contaminação proveniente possivelmente da difusão lateral, no estudo realizado após dose múltipla foi evidenciada. No entanto, a contaminação manteve-se entre 5% e 10%. Com a modificação no design do estudo de bioequivalência tópica a contaminação total, incluindo a possível difusão lateral, foi de 3,5%;
- A análise da bioequivalência tópica após dose múltipla dos produtos contendo metronidazol através da dermatofarmacocinética (DPK) demonstrou com confiança de 90% no intervalo de 0,8 a 1,25 que o produto Teste 1 é bioequivalente ao produto de referência e que o produto Teste 2 não atendeu ao critério de bioequivalência com o produto de referência Rozex<sup>®</sup>, considerando ou não a inclusão das duas primeiras fitas na avaliação;
- O design de dose múltipla mostrou-se desnecessário, pouco conveniente experimentalmente e dispendioso para o fármaco avaliado, uma vez que, apresentou os mesmos resultados do estudo realizado em dose única. No entanto, novas investigações sobre a BE após dose múltipla devem ser realizadas para produtos dermatológicos contendo outros fármacos;

- Os resultados obtidos com esta e outras pesquisas ressaltam a importância de regulação dos estudos de biodisponibilidade e bioequivalência de produtos dermatológicos tópicos no Brasil.

## 7 PERSPECTIVAS

- Contribuir nas discussões sobre a regulação sanitária de produtos tópicos de aplicação local genéricos/similares no Brasil;
- Realizar a correlação *in vitro/in vivo* de produtos tópicos contendo metronidazol através da técnica de DPK;
- Publicar artigos científicos.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, T. P. **Bioequivalência tópica de produtos contendo metronidazol através da dermatofarmacocinética (DPK)**. 2016. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal da Pernambuco, Recife.
- ASBILL, C. S. MICHINIAK, B. B. Percutaneous penetration enhancers: local *versus* transdermal activity. **Pharm. Sci. Technol. Today**, v. 3, n. 1, p. 36-41, 2000.
- ALBERTI, I. et al. Assessment and prediction of the cutaneous bioavailability of topical terbinafine in vivo. **Pharm. Res.**, v. 18, p. 1472–1475, 2001.
- ALLEN Jr; POPOVICH, N. C.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e liberação de fármacos**. 8ed. Porto Alegre; Artmed, 2007.
- ALVES, M. P. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, p. 215-220, 2007.
- AU, W. L.; SKINNER, M.; KANFER, I. Comparison of Tape Stripping with the Human Skin Blanching Assay for the Bioequivalence Assessment of Topical Clobetasol Propionate Formulations. **J Pharm Pharmaceut Sci.**, v. 13, n. 1, p. 11-20, 2010.
- AULT, J. M. et al. Dermal microdialysis sampling in vivo. **Pharm Res.**, v. 11, p. 1631–9, 1994.
- AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed., Artmed, 2005.
- BARCO, B.; ALOMAR, A. Rosacea. **Spain Actas Dermo**. v. 99, n. 4, p. 244-56, 2008.
- BARRY, B. W. **Dermatological Formulations: Percutaneous Absorption**. New York: Marcel Dekker, v. 50, p. 480, 1983.
- BATISSE, D. et al. Influence of age on the wrinkling capacities of skin. **Skin Res Technol**, v. 8, n. 3, p. 148-154, 2002.
- BEDOR, D. C. G. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de metronidazol em forma farmacêutica (Gel Vaginal). **Lat. Am. J. Pharm.** v. 27, n. 2, p. 263-5, 2008.
- BENFELDT, E.; SERUP, J.; MENNE, T. Effect of barrier perturbation on cutaneous salicylic acid penetration in human skin: in vivo pharmacokinetics using microdialysis and non-invasive quantification of barrier function. **Br J Dermatol.**, v. 140, p. 739–48, 1999.
- BETTONI, C. C. **Avaliação da penetração cutânea de nanocápsulas de isotretinoína por tape stripping in vitro em pele humana e suína**. 2009. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre.
- BOIX-MONTANES, A. Relevance of equivalence assessment of topical products based on the dermatopharmacokinetics approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, p. 173–179, 2011.

BORSADIA, S. et al. Factors to be considered in the evaluation of bioavailability and bioequivalence of topical formulations. **Skin Pharmacol.**, v. 5, n. 3, p. 129-45, 1992.

BRADDY, A. C. et al. Survey of international regulatory bioequivalence recommendations for approval of generic topical dermatological drug products. **AAPS J.**, v. 17, p. 121–133, 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Manual de boas práticas em biodisponibilidade: bioequivalência**. 1 ed. Brasília: ANVISA, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução, RE nº 1170, de 19 de abril de 2006. Guia para provas de biodisponibilidade relativa/ bioequivalência de medicamentos. **Diário Oficial da União**, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC nº 31, de 11 de agosto de 2010. Dispõe sobre a realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo. **Diário Oficial da União**, 2010.

BRASIL. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira**. Volume II. 5. ed. São Paulo: Atheneu; 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC Nº 37, de 3 de agosto de 2011. Dispõe sobre o Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. **Diário Oficial da União**, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC Nº 60, de 10 de outubro DE 2014. Dispõe sobre os critérios para a concessão renovação do registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 2014a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC Nº 31, de 29 de maio de 2014. Dispõe sobre o procedimento simplificado de solicitações de registro, pós-registro e renovação de registro de medicamentos genéricos, similares, específicos, dinamizados, fitoterápicos e biológicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 2014b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC nº 73, de 7 de abril de 2016. Dispõe sobre mudanças pós-registro, cancelamento de registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 2016.

BRUNNER, M. et al. A new topical formulation enhances relative diclofenac bioavailability in healthy male subjects. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 71, n. 6, p. 852–859, 2011.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMAN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman**. 12 ed. [S.L.]: Mcgraw Hill, 2012. 2112 p.

CHAN, S. Y.; LI WAN PO, A. Quantitative skin blanching assay of corticosteroid creams using tristimuluscolour analysis. **J Pharm Pharmacol.**, v. 44, p. 371–8, 1992.

CHOW, Shein-Chung; LIU, Jen-Pei. **Design and analysis of bioavailability and bioequivalence studies**. Chapman & Hall/CRC, 3th edition. 2009.

CUCÉ, L. C.; NETO, C. F. **Manual de dermatologia**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

DEGIM, I. T. New tools and approaches for predicting skin permeability. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 11/12, 2006.

DENDA, M. et al. The epidermal hyperplasia associated with repeated barrier disruption by acetone treatment or tape stripping cannot be attributed to increased water loss. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 288, p. 230–238, 1996.

DIEMBECK, W. et al. Test guidelines for in vitro assessment of dermal absorption and percutaneous penetration of cosmetic ingredients. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 191-205, 1999.

DUPUIS, D. et al. The measurement of the stratum corneum reservoir: a simple method to predict the influence of vehicles on in vivo percutaneous absorption. **Br J Dermatol.**, v. 115, n. 2, p. 233-8, 1986.

EDWARDS, D. I. Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action. **J Antimicrob Chemother**, v. 31, n. 9, 1993.

ESCOBAR-CHÁVEZ, J. J. et al. The Tape-Stripping Technique as a Method for Drug Quantification in Skin. **J Pharm Pharmaceut Sci.**, v. 11, n. 1, p. 104-130, 2008.

BRASIL. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira**. Volume II. 5. ed. São Paulo: Atheneu; 2010.

FERNANDES, A. I. P. **Cuidados dermocosméticos para uma pele saudável: Aconselhamento farmacêutico nos casos mais comuns**. 2012. 124 f. Dissertação (Mestrado em Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve, Portugal.

FREEMAN, C. D.; KLUTMAN, N. E.; LAMP, K. C. Metronidazol - A Therapeutic Review and Update. **Drugs**, v. 54, n. 5, p. 679-708, 1997.

FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 12, p. 417-425, 2000.

FULLER, D.; MARTIN, S.; Rosacea. **Journal of Midwifery & Women's Health**, v. 57, n. 4, p. 403-9, 2012.

GALDERMA. **ROZEX® metronidazol GEL 7,5 mg/g**. 2015. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=4661062015&pIdAnexo=2649859](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=4661062015&pIdAnexo=2649859)> Acesso em 25/02/2017.

GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. **Int J Pharm.**, v. 250, n. 1, p. 35-44, 2003.

GEE, C. M. et al. Assessment of the lateral diffusion and penetration of topically applied drugs in humans using a novel concentric tape stripping design. **Pharm Res.**, v. 29, n. 8, p. 2035–2046, 2012.

GEE, C. M. et al. The Effect of Formulation Excipients on the Penetration and Lateral Diffusion of Ibuprofen on and within the Stratum Corneum Following Topical Application to Humans. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, p.909–919, 2014.

GEINOZ, S. et al. Quantitative structure-permeation relationships for solute transport across silicone membranes. **Pharm. Res.**, v. 19, n. 11, p. 1622-1629, 2002.

GERBINO, P. P. **Remington: The Science and Practice of Pharmacy**. 21st Edition. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

GOLDMAN, L.; BENNETT, J. C. **Cecil: tratado de medicina interna**. 21.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

GOOSEN, C. et al. Percutaneous delivery of thalidomide and its N-alkyl analogs. **Pharmaceutical Research**, v. 19, p. 434-439, 2002.

GRAMS, Y.; BOUWSTRA, J. **Percutaneous absorption: Drugs - Cosmetics - Mechanisms - Methodology**, vol. 155. Boca Raton: Taylor & Francis; 2005. p. 177-191.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M.; LOPEZ, R. F. V. Princípios Básicos e Aplicação da Iontoforese na Penetração Cutânea de Fármacos. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1490-1498, 2008.

GROPPER, S. et al. Systemic bioavailability and safety of twice-daily topical ozenoxacin 1% cream in adults and children with impetigo. **Future Microbiol.**, v. 9, n. 8s, p. 33–40, 2014.

GUIRRO, E.; GUIRRO, R. **Fisioterapia dermatofuncional**. 3.ed. São Paulo: Manole, 2004.

HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. **Int. J. Pharm.**, v. 224, p. 1-18, 2001.

HAIGH, J. M.; KANFER, I. Assessment of topical corticosteroid preparations: the human skin blanching assay. **Int J Pharm.**, v. 19, p. 245–62, 1984.

HARRIS, M. I. N. C. **Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento**. 3. ed. São Paulo: Editora Senac São Paulo, 2009.

HERKENNE, C. et al. Pig ear skin ex vivo as a model for in vivo dermatopharmacokinetic studies in man. **Pharmaceutical Research**, v. 23, p. 1850-1856, 2006.

HERKENNE, C. et al. Dermatopharmacokinetic Prediction of Topical Drug Bioavailability In Vivo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 887–894, 2007.

HERKENNE, C. et al. *In Vivo* Methods for the Assessment of Topical Drug Bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 1, p. 87-103, 2008.

ISSA, M. G. **Avaliação do impacto de diferentes variáveis no ensaio de dissolução intrínseca de metronidazol**. 2011. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2011.

JARRATT, M. et al. Tazarotene Foam versus Tazarotene Gel: A Randomized Relative Bioavailability Study in Acne Vulgaris. **Clin Drug Investig.**, v. 33, p. 283–289, 2013.

JOHNSON, A. W. Overview: fundamental skin care – protecting the barrier. **Dermatologic therapy**, v. 17, p. 1-5, 2004.

JOHNSON, M.; HOOPER, D. C.; THORNER, A. R. **Metronidazole: An overview**. 2010. Disponível em: < <http://www.uptodate.com/contents/metronidazole-an-overview> > Acesso em 23/02/2017.

KALIA, Y. N. et al. Assessment of topical bioavailability in vivo: the importance of stratum corneum thickness. **Skin PharmacolAppl Skin Physiol.**, v. 14, n. 1, p. 82-6, 2001.

KIENZLER, Jean-Luc et al. Systemic Bioavailability of Topical Diclofenac Sodium Gel 1% Versus Oral Diclofenac Sodium in Healthy Volunteers. **J ClinPharmacol.**, v. 50, p. 50-61, 2010.

LADEMANN, J. et al. The tape stripping procedure – evaluation of some critical parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, p. 317–323, 2009.

LAMP, K. C. et al. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the Nitroimidazole Antimicrobials. **ClinPharmacokinet.** v. 36, n. 5, p. 353-373, 1999.

LANGER, R. Transdermal drug delivery: Past progress, current status, and future prospects. **Adv. DrugDeliv. Rev.**, v.56, p.557-558, 2004.

LEAL, L. B. et al. Bioequivalence Methodologies for Topical Drug Products: In Vitro and Ex Vivo Studies with a Corticosteroid and an Anti-Fungal Drug. **Pharm Res.**, v. 34, n. 4, p. 730-737, 2017.

LIRA, A. A. M. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação de sistemas microestruturados para veiculação de ácido retinóico na pele**. 2007. 142 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

LOWE, N. J. Use of Topical Metronidazole in Moderate to Severe Rosacea. **Advances in Therapy**, v. 20, n. 4, p. 177-190, 2003.

MARIONNET, C. et al. Modulation of gene expression induced in human epidermis by environmental stress in vivo. **J. Invest. Dermatol.**, v. 121, p.1447–1458, 2003.

MARKS, R.; DYKES, P. Plasma and cutaneous drug levels after topical application of piroxicam gel: a study in healthy volunteers. **Skin Pharmacol.**, v. 7, p. 340–344, 1994.

MARKS, R. The stratum corneum barrier: the final frontier. **The Journal of Nutrition**, v. 134, p. 2017S-2021S, 2004.

MCCLELLAN, K. J.; NOBLE, S. Topical Metronidazole - A Review of its Use in Rosacea. **Am J ClinDermatol**, v. 1, n. 3, p. 191-199, 2000.

MENON, G. K.; FEINGOLD, K. R.; ELIAS, P. M. Lamellar body secretory response to barrier disruption. **J. Invest. Dermatol.**, v. 98, p.279–289, 1998.

MENON, G. K.; CLEARY, G. W.; LANE, M. E. The structure and function of the stratum corneum. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 435, p. 3-9, 2012.

MELO, E. K. S. **Termogéis de metronidazol tópico: Dermatofarmacocinética x Microdiálise cutânea**. 2016. 142 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

MELO, E. K. S. et al. Criteria for the bioanalytical method and its application in dermatopharmacokinetic (DPK) study in pig skin (ex vivo) using metronidazole. **Afr. J. Pharm. Pharmacol.**, v. 10, n. 38, p. 817-822, 2016.

MICHAELS, A. S.; CHANDRASEKARAN, S. K.; SHAW, J. E. Drug permeation through human skin: Theory and in vitro experimental measurements. **Am. Inst. Chem. Engrs. J.**, v. 21, n. 5, p. 985-996, 1975.

NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 9, p. 318-326, 2000.

NARKAR, Y. Bioequivalence for Topical Products—An Update. **Pharm Res.**, v. 27, p. 2590–2601, 2010.

N'DRI-STEMPFER, B. et al. Optimizing Metrics for the Assessment of Bioequivalence Between Topical Drug Products. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 7, p. 1621-1630, 2008.

N'DRI-STEMPFER, B. et al. Improved Bioequivalence Assessment of Topical Dermatological Drug Products Using Dermatopharmacokinetics. **Pharmaceutical Research.**, v. 26, n. 2, 2009.

NETZ, P. A.; ORTEGA, G. G. **Fundamentos de físico-química: Uma abordagem conceitual para as Ciências Farmacêuticas**. São Paulo: Artmed, 2002.

NICOLI, S. et al. Dermatopharmacokinetics: factors influencing drug clearance from the stratum corneum. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 4, p. 865-871, 2009.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD): Skin absorption: in vitro method, test guideline N. 428. **Guidelines for the Testing of Chemicals**. Paris, v. 1, n. 4, p. 1-8, 2004.

OU-YANG, H. et al. A chemiluminescence study of UVA-induced oxidative stress in human skin in vivo. **J. Invest. Dermatol.**, v. 122, p. 1020–1029, 2004.

PATHAN, I. B.; SETTY, C. M. Chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery systems. **Trop J Pharm Res.**, v. 8, n. 2, p. 173, 2009.

PAUL, D. R. Elaborations on the Higuchi model for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 418, p. 13–17, 2011.

PELLANDA, C. S. **Topical bioavailability of glucocorticosteroids: Dermatopharmacokinetic and dermatopharmacodynamic of topically applied triamcinolone acetonide in humans**. 2006. 192 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Naturais, Universidade de Basel, Basel.

PELLANDA, C. S. et al. Topical bioavailability of triamcinolone acetonide: effect of dose and application frequency. **Arch Dermatol Res.**, v. 298, p. 221–230, 2006.

PERSHING, L. K. et al. Assessment of dermatopharmacokinetic approach in the bioequivalence determination of topical tretinoin gel products. **J Am Acad Dermatol.**, v. 48, n. 5, p. 740–751, 2003.

PIERARD-FRANCHIMONT, C.; PIERARD, G. E. Assessment of aging and actinic damages by cyanoacrylate skin surface strippings. **Am. J. Dermatopathol.**, v. 9, p. 500–509, 1987.

PINKUS, H. Examination of the epidermis by the strip method of removing horny layers. I. Observation on thickness of the horny layer, and on mitotic activity after stripping. **J Invest Dermatol.**, v. 16, p. 383–6, 1951.

PIROT, F. et al. Characterization of the permeability barrier of human skin in vivo. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, v. 94, p. 1562–1567, 1997.

PRAUSNITZ, M. R.; MITRAGOTRI, S.; LANGER, R. Current status and future potential of transdermal drug delivery. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 3, n. 2, p. 115–24, 2004.

RANG, H. P. et al. **Rang&Dale Farmacologia**. 6ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 829 p.

RAGHALLAIGH, S. N.; POWELL, F. C. Rosacea. **European Handbook of Dermatological Treatments**, p. 835, 2015.

REDDY, M. B. et al. Determining dermal absorption parameters in vivo from tape stripping data. **Pharm. Res.**, v. 19, p. 292–297, 2002.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITI, E. A. **Dermatologia**. São Paulo: Artes Médicas, 2008.

SARTORELLI, P. et al. Percutaneous penetration studies for risk assessment. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 8, p. 133–152, 2000.

RAWLINGS, A. V.; HARDING, C. R. Moisturization and skin barrier function. **Dermatology Therapy**, v. 17, n. 1, p. 43–8, 2004.

SACHDEVA, S. Fitzpatrick skin typing: Applications in dermatology Fitzpatrick skin typing: Applications in dermatology. **Indian J Dermatol Venereol Leprol.**, v. 75, n. 1, p. 93–96, 2009

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, n. 11, p. 2376–2381, 2002.

SCHAEFER, H.; ZESCH, A.; STÜTTGEN, G. **Skin permeability**. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1982. p. 588–609.

SCHEUPLEIN, R. J. Mechanism of percutaneous absorption. II. Transient diffusion and the relative importance of various routes of skin penetration. **J. Invest. Dermatol.**, v. 48, n. 1, p. 79–88, 1967.

SCHICKSNUS, G.; MULLER-GOYMANN, C. C. Lateral diffusion of ibuprofen in human skin during permeation studies. **Skin Pharmacol Physiol.**, v. 17, n. 2, p. 84–90, 2004.

SHAH, V. P. **Topical dermatological drug product NDAs and ANDAs – in vivo bioavailability, bioequivalence, in vitro release and associated studies**. Rockville: US Department of Health and Human Services, p. 1–19, 1998.

SHAH, V. P. Progress in Methodologies for Evaluating Bioequivalence of Topical Formulations. **Am J ClinDermatol**. v. 2, n. 5, p. 275-28, 2001.

SHAH, V. P.; HOWARD, I.; MAIBACH, J. J. **Topical Drug Bioavailability, Bioequivalence, and Penetration**. 2nd. London: Springer, 2014. 393 p.

SILVA, A. T. A. **Síntese de pró-fármacos derivados de metronidazol**. 2002. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia humana: Uma abordagem integrada**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 995 p.

SIMONETTI, O. et al. Visualization of diffusion pathways across the stratum corneum of native and in-vitro-reconstructed epidermis by confocal laser scanning microscopy. **ArchDermatol Res.**, v. 287, n. 5, p. 465-73, 1995.

SOARES, K. C. C. et al. Bioequivalência de medicamentos tópicos dermatológicos: o cenário brasileiro e os desafios para a vigilância sanitária. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 20, n. 11, p. 3599-3608, 2015.

STORPIRTIS, S. **Biofarmacotécnica. Fundamentos de biodisponibilidade, bioequivalência, dissolução e intercambialidade de medicamentos genéricos**. São Paulo: s.n, 1999. 78p.

STORPIRTIS, S. et al. **Biofarmacotécnica**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009, 352 p.

STORPIRTIS, S. et al. **Farmacocinética básica e aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011, 222 p.

TAN, J.; BERG, M. Rosacea: Current state of epidemiology. **JAAD**. v. 69, n. 6, p. S27–S35, 2013.

The United States Pharmacopeia / The National Formulary : **USP 30 NF25**. Hardcover Book Condition: Good Edition: 1 Har/Pap/, 2007.

TORTORA, G. J. GRABOWSKI, S. R. **Princípios de Anatomia e Fisiologia**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

TOSATO, M. G. **Análise dos constituintes da pele humana sob efeito dos cosmeceúticos por espectroscopia Raman**. 2010. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Universidade do Vale da Paraíba, São Paulo, São José dos Campos.

TSAL, J-C. et al. Properties of adhesive tapes used for stratum corneum stripping. **Int J Pharm.**, v. 72, p. 227-231, 1991.

TWO, A. M. et al. A Rosacea Part I. Introduction, categorization, histology, pathogenesis, and risk factors. **J Am Acad Dermatol.**, v. 72, n. 5, p. 749-60, 2015.

USA. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration (FDA). Center of Drug Evaluation and Research. Guidance: **Topical dermatological corticosteroids: in vivo bioequivalence**, 1995.

USA. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration (FDA). Center of Drug Evaluation and Research. Guidance for Industry: **SUPAC-SS. Nonsterile semisolid dosage forms—scale-up and post-approval changes: chemistry, manufacturing controls; in vitro release testing and in vivo bioequivalence documentation**. 1997.

USA. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration (FDA). Center of Drug Evaluation and Research. Guidance for Industry: **Topical dermatologic drug product NDAs and ANDAs-in vivo bioavailability, bioequivalence, in vitro release, and associated studies**, 1998.

USA. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration (FDA). Center of Drug Evaluation and Research. **Guidance for Industry on special protocol assessment; Availability**, Fed. Reg. 67: 35122, 2002.

USA. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration (FDA). Center of Drug Evaluation and Research. Guidance for Industry: **Bioavailability and Bioequivalence Studies Submitted in NDAs or INDs — General Considerations**, 2014.

VAN DER WALK, P. G.; MAIBACH, H. I. A functional study of the skin barrier to evaporative water loss by means of repeated cellophane-tape stripping. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 15, p. 180–182, 1990.

WAGNER, N. et al. Differential penetration of skin by topical metronidazole formulations. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 15, p. 197-205, 1998.

WEIGMANN, H. et al. Bioavailability of clobetasol propionate-quantification of drug concentrations in the stratum corneum by dermatopharmacokinetics using tape stripping. **Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.**, v. 12, n. 1–2, p. 46–53, 1999.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 5, p. 603-618, 2004.

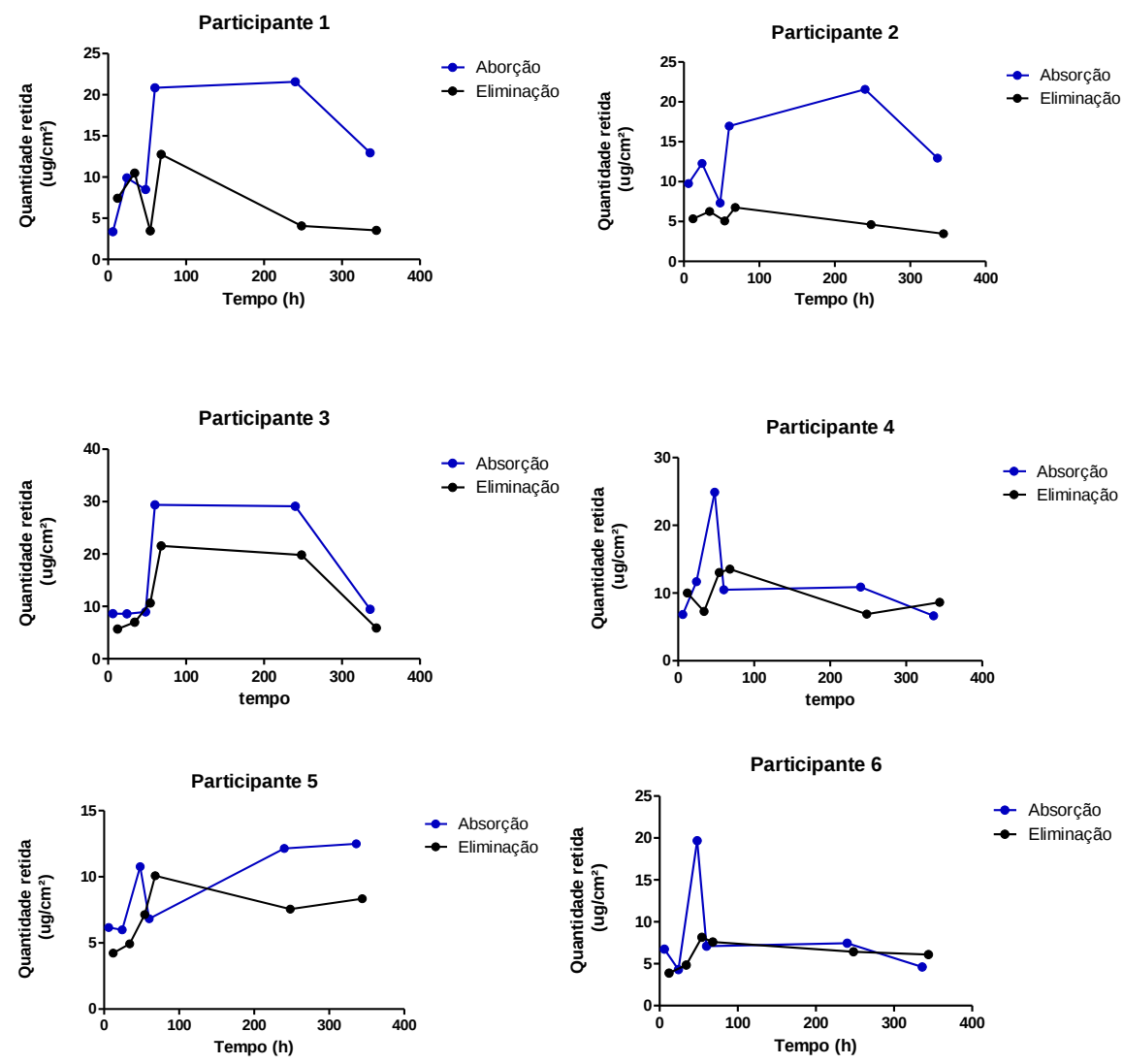
YACOBI, A. et al. Current Challenges in Bioequivalence, Quality, and Novel Assessment Technologies for Topical Products. **Pharm Res.**, v. 31, p. 837–846, 2014.

YUAN, J.S. **Linker-based lecithin microemulsions as transdermal drug delivery systems**. 2009. 188 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Química Aplicada) – University of Toronto, Toronto, Canadá, 2009.

ZIP, C. M. An update on the role of topical metronidazole in rosacea. **Skin Therapy Lett.**, v. 11, n. 2, p. 1-4, 2006.

ZIP, C. M. Innovative use of topical metronidazole. **DermatolClin.**v. 28, n. 3, p. 525-34, 2010.

APÊNDICE A – Perfil do MTZ no EC após dose múltipla em 6 participantes adultos saudáveis



**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 **Prof<sup>a</sup>. Dra. Leila Bastos Leal**, Rua Arthur de Sá, S/N, Recife – PE, CEP: 50740-520, telefone: (81)94516044, e-mail: leila.leal@nudfac.com.br. Também participam também desta pesquisa: Prof. Dr. Davi Pereira de Santana, telefone: (81)99756222 e Maira Ludna Duarte, telefone: (83)991157923.

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 sadios, 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 reproduzíveis. 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 diariamente (de 12 em 12 horas) na pele do seu antebraço durante sete dias. No sétimo dia, 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 todas as áreas expostas às formulações, serão aplicadas fitas adesivas, com o objetivo de remover o estrato córneo. 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 2016.

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):

|                    |                    |
|--------------------|--------------------|
| <b>Nome:</b>       | <b>Nome:</b>       |
| <b>Assinatura:</b> | <b>Assinatura:</b> |

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

|                                                                          |                                                                                       |                                                                                     |
|--------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Comitê de Ética<br/>em Pesquisa<br/>Envolvendo<br/>Serres Humanos</b> | <b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE<br/>PERNAMBUCO CENTRO DE<br/>CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-</b> |  |
|--------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|

### 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 & 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

 **Plataforma Brasil**

 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 & 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