



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

STEPHANYE CAROLYNE CHRISTINO CHAGAS

**BIOEQUIVALÊNCIA DE MEDICAMENTOS PARA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA:  
mupirocina pomada.**

Recife – PE  
2018

STEPHANYE CAROLYNE CHRISTINO CHAGAS

**BIOEQUIVALÊNCIA DE MEDICAMENTOS PARA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA:  
mupirocina pomada.**

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  
2018

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

C434b Chagas, Stephanye Carlyne Christino.  
Bioequivalência de medicamentos para administração tópica: mupirocina pomada / Stephanye Carlyne Christino Chagas. – Recife: o autor, 2018. 91 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, figuras, tabelas e anexos.

1. Mupirocina. 2. Administração cutânea. 3. Bioequivalência. 4. Técnicas *in vitro*. 5. Estudo clínico. I. Leal, Leila Bastos. (orientadora). II. Título.

615.1 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2018 - 080)

STEPHANYE CAROLYNE CHRISTINO CHAGAS

**BIOEQUIVALÊNCIA DE MEDICAMENTOS PARA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA:  
mupirocina pomada.**

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:

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leila Bastos Leal (Presidente/ Orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

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

---

Prof. Dr.<sup>a</sup> Ana Amélia Moreira Lira (Examinadora Externa)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

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

---

Prof. Dr. Giovana Damasceno Sousa (Suplente externa)  
Universidade Federal de Pernambuco

Aos meus pais, Nino e Nevinha,  
com muito amor e gratidão.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, que guia todos os acontecimentos de minha vida.

Aos meus pais, Nino e Nevinha, verdadeiras extensões de Deus na terra.

Aos meus amigos, mais do que pela amizade, pelo verdadeiro amor fraterno.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Leila Bastos Leal, que além de me orientar, me motiva e me inspira a fazer mais e melhor.

Ao Prof. Dr. Davi Pereira de Santana, pelo apoio e oportunidade.

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

As alunas de iniciação científica que muito me ajudaram com parte dos experimentos.

Aos amigos do laboratório NUDFAC por todo apoio técnico prestada no decorrer desta caminhada, em especial a Maira Ludna, Isabelle Fitipaldi e Thalita Pedon.

Aos professores do PPGCF-UFPE que muito me ensinaram em suas disciplinas, acrescentando tanto no desenvolvimento deste trabalho quanto em minha formação.

A todos os funcionários do PPGCF.

A todos os voluntários que participaram do estudo cooperando com os resultados deste trabalho.

A Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa concedida.

“Eu sei de muito pouco. Mas tenho a meu favor tudo o que não sei...

Tudo o que não sei é a minha largueza.”

Clarice Lispector

## RESUMO

No Brasil, o estudo comparativo exigido para registro das formulações tópicas genéricas é o estudo de equivalência farmacêutica (EF). Este estudo avalia apenas os parâmetros físico-químicos e microbiológicos dos medicamentos, o que, aparentemente, não garante aos medicamentos genéricos o mesmo grau de eficácia e segurança que o medicamento referência. Assim, para garantir a equivalência farmacêutica e terapêutica de fórmulas genéricas tópicas em relação ao medicamento de referência um dos caminhos seria a busca da similaridade qualitativa (Q1) e quantitativa (Q2) dos excipientes, bem como a similaridade da microestrutura da formulação (Q3). O presente estudo avaliou três pomadas (genéricos A e B e similar) presentes no mercado brasileiro, contendo mupirocina a 2%, em relação ao seu medicamento de referência Bactroban®, através de ensaios físico-químicos, de estudos de liberação *in vitro* (IVRT) e estudos de dermatofarmacocinética (DPK) *in vitro* e *in vivo*. Frente aos ensaios de EF e IVRT, as formulações, mostram-se ser Q1, Q2 e Q3 semelhantes, sendo classificadas como classe 1 conforme o Sistema de Classificação de Produtos Tópicos e consideradas bioequivalentes ao medicamento de referência Bactroban®, com exceção do medicamento similar. Os resultados de DPK *in vitro* e *in vivo* demonstram que os genéricos A e B são estatisticamente semelhantes ao Bactroban®, corroborando com o resultado da EF e IVRT. Diante destes resultados, a escolha do método apropriado para avaliação da bioequivalência (BE) de produtos tópicos dermatológicos (PTD) deve ser baseada numa abordagem multifacetada, adaptada ao ativo e ao local alvo da doença a que se destina. Os resultados evidenciam a grande importância de uma rediscussão da legislação nacional e a inclusão de um maior número de testes para determinação da BE entre PTD bem como o estabelecimento de diretrizes detalhadas para cada método e a harmonização destes por órgãos reguladores internacionais.

**Palavras-chave:** Mupirocina. Bioequivalência. Administração cutânea. Técnicas *in vitro*. Estudo clínico.

## ABSTRACT

In Brazil, the comparative study required for the registration of topical generic formulations is the pharmaceutical equivalence study (PE). This study evaluates only physico-chemical and microbiological parameters of drugs, which apparently doesn't ensure for generic drugs the same degree of efficacy and safety that reference drug. So, to ensure the pharmaceutical and therapeutic equivalence of topical generic formulation in relation to the reference medicine, one of the ways would be the search for the qualitative (Q1) and quantitative (Q2) similarity of excipients, as well as the similarity of the microstructure of the formulation (Q3). The present study evaluated three ointments (generic A and B and similar) present in the Brazilian market, containing mupirocin 2%, in relation to reference medicine Bactroban®, through physical-chemical tests, in vitro release test (IVRT) and dermatopharmacokinetics (DPK) in vitro and in vivo. In relation to the PE and IVRT, all formulations shown to be Q1, Q2 and Q3, being classified as class 1 according to the Topical Drug Classification System and considered as bioequivalent to the reference drug Bactroban®, with the exception of the similar drug. DPK results in vitro and in vivo demonstrated that generics A and B are statistically similar a Bactroban®, corroborating with the result of PE and IVRT. So, in view of these results, a choice of the appropriate method for evaluating of bioequivalence (BE) of dermatological topical products (DTP) should be based on a multifaceted approach, adapted to the active and the target local of the disease for which it is intended. The results evidence the importance of a re-discussion of national legislation and the inclusion of a larger number of tests for the determination of BE among DTP as well as the establishment of detailed guidelines for each method and a harmonization for international regulatory agencies.

**Key words:** Mupirocin. Bioequivalence. Cutaneous administration. *In vitro* techniques. Clinical study.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1- Estrutura química da MPC.....   | 25 |
| Figura 2- Manifestação clínica do impetigo.....   | 26 |
| Figura 3- Manifestação clínica da foliculite.....   | 26 |
| Figura 4- Anatomia da pele: secção transversal da pele mostrando diferentes estratos e anexos.....  | 28 |
| Figura 5- Diagrama da epiderme mostrando as principais camadas.....   | 29 |
| Figura 6- Vias de permeação do fármaco através do estrato córneo, através da matriz lipídica entre os corneócitos (via intercelular) e através dos corneócitos e da matriz lipídica intercelular (via transcelular).....  | 30 |
| Figura 7- Abordagens para a avaliação de PTD.....   | 36 |
| Figura 8- Células de difusão de Franz automatizadas.....  | 37 |
| Figura 9- Representação da técnica de <i>tape stripping</i> através da remoção de uma camada de estrato córneo com uma fita adesiva.....  | 38 |
| Figura 10- Sistema de Classificação de produtos tópicos, SCPT.....  | 39 |
| Figura 11- Árvore de Strawman como proposta de decisão á avaliação da BE de PTD.....  | 40 |
| Figura 12- Abordagem sistemática para a seleção de um teste de substituição adequado para estabelecer a BE de PTD.....  | 41 |
| Figura 13- Número de medicamentos tópicos semissólidos dermatológicos registrados no Brasil e nos EUA conforme sua classe terapêutica.....  | 43 |
| Figura 14- Oito locais de aplicação das formulações demarcados na porção ventral de cada antebraço.....   | 56 |
| Figura 15- Cromatograma indicativo da seletividade do método (a) placebo, (b) solução padrão de MPC.....  | 60 |
| Figura 16- Curva da Regressão Linear obtida da média de três curvas de calibração autênticas.....   | 60 |
| Figura 17- Pico cromatográfico do placebo adicionado de PI (A) Pico cromatográfico da amostra contendo MPC adicionada de PI (B).....  | 62 |
| Figura 18- Curva da Regressão Linear obtida da média de três curvas de calibração autênticas.....   | 62 |
| Figura 19- Espalhabilidade (A) e viscosidade x taxa de cisalhamento (B) das formulações contendo MPC.....   | 65 |
| Figura 20- Perfil de liberação das formulações contendo MPC.....  | 67 |
| Figura 21- Quantidade de MPC na epiderme e derme das formulações na pele dorsal de porco (n = 14).....  | 68 |
| Figura 22- Quantidade total de fármaco (ng/cm <sup>2</sup> ), medido nas fitas dos locais de aplicação dos genéricos A e B e do Bactrobran® em catorze áreas de pele dorsal de porco, sendo a figura 22-A sem as duas primeiras fitas (n=18) e a 22-B com as duas primeiras fitas (n=20)..... | 69 |

## LISTA DE QUADROS

|  |    |
|--|----|
| Quadro 1- Apresentações comerciais nacionais de MPC pomada 2% (anterior a atualização realizada pela ANVISA em junho/2017 e utilizada como base neste trabalho). ..... | 27 |
| Quadro 2- Funções de proteção do estrato córneo de mamífero.....   | 29 |
| Quadro 3- Apresentações comerciais de MPC pomada 2% utilizadas no estudo. ....   | 45 |
| Quadro 4- Condições cromatográficas para detecção de MPC por CLAE-UV. ....   | 46 |
| Quadro 5- Condições analíticas para determinação de MPC em amostras provindas de matriz biológica. ....  | 47 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1- Repetitividade e Precisão intermediária entre analistas e dias diferentes. ....   | 61 |
| Tabela 2- Resultados da exatidão. ....  | 61 |
| Tabela 3- Resultados da precisão e exatidão para as fitas em pele humana e em pele de porco.....  | 62 |
| Tabela 4- Estabilidade das amostras armazenadas após o processo de extração. ....   | 63 |
| Tabela 5- Efeito matriz das amostras contendo MPC. ....   | 63 |
| Tabela 6- Valores médios para a recuperação no estrato córneo (amostras contaminadas) e pele de porco (epiderme e derme).....   | 64 |
| Tabela 7- Resultados da avaliação do teor, pH, viscosidade aparente e densidade das formulações contendo MPC. ....  | 64 |
| Tabela 8- Resultado estatístico comparativo entre as formulações referência e testes.....   | 67 |
| Tabela 9- Média, DP e CV% para a quantidade de fármaco por centímetro quadrado no EC 6 h após a aplicação sem as duas primeiras fitas das três formulações contendo MPC (n = 14)..... | 69 |
| Tabela 10- Média, DP e CV% para a quantidade de fármaco por centímetro quadrado no EC 6 h após a aplicação com todas as fitas das três formulações contendo MPC (n = 14). ....        | 69 |
| Tabela 11- Avaliação de bioequivalência dos medicamentos contendo MPC (genéricos A, B e similar) em comparação com o medicamento de referência (Bactroban®). ....                     | 70 |

## LISTA DE SIGLAS

ANOVA – Análise de variância  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
BD – Biodisponibilidade  
BE – Bioequivalência  
CLAE-UV – Cromatografia Líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta  
CONCEA – Conselho Nacional De Controle De Experimentação Animal  
CQA – Controle de qualidade de alta concentração  
CQB – Controle de qualidade de baixa concentração  
CQM – Controle de qualidade de média concentração  
CRS – *Confocal Raman spectroscopy*  
CV – Coeficiente de variação  
CV% – Coeficiente de variação percentual  
DBCA – Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica  
MD – Microdiálise dérmica  
DP – Desvio Padrão  
DPK – Dermatofarmacocinética  
EC – Estrato córneo  
EF – Equivalência farmacêutica  
EMA – Agência de Medicamentos Européia  
EPR – Erro Padrão Relativo  
ESI(-) – *Electrospray ionisation* (negative mode)  
EUA – Estados Unidos da América  
FDA – *Food and Drug Administration*  
FMN – Fator matriz normalizado  
HCTZ – Hidroclorotizida  
IC – Intervalo de confiança  
IGDRP – *International Generic Drug Regulators Pilot Project*  
IMC – Índice de massa corpórea  
IVPT – *In vitro percutaneous test*  
IVRT – *In vitro release test*  
LC-MS/MS – *Liquid chromatography coupled spectoscopy in tanden*

MG – Medicamento genérico  
MPC - Mupirocina  
MR – Medicamento de referência  
MRM – Monitoramento de reações múltiplas  
NIR – *Near-infrared spectroscopy*  
NUDFAC – Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
pH – potencial hidrogeniônico  
PI – Padrão interno  
PK – *Pharmacokinetics*  
PTD – Produto Tópico Dermatológico  
Q1 – Similaridade qualitativa  
Q2 – Similaridade quantitativa  
Q3 – Similaridade microestrutural  
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada  
RNA– *Ribonucleic acid*  
SCB – Sistema de Classificação Biofarmacêutica  
SUPAC – SS - *Guidance for Industry on Scale Up and Post Approval Changes for Semisolids*  
SCPT – Sistema de Classificação de Produtos Tópicos  
PAT– Perda de água transepidermica  
USP – *United States Pharmacopeia*  
UV – Ultravioleta

## LISTA DE SÍMBOLOS

% – porcentagem

m – metro

mm – milímetro

$\mu\text{m}$  – micrômetro

q.s.p – quantidade suficiente para

RPM – rotação por minuto

$^{\circ}\text{C}$  – graus Celsius

mg – miligrama

mL – mililitro

$\mu\text{g}$  – micrograma

cm – centímetro

h – hora

mM – milimolar

M – mol

$\mu\text{m}$  – micrometro

ng – nanograma

$\mu\text{L}$  – microlitro

nm – nanômetros

cm – centímetro

g – grama

s – segundo

Pa.s – Pascal segundo

m/z – relação massa/carga

$r^2$  – coeficiente de determinação

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | 18 |
| <b>2 OBJETIVOS</b> .....  | 22 |
| <b>2.1 Objetivo geral</b> .....   | 22 |
| <b>2.2 Objetivos específicos</b> .....  | 22 |
| <b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....  | 24 |
| <b>3.1 Antibióticos tópicos e MPC</b> .....   | 24 |
| 3.1.1 Antibióticos tópicos .....  | 24 |
| 3.1.2 MPC: Estrutura química, farmacodinâmica e farmacocinética .....   | 24 |
| 3.1.3 MPC: Tratamento de infecções e apresentações comerciais .....   | 25 |
| <b>3.2 A pele</b> .....   | 27 |
| 3.2.1 Pele humana: estrutura e função .....   | 27 |
| 3.2.2 Penetração cutânea de fármacos: vias e estratégias .....  | 30 |
| 3.2.3 Produtos tópicos dermatológicos e o desenvolvimento de produtos tópicos genéricos .....                 | 33 |
| 3.2.4 Pele animal .....   | 34 |
| <b>3.3 BE/BD DE PTD: Técnicas de análise</b> .....  | 35 |
| <b>3.4 BE de PTD: Aspectos regulatórios nacionais e internacionais</b> .....                                  | 41 |
| <b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....  | 45 |
| <b>4.1 Formulações e insumos</b> .....  | 45 |
| <b>4.2 Desenvolvimento e validação dos métodos analíticos e bioanalíticos para quantificação da MPC</b> ..... | 45 |
| 4.2.1 Desenvolvimento do método analítico por CLAE-UV .....   | 45 |
| 4.2.2 Validação do método analítico por CLAE-UV .....   | 46 |
| 4.2.3 Desenvolvimento do método por LC-MS/MS .....  | 47 |
| 4.2.4 Validação do método por LC-MS/MS .....  | 48 |
| 4.2.4.1 Soluções padrão .....   | 48 |
| 4.2.4.2 Análise cromatográfica .....  | 48 |
| 4.2.4.3 Linearidade .....   | 48 |
| 4.2.4.4 Seletividade e especificidade .....   | 48 |
| 4.2.4.5 Precisão e exatidão .....   | 49 |
| 4.2.4.6 Estabilidade das amostras .....   | 49 |
| 4.2.4.7 Recuperação .....   | 50 |
| 4.2.4.8 Efeito matriz .....   | 50 |
| <b>4.3 Equivalência farmacêutica</b> .....  | 50 |
| 4.3.1 Características Organolépticas .....  | 50 |
| 4.3.2 pH .....  | 51 |
| 4.3.3 Densidade aparente .....  | 51 |
| 4.3.4 Espalhabilidade .....   | 51 |
| 4.3.5 Comportamento Reológico e viscosidade aparente .....  | 51 |
| 4.3.6 Teor .....  | 52 |
| 4.3.6.1 Preparação das amostras .....   | 52 |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.3.6.2 Cálculo do teor .....  | 52        |
| <b>4.4 Estudo de liberação <i>in vitro</i> da MPC</b> .....  | <b>52</b> |
| 4.4.1 Seleção do meio receptor .....   | 52        |
| 4.4.2 Preparo da membrana sintética hidrofílica .....  | 53        |
| 4.4.3 Montagem das células de Franz .....  | 53        |
| 4.4.4 Coleta e quantificação das amostras .....  | 53        |
| 4.4.5 Análise da cinética de liberação <i>in vitro</i> .....   | 54        |
| 4.4.6 Análise comparativa das taxas de liberação .....   | 54        |
| <b>4.5 Estudo de permeação/retenção e de dermatofarmacocinética (DPK) <i>in vitro/ in vivo</i> da MPC</b> .....              | <b>54</b> |
| 4.5.1 Procedimento do estudo de permeação/retenção e de DPK <i>in vitro</i> em pele da região dorsal do porco                | 54        |
| 4.5.2 Procedimento do estudo de DPK <i>in vivo</i> em voluntários humanos sadios .....                                       | 55        |
| 4.5.2.1 Comitê de ética e seleção dos voluntários .....  | 55        |
| 4.5.2.2 Tolerabilidade .....   | 56        |
| 4.5.2.3 Estudo de Bioequivalência <i>in vivo</i> de formulações contendo MPC através da DPK .....                            | 56        |
| 4.5.2.4 Análise dos dados para avaliação da Bioequivalência .....  | 57        |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | <b>60</b> |
| <b>5.1 Validação dos métodos analítico e bioanalítico</b> .....  | <b>60</b> |
| 5.1.1 Validação analítica do método por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de ultravioleta (CLAE-UV)..... | 60        |
| 5.1.1.1 Seletividade e especificidade .....  | 60        |
| 5.1.1.2 Linearidade .....  | 60        |
| 5.1.1.3 Precisão, exatidão e repetibilidade .....  | 61        |
| 5.1.2 Validação do método por LC-MS/MS .....   | 61        |
| 5.1.2.1 Seletividade e especificidade .....  | 61        |
| 5.1.2.2 Linearidade .....  | 62        |
| 5.1.2.3 Precisão e exatidão .....  | 62        |
| 5.1.2.4 Estabilidade .....   | 63        |
| 5.1.2.5 Efeito Matriz .....  | 63        |
| 5.1.2.6 Recuperação .....  | 63        |
| <b>5.2 Equivalência farmacêutica</b> .....   | <b>64</b> |
| <b>5.3 Estudo de liberação <i>in vitro</i> da MPC</b> .....  | <b>66</b> |
| <b>5.4 Estudo dermatofarmacocinético (DPK) <i>in vitro/ in vivo</i></b> .....  | <b>68</b> |
| 5.4.1 Estudo de DPK <i>in vitro</i> em pele da região dorsal do porco .....  | 68        |
| 5.4.2 Tolerabilidade .....   | 70        |
| 5.4.3 Estudo de DPK <i>in vivo</i> em pele de voluntários sadios e bioequivalência .....                                     | 70        |
| 5.4.4 DPK: pontos críticos e refinamento .....   | 71        |
| <b>6 CONCLUSÃO</b> .....   | <b>74</b> |
| REFERÊNCIAS .....  | 76        |
| ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido .....   | 86        |
| ANEXO B – Submissão ao Comitê de ética e aprovação do estudo .....   | 90        |
| ANEXO C – Comprovante de submissão do artigo .....   | 91        |

# INTRODUÇÃO

---

## 1 INTRODUÇÃO

Os antibióticos revolucionaram a medicina em muitos aspectos, e inúmeras vidas foram salvas sendo, sua descoberta, uma reviravolta na história da humanidade. Infelizmente, o uso destas fármacos tem sido acompanhado pelo rápido aparecimento de cepas resistentes (LIU; POP, 2009). A busca por novos antibióticos, modos de ação e mecanismos de resistência têm sido tópicos de pesquisas produtivas no meio acadêmico (BRYSKIER, 2005) e, até recentemente, na indústria farmacêutica (DAVIES; DAVIES, 2010). Como produtos naturais, eles trazem surpresas e exercícios intelectuais desafiantes em relação à sua natureza química, as vias biossintéticas e o modo de ação bioquímico (BRÖTZE; BUNNER, 2008).

Neste sentido, a mupirocina (MPC), ou ácido pseudomônico A, antibiótico produzido por cepas de *Pseudomonas fluorescens*, destaca-se pela sua estrutura e mecanismo de ação único. Este mecanismo compreende o bloqueio da enzima isoleucina-RNAt-sintetase, ocasionando a inibição da síntese proteica da bactéria. Como este mecanismo não é compartilhado com qualquer outro antibiótico, a MPC apresenta poucos problemas de resistência cruzada com outros agentes antimicrobianos (ECHEVARRÍA, et al., 2003). Em decorrência do seu rápido metabolismo por via sistêmica em ácido mônico, seu principal metabólito, o uso tópico até o momento é a única opção disponível da MPC, uma vez que na pele esse metabolismo ocorre lentamente (CERN et al., 2014). Pacientes com infecções primárias, como impetigo, e secundárias, como queimaduras, encontram na apresentação mupirocina pomada a 2% uma alternativa para o tratamento de suas infecções (ECHEVARRÍA et al., 2003; BACTROBAN®, 2016).

Entretanto, a eficácia de um ativo administrado topicamente dependente, dentre outros fatores, de suas propriedades físico-químicas, do tipo de formulação e do tipo de associação estabelecida com a formulação. Assim, é de se esperar que a eficácia clínica de um produto tópico dermatológico (PTD) dependa amplamente dos componentes da formulação, sendo de grande importância a comprovação da bioequivalência (BE) entre duas formulações distintas que devem ter o mesmo grau de segurança e eficácia (CHANG et al., 2013).

A metodologia para avaliação da BE de ativos de administração oral e sistemicamente absorvidos com base na farmacocinética (PK) está bem estabelecida, porém, o mesmo não é verdadeiro para os medicamentos de aplicação tópica, seja de ação sistêmica ou local (BORDENLENZ et al., 2016). A este respeito, um esforço considerável tem sido dirigido para encontrar alternativas que visam avaliar a BE de PTD de modo a substituir ensaios clínicos que muitas vezes são caros, demorados, de difícil condução e

implicam em um grande número de pacientes (YACOBI et al., 2014). Neste sentido, a proposição de um Sistema de Classificação de Produtos Tópicos (SCPT), como o proposto por Shah (2015), é de grande relevância e se baseia na similaridade qualitativa (Q1) e quantitativa (Q2) dos excipientes, bem como a similaridade da microestrutura da formulação (Q3) da formulação visando facilitar o desenvolvimento de produtos genéricos e reduzir requerimentos regulatórios, assegurando a qualidade dos produtos (SHAH, 2015). Outras abordagens como os estudos de liberação e permeação *in vitro* (IVRT e IVPT), estudos de dermatofarmacocinética (DPK), microdiálise dérmica (MD), *Near-infrared spectroscopy* (NIR), e *confocal Raman spectroscopy* (CRS), também estão a ser consideradas, isoladamente ou em associação, como potenciais estratégias para estabelecer a BE para PTD por pesquisadores e por órgãos reguladores (LU et al, 2016).

No que concerne aos aspectos regulatórios nacionais, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 37/2011, que trata da isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência, permite que a avaliação da bioequivalência do produto tópico, seja substituída por testes de equivalência farmacêutica (EF), descritos na RDC nº 31/2010, desde que o produto teste apresente a mesma concentração do fármaco em relação ao medicamento de referência e excipientes de mesma função, em concentrações compatíveis (BRASIL, 2011). Esses testes envolvem a caracterização físico-química e microbiológica da formulação e fornecem informações importantes sobre os atributos de qualidade dos medicamentos testados (FISHER et al., 2016). Os testes microbiológicos são, naturalmente, não úteis na comparação de produtos, sendo o Brasil o único país do mundo a solicitar-lhes para esse fim. Adicionalmente, a RDC nº 73/2016, que trata das mudanças pós-registro, cancelamento de registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, indica a realização de testes de desempenho *in vitro* comparativo apenas entre a formulação atualmente aprovada e a proposta, seguindo o Capítulo Geral 1724 da Farmacopeia Americana (*General Chapters 1724: Semisolid Drug Products Performance tests*) (BRASIL, 2016). No entanto, é importante destacar, que estes produtos candidatos a genéricos e similares não foram comparados com o medicamento referência utilizando testes de desempenho no momento do registro. Esta flexibilização de exigências proporciona um maior número de PTD genéricos e similares intercambiáveis no mercado brasileiro sem a garantia efetiva em termos de BE, o que evidencia a grande importância de uma readequação da nossa legislação.

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo realizar a classificação da MPC pomada, conforme proposto pelo SCPT utilizando os testes físico-químicos e os testes de liberação *in vitro*, bem como realizar estudos de DPK *in vitro* e *in vivo*, de forma a reconhecer a importância de uma abordagem multifacetada na avaliação de PTD, colaborando assim, com os estudos de BE de PTD no Brasil e no mundo. Para isso, foram utilizadas quatro formulações contendo MPC a 2% na forma farmacêutica pomada, comercializados no mercado nacional como objeto de estudo.

## OBJETIVOS

---

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Realizar o estudo de equivalência farmacêutica e bioequivalência, através de uma abordagem multifacetada para avaliação de produto tópico dermatológico contendo mupirocina 2% na forma farmacêutica pomada.

### 2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar metodologia analítica para o doseamento da MPC provinda dos estudos de liberação *in vitro* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV);
- Desenvolver e validar metodologia analítica para o doseamento da MPC provinda dos estudos de permeação e retenção cutânea *in vitro e in vivo* por *liquid chromatography coupled spectrosopy in tanden* (LC-MS/MS);
- Avaliar a EF dos produtos medicamentosos (característica organolépticas, densidade, viscosidade, reologia, espalhabilidade, pH e teor);
- Realizar o estudo da liberação *in vitro* de formulações selecionadas contendo MPC utilizando membrana sintética (acetato de celulose);
- Classificar as formulações conforme SCPT;
- Realizar estudo *ex vivo de* permeação e retenção cutânea em pele animal (suína);
- Realizar estudo de dermatofarmacocinética (DPK) – *tape-stripping in vitro e in vivo*;
- Correlacionar DPK *in vitro/in vivo* com os demais testes realizados (EF, IVRT, permeação/retenção cutânea).

# REVISÃO DA LITERATURA

---

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Antibióticos tópicos e MPC

##### 3.1.1 Antibióticos tópicos

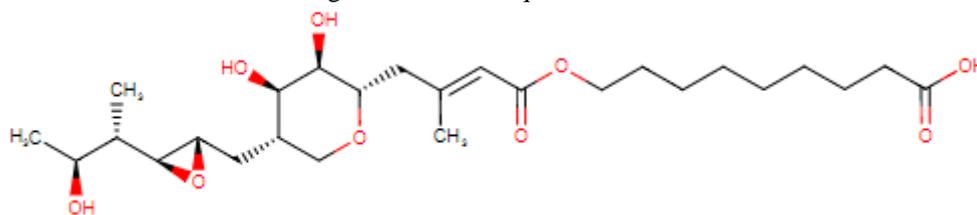
A pele é o principal órgão que protege o corpo de bactérias e outros patógenos do ambiente. Em injúrias como queimaduras e traumas, a pele torna-se vulnerável a invasão microbiana devido à perda de sua integridade e supressão local e sistêmica da imunidade (BARAJAS-NAVA et al., 2013). Como resultado, a infecção local pode não apenas retardar o processo de cicatrização de feridas, mas também pode causar uma infecção sistêmica sob condições severas. A bactéria Gram-positiva mais comum na colonização de feridas, causando infecções, é o *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Antibióticos tópicos são utilizados no tratamento de infecções na pele ou como profilaxia na prevenção de novas infecções (DORRANI et al., 2014).

Os antibióticos tópicos oferecem uma alternativa útil em relação ao uso de agentes orais e parenterais em determinadas condições e apresentam algumas vantagens como: praticidade e facilidade no uso, menos efeitos adversos, concentrações mais elevadas do fármaco na área infectada, menor risco de desenvolvimento de resistência bacteriana, além de apresentar-se normalmente como uma opção econômica. Os objetivos da terapia antimicrobiana tópica são o controle da colonização microbiana, evitando assim o desenvolvimento de infecções invasivas, a profilaxia e o tratamento das infecções de feridas, piodermites, infecções em queimaduras, acne *vulgaris* e erradicação do *Staphylococcus aureus* que coloniza a região nasal. Alguns antibióticos tópicos de escolha incluem bacitracina, neomicina, polimixina B, MPC, nitrofurazona e ácido fusídico (CESUR, 2002).

##### 3.1.2 MPC: Estrutura química, farmacodinâmica e farmacocinética

A MPC é uma substância antimicrobiana constituída de uma mistura de policetídeos (ácidos pseudomônicos) produzidos por *Pseudomonas fluorescens* e foi descrita pela primeira vez em 1971 (LEYDEN, 1990). O ácido pseudomônico A, o qual constitui 90% da mistura, consiste em uma porção de tetrahidropirano insaturado (ácido mônico) ligado a um ácido graxo saturado (ácido 9-hidroxi pentanóico) (ALEXANDER et. al, 1978), conforme apresentado na figura 1.

Figura 1- Estrutura química da MPC.



Fonte: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00410> (Acesso em: 07 dez. 2016).

Esta molécula destaca-se pela sua estrutura e mecanismo de ação único, o qual compreende a inibição de uma enzima, a isoleucina-RNAt-sintetase, ocasionando a inibição da síntese proteica da bactéria. Uma vez que este mecanismo não é compartilhado com qualquer outro antibiótico, a MPC apresenta poucos problemas de resistência cruzada com outros antibióticos. Esta molécula possui atividade *in vitro* contra uma variedade de bactérias Gram-positivas e algumas Gram-negativas, tendo excelente atividade contra estafilococos (incluindo cepas resistentes à meticilina) e streptococos (WARD; CAMPOLI-RICHARDS, 1986; ECHEVARRÍA et al., 2003).

Quando administrada sistemicamente, a MPC possui um curto tempo de meia vida, sendo rapidamente convertido em ácido mônico, seu metabólito inativo, o qual é excretado principalmente através dos rins (WARD; CAMPOLI-RICHARDS, 1986). Assim, o uso tópico até o momento é a única opção disponível da MPC, uma vez que esse metabolismo, na pele, ocorre lentamente (WARD; CAMPOLI-RICHARDS, 1986; CERN et al, 2014). Uma vez presente no estrato córneo, a MPC é eliminada, principalmente, através do movimento ascendente de descamação das células da pele (BAINES et al., 1984; CONLY; JOHNSTON, 2002).

### 3.1.3 MPC: Tratamento de infecções e apresentações comerciais

A MPC tem sido utilizada no tratamento de infecções cutâneas primárias e secundárias. Como indicação terapêutica no tratamento de infecções bacterianas cutâneas primárias, a MPC é utilizada no tratamento de impetigo, e foliculite (PORRAS-LUQUE, 2007).

As infecções bacterianas primárias da pele são causadas principalmente por bactérias piogênicas dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* (WARD; CAMPOLI-RICHARDS, 1986). Alguns fatores predisõem o aparecimento destas infecções, como fatores ambientais, fatores individuais, os quais incluem baixa resistência imunológica e higiene, e fatores relacionados ao grau de virulência e patogenicidade do microorganismo. Um estudo com o objetivo de conhecer e descrever a frequência dos casos de infecções bacterianas primárias da

pele mais comuns na Região Amazônica, evidenciou que dentre as infecções mais prevalentes na região, estão o impetigo e a foliculite (PIRES et al., 2015).

Atualmente, no Brasil, mais de 2 milhões de casos por ano estão relacionados ao impetigo, sendo as crianças entre 3 e 13 anos a população mais afetada (HOSPITAL ISRAELITA ALBERT EINSTEIN, 2017). O impetigo é uma infecção superficial da pele que afeta mais comumente o rosto e as pernas, no entanto, podem atingir outras áreas. As lesões iniciam com máculas eritematosas e evoluem para bolhas superficiais com conteúdo seroso, conforme demonstrado na figura 2 (WARD; CAMPOLI-RICHARDS, 1986; STEVENS, 2012).

Figura 2- Manifestação clínica do impetigo.



Fonte: <https://www.medicinenet.com/impetigo/article.htm> (Acesso em: 07 dez. 2016).

A foliculite é uma inflamação do folículo piloso causada por infecção, irritação química ou dano físico. Caracteriza-se por uma pústula pequena e frágil que ocorre no infundíbulo de um folículo piloso, geralmente no couro cabeludo das crianças, e na área da barba, axila e nádegas dos adultos (figura 3) (WARD; CAMPOLI-RICHARDS, 1986).

Figura 3- Manifestação clínica da foliculite.



Fonte: <http://medifoco.com.br/fotos-de-foliculite/> (Acesso em: 07 dez. 2016).

MPC também é indicada no tratamento de infecções bacterianas cutâneas secundárias, como: dermatite atópica, dermatite eczematosa, dermatites de contato, psoríase, úlceras, e em lesões traumáticas infectadas (WARD; CAMPOLI-RICHARDS, 1986; BACTROBAN®,

2016). De um modo geral, infecções secundárias são caracterizadas por uma inflamação na epiderme e na derme provocando eritema, prurido e exsudatos (WARD; CAMPOLI-RICHARDS, 1986).

A MPC é formulada na forma farmacêutica pomada a 2% em base de polietilenoglicol que é miscível com água ou na forma farmacêutica creme em base de parafina (CONLY; JOHNSTON, 2002). Atualmente, no Brasil, são comercializados sete produtos contendo MPC a 2%, na forma farmacêutica pomada (quadro 1), sendo o Bactroban® produzido pela Glaxosmithkline Brasil LTDA, o medicamento de referência, produto utilizado neste trabalho. No entanto, a lista atualizada de genéricos da ANVISA (junho/2017) traz o produto Bactroban® ainda como referência, e produzido pela Laboratório Prati Donaduzzi & Cia LTDA (ANVISA, 2017).

Quadro 1- Apresentações comerciais nacionais de MPC pomada 2% (anterior a atualização realizada pela ANVISA em junho/2017 e utilizada como base neste trabalho).

| <b>Apresentação</b>  | <b>Fabricante</b>                               | <b>Referência/Genérico/Similar</b> |
|----------------------|---|------------------------------------|
| -MPC 20mg/g - Pomada | Glaxosmithkline brasil LTDA                     | Referência (Bactroban®)            |
| MPC 20mg/g - Pomada  | Prati donaduzzi & cia LTDA                      | Genérico                           |
| MPC 20mg/g - Pomada  | Cristália produtos químicos farmacêuticos LTDA  | Genérico                           |
|                      |   | Similar (Murici®)                  |
| -MPC 20mg/g - Pomada | Valeant Farmacêutica do Brasil LTDA             | Similar (Bacrocina®)               |
| MPC 20mg/g - Pomada  | EMS S/A   | Similar (Dermopirox®)              |
| -MPC 20mg/g - Pomada | Brainfarma indústria química e farmacêutica S.A | Similar (Bactroneo®)               |

Fonte: Autoria própria.

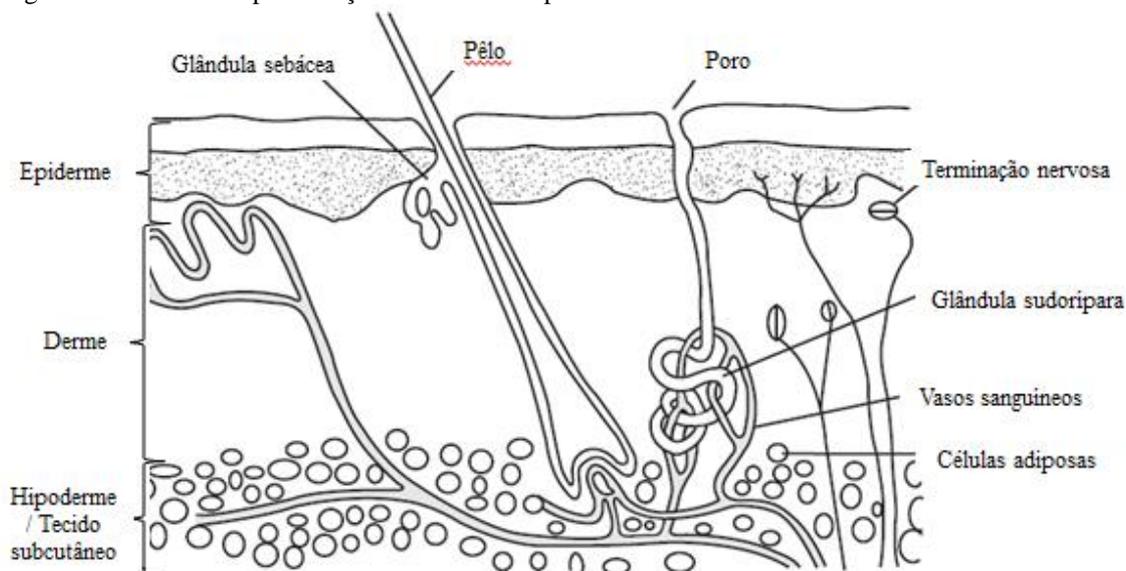
## 3.2 A pele

### 3.2.1 Pele humana: estrutura e função

A pele é o maior órgão do sistema tegumentar em humanos com uma área superficial de cerca de 2 m<sup>2</sup> e espessura variando de 0,5 a 4 mm. Ela apresenta várias funções, tais como o fornecimento de uma barreira de proteção do ambiente exterior e regulação da temperatura corporal (CHANG et al, 2013).

A pele é formada por três camadas: epiderme, derme e hipoderme (tecido subcutâneo), da mais externa para a mais profunda, respectivamente (figura 4) (GILABERTE et al, 2016; MURTHY; SHIVAKUMAR, 2010; BEMVINDO, 2006)

Figura 4- Anatomia da pele: secção transversal da pele mostrando diferentes estratos e anexos.



Fonte: Adaptado de MURTHY; SHIVAKUMAR, 2010.

A epiderme é formada pelo estrato córneo (EC), que é a camada mais externa, e a epiderme viável. O estrato córneo apresenta uma espessura de apenas 15 a 20  $\mu\text{m}$  e é considerada a principal barreira à permeação dos fármacos na pele, por isso merece atenção especial (HADGRAFT, 2001; BRONAUGH; MAIBACH, 2005; GOEBEL, 2012). Esta camada é constituída por células epidérmicas mortas ou em via de degeneração ricas em queratina, parcialmente dessecadas, chamadas de corneócitos e domínios intercelulares compostos por uma mistura única de lipídios (ELIAS, 1983). Sua função é neutralizar a perda de água e os sais da pele e a penetração de substâncias solúveis em água, atuando como uma função protetora (WERTZ; VAN DEN BERGH, 1988; BOUWSTRA et al., 2006). A barreira que rege a permeação da água não é absoluta. O movimento normal da água do estrato córneo para a atmosfera é conhecida como perda de água transepidérmica (PAT). As medições da PAT podem ser úteis para identificar danos causados por certas substâncias químicas, injúrias físicas (como *tape stripping*), ou condições patológicas como eczema, uma vez que as taxas de PAT aumentam na proporção do nível de dano (BARONE et al., 2012). Além dos lipídios, o manto ácido do EC também parece ser importante para a função barreira da pele. A pele tem uma superfície ácida que pode ter uma função importante na prevenção de infecção, entretanto, a origem do pH ácido na superfície da pele permanece conjectural. O pH cutâneo é afetado por um grande número de fatores endógenos, como umidade, suor, sebo e predisposição genética, e por fatores exógenos, como surfactantes, produtos cosméticos, curativos oclusivos e antibióticos tópicos. Mudanças no pH estão relacionadas na patogênese de doenças dermatológicas, como dermatite de contato e dermatite atópica (WILHELM;

MAIBACH, 1990; ELIAS, 2005). O quadro 2 resume as principais funções do EC na proteção dérmica em mamíferos.

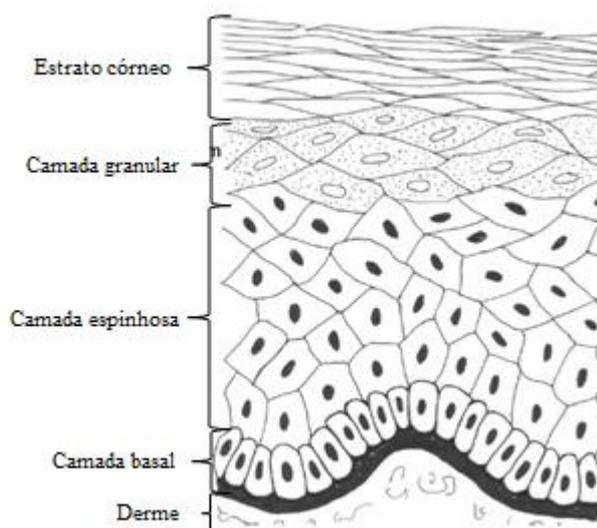
Quadro 2- Funções de proteção do estrato córneo de mamífero.

| <b>Função</b>   | <b>Localização</b> |
|---|--------------------|
| Barreira de permeabilidade                                | Extracelular       |
| Coesão (integridade) → descamação                         | Extracelular       |
| Barreira antimicrobiana (imunidade inata)                 | Extracelular       |
| Barreira mecânica (impacto e resistência ao cisalhamento) | Corneócitos        |
| Barreira contra quimiotóxicos e antígenos                 | Extracelular       |
| Absorção química seletiva                                 | Extracelular       |
| Hidratação  | Corneócitos        |
| Barreira contra raios ultravioletas (UV)                  | Corneócitos        |
| Iniciação de inflamação (ativação de citoquinas)          | Corneócitos        |
| Interface psicossensorial                                 | Desconhecidos      |
| Barreira térmica  | Desconhecidos      |

Fonte: Adaptado de ELIAS, 2005.

Assim, qualquer modificação na diferenciação epidérmica e composição lipídica resulta em função de barreira alterada, um evento central em várias alterações e doenças dermatológicas (GOEBEL, 2012; HADGRAFT, 2001). 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 (figura 5). 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 (MELO, 2012; WICKETT; VISSCHER, 2006).

Figura 5- Diagrama da epiderme mostrando as principais camadas.



Fonte: Adaptado de WICKETT; VISSCHER, 2006.

A derme apresenta alta vascularização e é constituída por fibras colágenas e elásticas, fornecendo um bom suporte mecânico, compacto e flexível. A partir da derme emergem os apêndices cutâneos como folículos pilosos e glândulas sebáceas. A derme contém inúmeras

células, incluindo fibroblastos e macrófagos. Os fibroblastos são responsáveis pela síntese e a renovação da matriz extracelular, enquanto que os macrófagos contribuem para eliminar corpos estranhos e reparar o tecido danificado (BARONI et al., 2012).

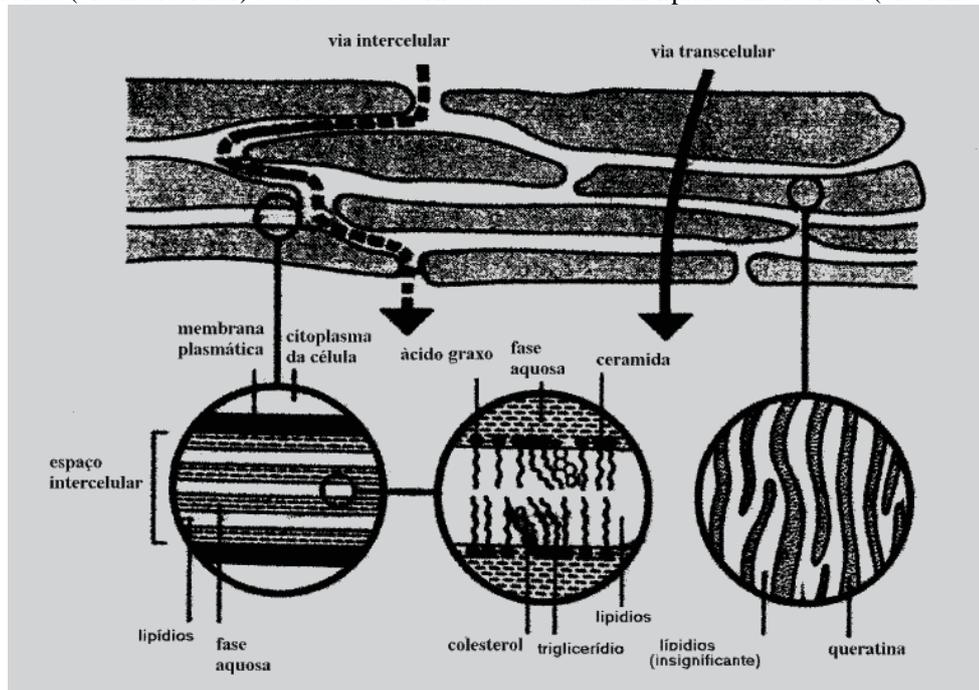
A região mais interna da pele humana, a hipoderme ou tecido subcutâneo, oferece proteção mecânica, isola o corpo contra calor externo e frio, e é ativo no metabolismo e armazenamento de energia em geral (MURTHY; SHIVAKUMAR, 2010; BARRY, 1983).

No geral, a derme e a hipoderme são as barreiras cutâneas mais efetivas contra estresses traumáticos e térmicos. (BARONI et al., 2012)

### 3.2.2 Penetração cutânea de fármacos: vias e estratégias

O EC constitui a principal barreira para a absorção percutânea de substâncias exógenas, como os fármacos (MADISON, 2003). Trata-se de um processo complexo mediado pelos seguintes mecanismos: absorção transcelular (através dos corneócitos envolvidos com queratina); absorção intercelular (em torno dos corneócitos em regiões extracelulares ricas em lípidos) e absorção através de apêndices (pelos folículos pilosos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas). As rotas intercelular e transcelular são consideradas as mais importante para a permeação de produtos químicos através da pele, tal como pode ser observado na figura 6 (BOUWSTRA et al., 2001; SUHONEN et al., 1999).

Figura 6- Vias de permeação do fármaco através do estrato córneo, através da matriz lipídica entre os corneócitos (via intercelular) e através dos corneócitos e da matriz lipídica intercelular (via transcelular).



Fonte: Adaptado de SUHONEN et al., 1999.

Apesar da absorção através dos apêndices cutâneos não contribuírem de forma significativa para penetração (menos de 0,1%), esta rota pode ser importante em momentos iniciais após a aplicação e em áreas com grande densidade de apêndices cutâneos, funcionando com um reservatório para alguns medicamentos (SUHONEN et al., 1999; KIELHORN et al., 2006).

A previsão da absorção dérmica é um tema de pesquisa importante e relaciona-se com a otimização da entrega de substâncias ativas, bem como com o risco a ela conjugado (TSAKOVSKA et al., 2017). Apesar de complexidade da pele, a lei de difusão proposta por Fick, geralmente pode ser usada para analisar e prever dados de permeação (BARRY, 1999). A primeira lei de Fick é usada para descrever o estado de equilíbrio de difusão e pode ser simplificada, conforme equação 1, em (HADGRAFT, 2001):

$$J = \frac{DK\Delta c}{h} \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde:

J: é o fluxo por unidade de área

D: é o coeficiente de difusão na pele

K: é o coeficiente de partição entre a pele e o veículo

$\Delta c$ : é a diferença de concentração do fármaco entre o veículo e a pele

h: distância difusional a ser percorrida (espessura da pele)

Considerando um sistema bicompartimental, onde existe uma membrana semipermeável, separando dois meios (doador e receptor) e mantendo-se as condições *sink*, a quantidade acumulada de fármaco (m) que atravessa a membrana, por unidade de área (cm<sup>2</sup>) e em função do tempo (t) até atingir o equilíbrio pode ser expressa pela equação 2 (AULTON, 2005; SATO, 2007):

$$J = \frac{dm}{dt} = \frac{D \cdot C_0 \cdot K}{h} \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde:

dm é a derivada da massa;

dt é a derivada do tempo;

C<sub>0</sub> é a concentração do fármaco na solução doadora;

K é o coeficiente de partição do soluto entre a membrana e o veículo e;

h é a espessura da membrana.

O coeficiente de partição (K) é a razão da solubilidade do fármaco na pele (Sp) pela solubilidade do fármaco no veículo (Sv):

$$K = \frac{S_p}{S_v} \quad (\text{Equação 3})$$

Logo, o fluxo de fármaco através da pele, J, aumenta com:

- O incremento do coeficiente de difusão do fármaco na pele (D) e com a solubilidade do fármaco na pele (Sp);
- O aumento de concentração de fármaco no veículo ( $\Delta c$ ) ou com o decréscimo da sua solubilidade no veículo (Sv). (MARTINS;VEIGA, 2002)

Assim, saturação do ativo no veículo, fornece uma força motriz maior para o transporte através da pele, aumentando a atividade termodinâmica (CHANG et al., 2013). Nesse contexto, entende-se atividade termodinâmica como a “tendência a escapar”, ou seja, a força para que o fármaco seja liberado do veículo e penetre na pele. Uma vez que a concentração terapêutica da forma farmacêutica geralmente não pode ser alterada, os formuladores podem otimizar a solubilidade de um fármaco, por meio do controle da composição do veículo (BARRY, 2005). Os promotores de permeação químicos são a alternativa mais frequentemente utilizada em formulações semissólidas e transdérmicas. São compostos desprovidos de ação farmacológica, que quando incorporados em uma formulação podem permear ou interagir com os componentes do estrato córneo, reduzindo a resistência da pele à difusão do fármaco e incrementando o coeficiente de partição do mesmo (MARTINS; VEIGA, 2002; STORPIRTIS et al, 2009). Possuem ainda capacidade de hidratação cutânea, de alteração da composição, propriedades físico-químicas e disposição lipídica e protéica do EC, diminuindo de modo reversível, a sua função barreira e/ou aumentando o coeficiente de partição do fármaco favorecendo sua difusão através da pele (MELO, 2012; SILVA et al., 2010). À exemplo, formulações contendo MPC, apresentam polietilenoglicol, compondo seu veículo base, constituindo uma pomada hidrofílica e conferindo boa solubilidade para o fármaco no veículo. Além disso, a pele ocluída, por aplicação de pomada, pode reter quantidades significativas de água transepidermal e facilitar ainda mais o transporte do ativo através da pele hidratada (CHANG et al., 2013; FRUIJTIER-PÖLLOTH, 2005).

Há ainda, outras técnicas/estratégias para promover o aumento da penetração dos fármacos na pele, que são os métodos físicos, estes, atuam favorecendo a penetração de compostos no estrato córneo por alterar temporariamente e reversivelmente essa barreira (LIRA et al., 2004; GOEBEL, 2012). Podem ser citadas como técnicas físicas a iontoforese, a

sonoforese, a eletropermeabilidade e a magnetização (BARRY, 2005; CHORILLI et al., 2007).

### *3.2.3 Produtos tópicos dermatológicos e o desenvolvimento de produtos tópicos genéricos.*

PTD oferecem uma alternativa útil no tratamento de uma variedade de desordens e apresentam como vantagens: a praticidade e facilidade no uso, menos efeitos adversos quando comparado a outras vias, além de ser normalmente uma opção econômica (CHANG et al., 2013).

PTD podem ser subdivididos em duas categorias:

- Sistemas transdérmicos, cujo objetivo é a absorção dos fármacos pela circulação sanguínea para tratamento de doenças sistêmicas;
- Formulações dermatológicas tópicas para o tratamento local de doenças sendo a pele o órgão-alvo.

Apesar de possuírem características e objetivos distintos, a eficácia de ambos dependerá da liberação do fármaco da formulação que o contém e de sua penetração/difusão pelas camadas da pele (SHAH et al., 1991). Ambas as etapas são dependentes das propriedades físico-químicas do fármaco, do veículo e da barreira da pele (OSTRENGA; STEINMETZ; POULSEN, 1971; NISHIHATA et al., 1988).

Neste sentido, uma atenção especial deve ser dirigida para os excipientes, visto que diferentes tipos de excipientes podem gerar um impacto significativo nos atributos de qualidade de um medicamento. Além disso, diversos estudos têm demonstrado que a escolha do(s) excipiente(s) influencia(m) diretamente a penetração do ativo na pele (MUGGLESTONE et al., 2012; WATKINSON et al., 2011; SANTOS et al., 2010; LIRA et al., 2004; HADGRAFT et al., 2003).

Assim, para garantir a equivalência farmacêutica e terapêutica de fórmulações genéricas em relação ao medicamento de referência, é prudente usar informações contidas nas patentes publicadas na literatura, juntamente com os dados obtidos no processo de engenharia reversa. O objetivo principal de uma formulação genérica tópica é ter a mesma composição quantitativa (Q1) e qualitativa (Q2) que o medicamento de referência (MR). Além disso, é possível que a formulação genérica se apresente sensível às mudanças do processo de fabricação. Isto pode ser atribuído ao fato de que o processo de fabricação pode ter um impacto profundo sobre a microestrutura da formulação (Q3). Logo, alcançar um arranjo semelhante ao MR (Q3) também é um dos principais objetivos do processo de

desenvolvimento de medicamentos genéricos (MG) (CHANG et al.,2013; SHAH, 2009; LIONBERGER, 2005).

Em resumo, é essencial gerenciar os efeitos das variáveis do processo sob os atributos de qualidade do MG (Q1/Q2/Q3) em relação ao MR para que tanto o sucesso técnico quanto o regulamentar possa ser garantido (CHANG et al., 2013). Entretanto a legislação brasileira não considera importante a manutenção da similaridade Q1, Q2 e Q3, sendo os aspectos regulatórios nacionais e internacionais detalhados no item 3.4

#### 3.2.4 *Pele animal*

Estudos de permeação em pele animal desempenham um papel essencial na seleção de formulações contendo fármacos para uso tópico, e, portanto, a escolha de modelos *in vitro* preditivos de permeação é altamente importante (ARAUJO, 2016). Apesar da pele humana excisada, ser considerado o modelo mais apropriado (padrão-ouro) para experiências de permeação e penetração *in vitro*, algumas desvantagens levam a usar outros modelos. As principais desvantagens incluem pouca conveniência, dificuldade de obtenção e baixo nível de padronização devido à variabilidade relacionada ao gênero, raça, idade e local anatômico do doador (PRAÇA et al, 2017).

Numerosos modelos de pele animal de vários mamíferos, roedores e répteis são utilizados como substitutos à pele humana. (VECCHIA; BUNGE, 2006; WALKER et al., 1983). Em geral, a pele de primatas e de porco são modelos mais bem aceitos do que a pele de roedores, uma vez que a pele de roedores tende a sobrestimar a permeação (MEYER et al., 1978; MONTEIRO-RIVIERE; RIVIERE, 1996; REIFENRATH; SPENCER, 1985; WESTER; MAIBACH, 1977). Por razões éticas, a pesquisa de primatas é restrita e a pele de porco, além de ser facilmente obtida a partir de matadouros, suas propriedades bioquímicas e histológicas foram repetidamente demonstradas como semelhantes à pele humana (CALABRESE, 1984; MEYER et al., 1978; MONTEIRO-RIVIERE; RIVIERE, 1996). No Brasil, em se tratando da regulamentação ética sobre o uso de animais em pesquisas, o Conselho Nacional De Controle De Experimentação Animal (CONCEA), publicou em 2 de fevereiro de 2016 a Resolução Normativa nº 30, que traz a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA). Esta resolução delega ao responsável pela atividade e sua equipe que cadáveres ou parte deles oriundos das atividades de matadouros, frigoríficos, abatedouros ou produtores rurais para consumo mantenha a documentação que evidencia a origem do animal de forma inequívoca,

bastando a evidência ser nota fiscal de compra, recibo, fotografias ou documentos oficiais dos serviços de vigilância, dentre outros aplicáveis.

Em termos de permeabilidade a pele de porco também é um excelente substituto ao uso da pele humana. Um estudo conduzido por Barbero e colaboradores em 2009, reuniu 18 estudos de 26 diferentes substâncias químicas confirmando ser a pele de porco um excelente modelo em substituição a pele humana para os compostos avaliados. No entanto, é importante destacar que, o modelo de pele animal eleito em substituição à pele humana, dependerá do propósito final do estudo e da substância sob investigação (BARBERO et al., 2009). Além disso, embora, estudos *in vitro* de permeação/penetração de fármacos utilizando modelos animais em substituição a modelos humanos sejam numerosos na literatura, os mesmos estão sujeitos a uma grande variabilidade. Assim, cuidados como: a procedência do animal a ser utilizado, a dermatomização da pele, seu grau de hidratação e seu armazenamento, representam um desafio com relação padronização e reprodutibilidade do método (PRAÇA, 2017).

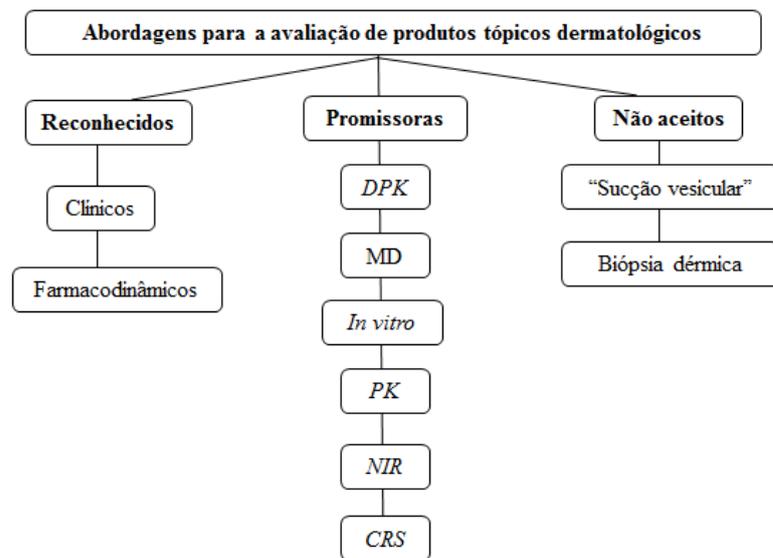
### **3.3 BE/BD DE PTD: Técnicas de análise.**

A avaliação da BE destina-se a fornecer informações comparativas sobre a segurança e eficácia dos produtos com base em suas BD relativas. A determinação da BD de produtos sistemicamente absorvidos é definida como a velocidade e a extensão na qual o princípio ativo é absorvido a partir do produto medicamentoso se tornando disponível em seu local da ação (KANFER, 2010). Assim, é de extrema importância, do ponto de vista clínico e regulatório, realizar um estudo de avaliação da BE para garantir que a formulação genérica seja terapeuticamente equivalente ao seu MR. (LU et al., 2016).

A avaliação da BE de PTD de ação local provou ser bastante difícil e desafiadora (KANFER, 2010). A depender do país, a avaliação da BE é tratada de forma diferente conforme detalhamento descrito no item 3.4. De uma maneira geral, com exceção de corticosteróides tópicos cutâneos, cujo método farmacodinâmico mede o branqueamento da pele no local de ação em função do tempo provocado por esta classe terapêutica, o padrão ouro para estabelecer a BE da maioria dos produtos tópicos dermatológicos ainda são os estudos com desfechos clínicos, que normalmente, são caros, demorados e muitas vezes associados a um alto grau de variabilidade e baixa sensibilidade na detecção das diferenças das formulações (RANEY et al., 2015; KRISHNAIAH et al., 2014; YACOBI et al., 2014; JAIN, 2014). Outros métodos, tais como a ‘sucção vesicular’ e a biópsia da pele, têm sido utilizados para determinar a concentração do fármaco na pele humana, no entanto estes

métodos apresentam alguns inconvenientes devido à sua natureza agressiva, podendo causar cicatrizes permanentes. Assim, as agências regulatórias, juntamente com as indústrias farmacêuticas, têm avançando no desenvolvimento de novas abordagens para avaliação da BE dos PTD. Estas abordagens promissoras incluem o estudo dermatofarmacocinética (DPK), microdiálise dérmica (MD), estudos *in vitro*, estudo farmacocinético (PK), *near-infrared spectroscopy* (NIR) e *confocal Raman spectroscopy* (CRS) (figura 7) (LU et al., 2016).

Figura 7- Abordagens para a avaliação de PTD.



Fonte: Adaptado de LU et al., 2016.

No que diz respeito aos estudos *in vitro*, o modelo mais utilizado é o sistema de difusão seguindo o modelo de células vertical proposto por Franz em 1975 (FRANZ, 1975). Neste sistema de células de difusão bicompartimentais, pode-se utilizar tanto a membrana sintética quanto tecido cutâneo, separando um compartimento doador de um compartimento receptor, para conhecer o comportamento de cedência ou biofarmacêutico de uma formulação, no que diz respeito a penetração e/ou permeação do fármaco (figura 8) (STORPITIS et al., 2009).

Figura 8- Células de difusão de Franz automatizadas.



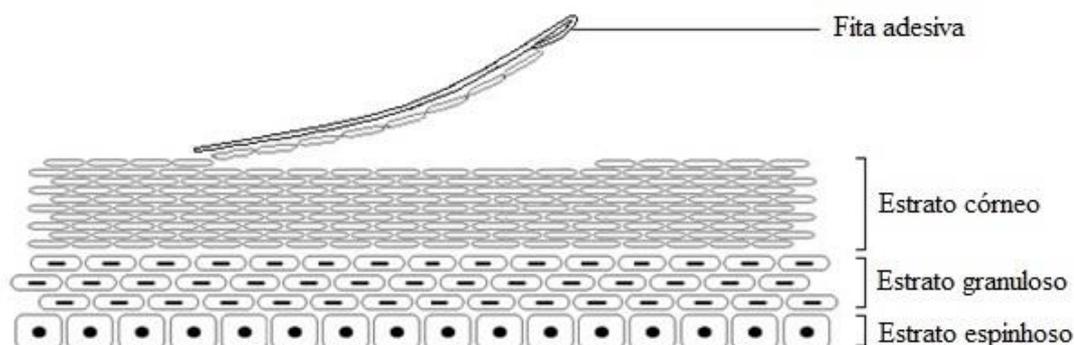
Fonte: [http://www.easyfairs.com/events\\_216/lab-innovations-lausanne-2016\\_77587/lab-innovations-lausanne-2016\\_77799/exhibitors-products\\_77853/exhibitor-catalogue\\_77857/stand/598398/](http://www.easyfairs.com/events_216/lab-innovations-lausanne-2016_77587/lab-innovations-lausanne-2016_77799/exhibitors-products_77853/exhibitor-catalogue_77857/stand/598398/) (Acesso em 20 dez. 2017).

Variáveis chave no processo de difusão incluem a escolha do meio/solução receptor(a) e a membrana usada no teste. O meio receptor deve solubilizar o fármaco suficientemente para garantir as condições *sink* (SHAH; ELKINS; WILLIAMS, 1999). O teste de liberação *in vitro* que até então tinha sua aplicabilidade voltada para avaliar indicadores de desempenho da formulação, ou seja, partição ou cedência do veículo para o fluido receptor, uma vez que não mimetiza o comportamento *in vivo*, começa a ganhar novas perspectivas. Shah (2015) através do sistema de classificação de produtos tópicos (SCPT) detalhada mais adiante, expande o uso desta metodologia para avaliar a qualidade do produto genérico, em termos de microestrutura (Q3) em relação ao seu produto de referência. Assim os dados de IVRT poderiam auxiliar a avaliação da BE entre as formulações sem a necessidade de testes clínicos, inclusive alguns esboços de guia já tem executado a avaliação de PTD desta maneira e nosso estudo corrobora com estes guias (SHAH, 2015; FDA, 2012a; FDA, 2017a; FDA, 2012b; FDA, 2013; FDA, 2017b).

Outro método utilizado tanto *in vitro* quanto *in vivo* é a DPK. Neste método, as camadas de estrato córneo são removidas sequencialmente, utilizando a técnica de *tape-stripping* (figura 9), e a concentração de fármaco no estrato córneo é medida em função do tempo pós- aplicação e pós-remoção do produto testado (JAIN, 2014; AU et al., 2010).

Figura 9- Representação da técnica de *tape stripping* através da remoção de uma camada de estrato córneo com uma fita adesiva.

Fonte: Adaptado de AU et al, 2010.



O principal pressuposto por trás da metodologia, é que a quantidade de fármaco recuperado do estrato córneo, principal barreira da absorção percutânea, está diretamente relacionada à quantidade de ativo que alcança as células-alvo. Assim, a concentração do fármaco no estrato córneo em função do tempo para dois produtos pode então ser comparada quanto à BE (BRADDY et al., 2015). Em 1998, a *Food and Drug Administration* (FDA) publicou o ‘esboço’ de um guia para avaliação de métodos DPK, utilizados na bioequivalência de PTD. O ‘esboço’ do guia foi retirado em 2002, após os resultados inconsistentes entre dois estudos. Considerando que a DPK é uma metodologia mais barata, mais rápida, que necessita de um menor número de voluntários em relação aos testes clínicos e na teoria pode ser aplicada a todos os fármacos de uso tópico, vários estudos tiveram como objetivo a identificação dos problemas e limitações do guia original de DPK levando a um processo de refinamento da técnica para a produção de dados com qualidade, reprodutibilidade e sensibilidade para demonstrar pequenas diferenças entre formulações (FDA, 1998; FDA, 2002; BRADDY et al., 2015).

A MD é uma técnica para a medição em tempo real da taxa e extensão da penetração de fármacos na pele, sendo capaz de determinar a concentração de fármacos no local de ação em quase todos os tecidos humanos. Uma das vantagens mais importantes deste método no que trata da avaliação de PTD é a possibilidade de utilização de peles saudáveis e doentes. No entanto, MD é um procedimento relativamente invasivo e que pode causar inflamações transitórias. Ao mesmo tempo, a depender da profundidade de inserção da sonda, os resultados podem apresentar uma maior variação (KANFER, 2015; LU et al., 2016).

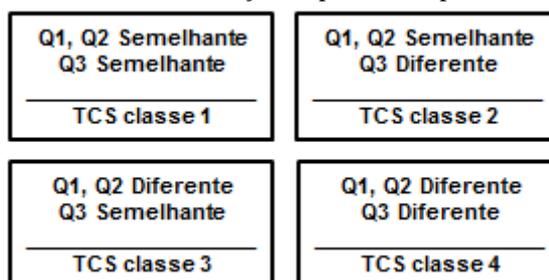
Com relação ao método farmacocinético (PK), como mencionado anteriormente, os níveis sanguíneos não são uma medida adequada do medicamento presente no local de ação

para avaliação de PTD. No entanto, para medicamentos contendo lidocaína 5% que devem ser aplicados na pele para anestesia local os dados farmacocinéticos (PK) são aceitos para demonstrar a BE. Neste caso, o fármaco atinge concentrações suficientes na circulação sanguínea para ser detectado e o nível de fármaco no plasma é proporcional à quantidade de medicamento no local de ação (nervos do tecido dérmico) (JAIN, 2014).

A *near-infrared spectroscopy* (NIR) e a *confocal Raman spectroscopy* (CRS) são duas abordagens *in vivo* não invasivas utilizadas no monitoramento em tempo real da penetração de fármacos em toda a pele. Entretanto, tanto o NIR como o CRS exigem que a molécula de interesse possua picos espectrais distintos com intensidade suficiente para quantificação (LU et al, 2016).

Uma outra abordagem no âmbito da bioequivalência de PTD, tem sido proposta por Shah e colaboradores (SHAH et al., 2015). Tal como o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) baseia-se em princípios científicos sólidos e levou a um grande sucesso na promoção do desenvolvimento de produtos genéricos sólidos orais, os autores propuseram um Sistema de Classificação para Produtos Tópicos (SCPT) baseado em sua composição e propriedades físico-químicas (Q1 e Q2) e usa o teste de liberação *in vitro* como ferramenta para estimar a qualidade do produto em relação a Q3, conforme mostrado na figura 10.

Figura 10- Sistema de Classificação de produtos tópicos, SCPT.

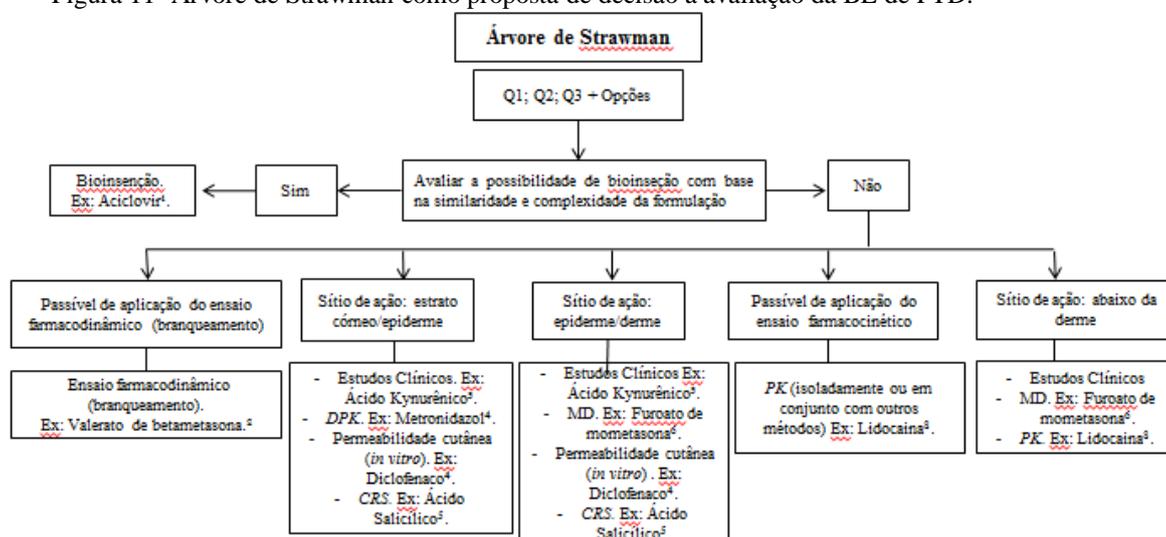


Fonte: Adaptado de SHAH, 2015.

Neste sentido, apenas os PTD SCPT classe 1 e 3, poderiam ser considerados BE e uma permuta entre o MG e o MR poderia ser admitida, sem a necessidade da realização de estudos clínicos. No entanto medicamentos SCPT classe 2 e 4 necessitariam de estudos *in vivo* para comprovação da BE. A admissão do SCPT para PTD por agências regulatórias facilitaria, substancialmente, o desenvolvimento e aprovação de PTD genéricos e, conseqüentemente, mais medicamentos tópicos com segurança comprovada e custo razoável estariam disponíveis para os pacientes.

Como cada abordagem de avaliação de BE tem seus próprios méritos e limitações, pode-se adotar uma integração de múltiplas abordagens para facilitar a determinação bem-sucedida da BE entre o PTD genérico e o seu MR correspondente (LU et al., 2016). Como suporte, Yacobi e colaboradores apresentam uma proposta (árvore de Strawman) com sugestões de tomadas de decisões para avaliação da BE de PTD, conforme demonstrado na figura 11 (YACOBI et al., 2014) corroborando com o previsto por Franz (2011), no que condiz a uma abordagem sistemática e que depende principalmente do alvo terapêutico e, em segundo lugar, do tipo de veículo em que o fármaco é formulado com ênfase na equivalência do Q3 (figura 12) (LIONBERGER, 2004).

Figura 11- Árvore de Strawman como proposta de decisão á avaliação da BE de PTD.



<sup>1</sup>USA. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration (FDA). Administration, Office of Generic Drugs. **Draft guidance on acyclovir ointment**. 2012.

<sup>2</sup>DEMANA, P.H. et al. Evaluation of the proposed FDA pilot dose response methodology for topical corticosteroid bioequivalence testing. *Pharm Res* 1997;14:303-308.

<sup>3</sup>PAPP, A.; HARTWELL, R.; EVANS, M.; GHAHARY, A. The safety and tolerability of topically delivered kynurenic acid in humans. A Phase 1 Randomized Double-Blind Clinical Trial. *J. Pharm. Sci.* doi: 10.1016/j.xphs.2018.01.023. 2018.

<sup>4</sup>ARAÚJO, T. P. et al. Topical bio(in)equivalence of metronidazole formulations *in vivo*. *Int J Pharmaceut.*, 541, p. 167-172, 2018.

<sup>5</sup>CORDERY, S. F. et al. Topical bioavailability of diclofenac from locally-acting, dermatological formulations. *Int J Pharmaceut.*, 529 (1-2), p. 55-64, 2017.

<sup>6</sup>MATEUS, R. et al. Percutaneous absorption of salicylic acid - *in vitro* and *in vivo* studies. *Int J Pharmaceut.* http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.08.061. 2014.

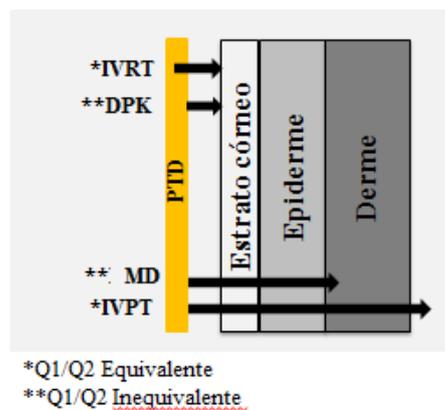
<sup>7</sup>GAO, Q. et al. Microdialysis as a tool to determine the skin concentration of mometason furoate in rats. *Pharmazie*, 69: 787-791, 2014.

<sup>8</sup>USA. Department of health and human services. Food and Drug Administration (FDA). Administration, Office of Generic Drugs. **Draft guidance on lidocaine and Prilocaine cream**. Disponível em:

<<https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM428209.pdf>> Acesso em 15 de jan. de 2018.

Fonte: Adaptado de YACOBI et al., 2014.

Figura 12- Abordagem sistemática para a seleção de um teste de substituição adequado para estabelecer a BE de PTD.



Fonte: Adaptado de FRANZ, 2011.

Em resumo a escolha do método apropriado para avaliação da BE de PTD deve ser baseada numa abordagem multifacetada, adaptada ao ativo e ao alvo da doença a que se destina (YACOBI et al., 2014).

### 3.4 BE de PTD: Aspectos regulatórios nacionais e internacionais

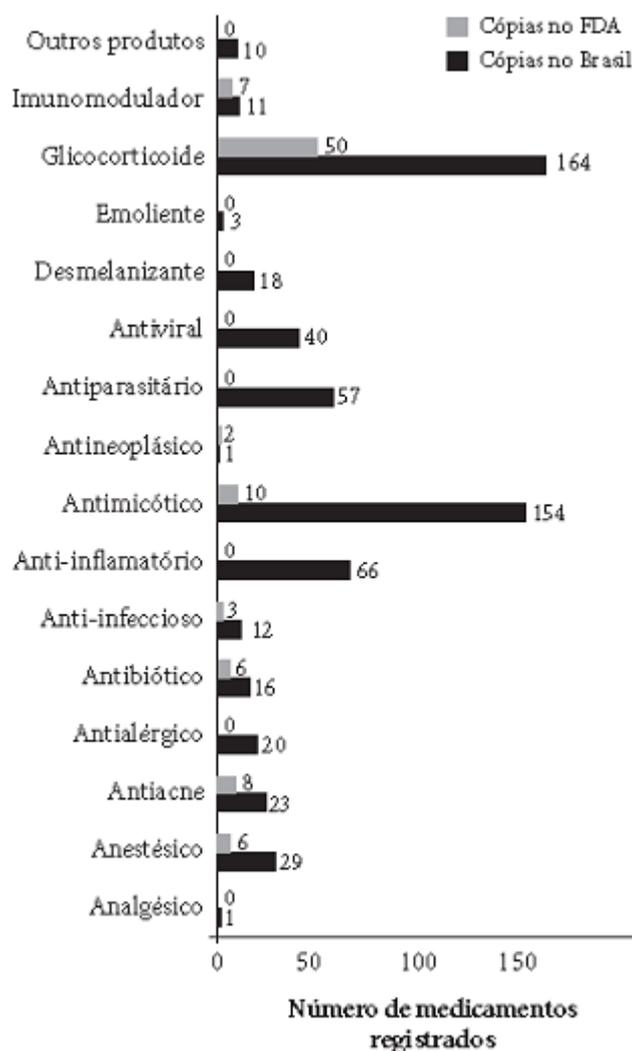
Um levantamento conduzido por Braddy e colaboradores em 2014, traz 15 diferentes jurisdições e organizações que atualmente participam de um projeto piloto que visa a harmonização da regulamentação internacional de medicamentos genéricos (IGDRP- *International Generic Drug Regulators Pilot Project*), dentre eles o Brasil (BRADDY et al., 2015). Atualmente, apenas a Agência de Medicamentos Européia (EMA), o Canadá, o Japão e os Estados Unidos da América (EUA) possuem documentos de orientação específicos para PTD, e somente o Japão, a África do Sul, os EUA, e a Organização Mundial de Saúde (OMS) estão progredindo na aceitação de outras abordagens de BE, como DPK e IVRT (BRADDY et.al., 2015). À exemplo, seis diferentes ‘esboços’ de guias foram publicados para avaliar formulações tópicas de pomada de aciclovir, creme de aciclovir, emulsão de ciclosporina, emulsão de difluprednato, creme de ivermectina e creme de docosanol, descrevendo o uso de IVRT associado à caracterização físico-química como métodos alternativos para evitar estudos clínicos (FDA, 2012; FDA, 2014; FDA, 2013, FDA, 2016, FDA, 2017a; FDA, 2017b).

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 BE pode ser substituída por testes de equivalência farmacêutica

(descritos na RDC nº 31/2010) para medicamentos de aplicação tópica sem absorção sistêmica, desde que apresentem mesma concentração em relação ao MR e excipientes de mesma função, em concentrações compatíveis (BRASIL, 2011; BRASIL, 2010). Esses testes envolvem a caracterização físico-química e microbiológica da formulação e fornecem informações importantes sobre os atributos de qualidade dos medicamentos testados (FISHER et al., 2016). Os testes microbiológicos são, naturalmente, não úteis na comparação de produtos, sendo o Brasil o único país do mundo a solicitar-lhes para esse fim. Além disso, a RDC Nº 73/2016, que se aplica às alterações pós-registro, cancelamento do registro de medicamentos com fármacos sintéticas e semi-sintéticas, requer testes comparativos de desempenho *in vitro* somente entre a formulação atualmente aprovada e a proposta, utilizando o Capítulo Geral 1724 da Farmacopéia Americana (*General Chapters 1724: Semisolid Drug Products Performance tests*) como referência (BRASIL, 2016). No entanto é importante notar que esses produtos genéricos e similares não foram comparados com o produto de referência utilizando testes de desempenho no momento do registro. Esta flexibilização de exigências proporciona um maior número de PTD genéricos e similares intercambiáveis no mercado brasileiro, comparativamente aos EUA, por exemplo, como demonstrado na figura 13.

---

Figura 13- Número de medicamentos tópicos semissólidos dermatológicos registrados no Brasil e nos EUA conforme sua classe terapêutica.



Fonte: SOARES et al., 2015.

Como no Brasil, os excipientes presentes nos MG e similares podem diferir qualitativamente e quantitativamente em relação ao MR, existem no mercado brasileiro produtos considerados genéricos e similares com grandes variações na sua composição, agravando a dúvida sobre a igualdade da eficácia dessas formulações e evidenciando a grande importância de uma readequação da nossa legislação (SOARES et al., 2015).

## MATERIAIS E MÉTODOS

---

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Formulações e insumos

O estudo foi conduzido utilizando quatro formulações providas do mercado nacional, cuja composição e lotes estão detalhadas no quadro 3. A MPC, cedida pela Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA com lote nº13508/2015 e teor 99,6%, foi utilizada como substância química de referência. Todos os solventes e reagentes utilizados nas análises foram de grau analítico e as vidrarias previamente calibradas.

Quadro 3- Apresentações comerciais de MPC pomada 2% utilizadas no estudo.

| Formulação utilizada                   | Composição  | Lote     |
|--|---|----------|
| Medicamento de referência (Bactroban®) | MPC ___ 20mg<br>Macrogol (Polietilenoglicol) q.s.p ___ 1g | VJ0271V  |
| Medicamento genérico A                 | MPC ___ 20mg<br>Macrogol 400 e 4000 q.s.p ___ 1g          | 16075180 |
| Medicamento genérico B                 | MPC ___ 20mg<br>Macrogol 400 e 4000 q.s.p ___ 1g          | 16C99P   |
| Medicamento similar                    | MPC ___ 20mg<br>Macrogol (Polietilenoglicol) q.s.p ___ 1g | 00117863 |

Fonte: Autoria própria.

### 4.2 Desenvolvimento e validação dos métodos analíticos e bioanalíticos para quantificação da MPC

Foi necessário desenvolver um método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção de ultravioleta (CLAE–UV) para quantificação das amostras de MPC providas do estudo de liberação *in vitro*, validada através da RDC nº 899/2003 que trata da validação de métodos analíticos. Outro método mais sensível utilizando *liquid chromatography coupled spectrosocopy in tanden* (LC-MS/MS) foi desenvolvido para quantificação das amostras contendo MPC providas de matriz biológica (*in vitro* / *in vivo*) sendo o método validado com base na RDC nº 27/2012 que dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos.

#### 4.2.1 Desenvolvimento do método analítico por CLAE–UV

O equipamento utilizado para quantificação da MPC em amostras providas do ensaio de liberação *in vitro* foi um CLAE-UV (Nexera X2, Shimadzu, Japão), em 228 nm. Inicialmente, o método para quantificação das amostras foi embasado no estudo descrito por

ECHEVARRÍA e colaboradores (2003). Após a realização de testes, algumas modificações foram realizadas e o acetato de amônio pH 6,3 presente na composição da fase móvel teve sua molaridade alterada devido a precauções decorrentes do equipamento de CLAE, sendo a molaridade reduzida pela metade (0,025M). O quadro 4 abaixo resume as condições cromatográficas obtidas ao final do desenvolvimento:

Quadro 4- Condições cromatográficas para detecção de MPC por CLAE-UV.

|   |   |
|---|---|
| <b>Comprimento de onda na detecção UV</b> | 228 nm  |
| <b>Coluna</b>                             | C8 – 125 x 4,6mm – fase reversa – (ACE® V11-4064)       |
| <b>Fase móvel</b>                         | Tampão acetato de amônio a 0,025M pH 6,3 / ACN (75:25). |
| <b>Temperatura do forno</b>               | 40° C   |
| <b>Fluxo</b>                              | 1,2 ml/min  |
| <b>Injeção</b>                            | 20 µL   |
| <b>Tempo de retenção</b>                  | ± 7 minutos   |
| <b>Tempo de corrida</b>                   | ± 9 minutos   |

Fonte: Autoria própria.

#### 4.2.2 Validação do método analítico por CLAE–UV

Os ensaios para determinação dos parâmetros de validação foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela RE 899 da ANVISA (ANVISA, 2003), sendo os seguintes parâmetros avaliados: seletividade, especificidade, linearidade, exatidão, precisão intermediária e precisão avaliada pela repetibilidade.

O estudo da linearidade foi realizado nas concentrações de 5; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 150,0 µg/mL pela transferência de alíquotas de solução estoque da MPC 100 µg/mL, preparada em tampão fosfato pH 7,4. As diluições foram preparadas em três réplicas e empregadas na construção da curva analítica (concentração vs área do pico). A equação da reta e o coeficiente de correlação linear (r) foram calculados.

A precisão foi avaliada com base na repetibilidade, isto é, a correlação entre os resultados obtidos dentro de um curto período de tempo, utilizando a mesma instrumentação e o mesmo analista. Seis soluções de análise da amostra foram utilizadas na concentração de trabalho (50 µg/mL = 100% de concentração teórica). A precisão intradias foi avaliada analisando-se soluções padrão (n=3) nas concentrações de 50 µg/mL. As soluções foram analisadas e a seguir o coeficiente de variação percentual (CV%) foi calculado. A precisão interdias foi avaliada em dois dias consecutivos por dois analistas distintos.

No estudo da exatidão, foram utilizadas amostras em triplicata, em concentrações equivalentes a 25,0; 50,0 e 100,0 µg/mL, o que corresponde a 50%, 100% e 150% da concentração teórica do fármaco testado, MPC.

Os resultados foram analisados pela análise de variância (ANOVA), CV% e teste t de Student.

#### 4.2.3 Desenvolvimento do método por LC-MS/MS

O método utilizado para quantificação da MPC nas amostras providas da DPK *in vitro* / *in vivo* foi desenvolvido e validado no Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC) da Universidade Federal de Pernambuco, Recife. Para isso foi utilizada a cromatografia líquida (Nexera X2, Shimadzu, Japão), acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo (Q-TRAP 3200® LC-MS/MS, Sciex, EUA) com *electrospray ionisation (negative mode)* (ESI-) e interface no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM). Após a calibração do equipamento no modo negativo, selecionou-se um espectro de massas MS/MS para se conhecer os íons produzidos pela MPC e assim determinar o melhor par iônico e as melhores condições dos parâmetros para detecção da MPC nas amostras. A hidroclorotizida (HCTZ) foi utilizada como padrão interno (PI), a uma concentração fixa de 150ng/ml, de modo a compensar erros aleatório e sistemáticos.

A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Sunfire C18 (50 mm de diâmetro x 2,1 mm, 3,5 µm) da Waters®, mantida a 40°C por um forno de coluna. A fase móvel consistiu em metanol / água na proporção 85:15, em gradiente foi isocrático, com um fluxo cromatográfico de 0,4 mL min<sup>-1</sup>. Um volume de 5 µL de amostras, curva padrão e controles foram injetadas no equipamento. A curva de calibração foi preparada em solução de metanol numa faixa linear com seis pontos de concentrações: 10,0; 25,0; 50,0; 100,0; 200,0 e 300 ng / mL.

O quadro 5 resume as condições analíticas finais para determinação de MPC em amostras providas de matriz biológica.

Quadro 5- Condições analíticas para determinação de MPC em amostras providas de matriz biológica.

|                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| <b>Analito</b>                      | MPC                                      |
| <b>Padrão interno (PI)</b>          | HCTZ                                     |
| <b>Modo de ionização</b>            | negativo                                 |
| <b>Transição MRM do analito</b>     | 500/499 m/z                              |
| <b>Transição MRM do PI</b>          | 297/296 m/z                              |
| <b>Tempo de retenção do analito</b> | 0,7                                      |
| <b>Tempo de retenção do PI</b>      | 0,4                                      |
| <b>Tempo de corrida (minutos)</b>   | 2  |
| <b>Coluna cromatográfica</b>        | C18 (50 mm de diâmetro x 2,1 mm, 3,5 µm) |
| <b>Fluxo mL.min<sup>-1</sup></b>    | 0,4                                      |

|                               |                        |
|-------------------------------|------------------------|
| <b>Fase móvel</b>             | Metanol / água (85:15) |
| <b>Volume de injeção (µL)</b> | 5                      |

Fonte: Autoria própria.

O controle do sistema e a aquisição dos dados foram realizados utilizando o *software Analyst Multiquant* versão 2.1.

#### 4.2.4 Validação do método por LC-MS/MS

O método por LC-MS/MS foi validado seguindo as orientações da RDC nº 27/2012 da ANVISA (BRASIL, 2012). Foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, especificidade, linearidade, exatidão, precisão do método, estabilidade das amostras, a recuperação e o efeito matriz.

##### 4.2.4.1 Soluções padrão

Dois conjuntos de soluções estoque foram preparados para a validação do método a uma concentração de 100 µg/ml de MPC. Primeiro em metanol para análise dos dados das fitas do DPK *in vivo* e *in vitro* e segundo em tampão de fosfato de sódio monobásico (20 mM) pH 7,4 para análise dos dados de líquido receptor do estudo *in vitro*. A curva de calibração de MPC foi preparada em ambos os solventes com as concentrações de 10,0; 25,0; 50,0; 100,0; 200,0; 300,0 ng/ml.

##### 4.2.4.2 Análise cromatográfica

As análises foram realizadas conforme descrito no item 4.2.3.

##### 4.2.4.3 Linearidade

Para avaliar a linearidade três curvas de calibração diferentes foram preparados em ambos os solventes, Cada curva de calibração foi obtida em seis níveis de concentrações de soluções de MPC (10-300,0 ng/ml). As curvas de calibração foram ajustadas utilizando regressão linear dos mínimos quadrados.

##### 4.2.4.4 Seletividade e especificidade

A especificidade foi avaliada em três amostras de fita (Scotch Book Tape, 3M, St. Paul, MN, USA), que são usados na remoção das camadas do estrato córneo da pele humana e de porco. Cada fita foi colocado em frascos do tipo *eppendorf* (Axygen®) e adicionado de 950 µL de metanol e 50 µL de PI e deixados sob durante agitação durante um período de 6 horas a 32 °C. Depois disso, as amostras foram filtradas com filtro de 0,45µm (Millex-HV-® PVDF) e analisadas pelo método desenvolvido.

A seletividade do método foi verificada através da monitorização da MPC na presença de componentes da formulação. As pomadas de MPC (2%) e a pomada placebo foram diluídas a uma concentração teórica de 300 ng/ml em metanol sendo posteriormente analisadas pelo método desenvolvido.

#### **4.2.4.5 Precisão e exatidão**

A precisão e exatidão foram determinadas em uma mesma corrida (intradias) e em três corridas diferentes em pelo menos dois dias distintos (interdias). Em cada corrida analítica foram realizadas cinco repetições, em cinco concentrações: limite de quantificação (LIQ = 10 ng/mL), controle de qualidade de baixa concentração (3x LIQ = 30 ng/mL), controle de qualidade de média concentração (CQM = 150 ng/mL) e controle de qualidade de alta concentração (CQA 75% -80% do limite superior de quantificação (LSQ = 240 ng / ml) (ANVISA Brasil, 2012). Para a obtenção das amostras, as fitas contendo EC foram colocadas em tubos do tipo *eppendorf* (Axygen®) e contaminadas com as respectivas concentrações em cinco repetições. Após a evaporação das soluções controles postas nas fitas a extração foi realizada através da adição de 950µL de metanol e 50 µL de PI em cada tubo, que foram deixados sob agitação durante seis horas a 32°C. Em seguida, foram filtradas com filtro de 0,45µm (Millex-HV-<sup>®</sup> PVDF) e analisadas pelo método desenvolvido.

#### **4.2.4.6 Estabilidade das amostras**

Após a realização do procedimento de *tape stripping* cada fita precisa ser pesada novamente e só após isso o procedimento de extração pode ser realizado (estabilidade de curto prazo). O procedimento de DPK *in vivo* para um voluntário pode durar três dias. Então, normalmente, a fita pode ficar até três dias entre o procedimento de *tape stripping* e o procedimento de extração. Considerando outros possíveis problemas, a estabilidade do fármaco nas fitas foi avaliado após 24, 48 e 72 horas. Assim, 3 fitas foram contaminadas com o CQB e 3 com o CQA e extraídas e analisadas após cada intervalo de tempo mencionado.

Em relação à fase de extração do estudo de DPK, o número de fitas para cada local de aplicação da formulação no voluntário é de vinte. A depender do número de voluntários em cada dia e do tempo de execução para análise de cada amostra, o procedimento pode durar até 24 horas. Considerando assim, possíveis problemas a estabilidade do fármaco na solução extraída (estabilidade pós-extração) foi avaliada após 24, 48, 72 horas. Para avaliar a estabilidade das amostras armazenada após a extração, 3 fitas foram contaminadas com o CQB e 3 com o CQA sendo analisadas após a extração decorrido cada período de tempo mencionado.

#### 4.2.4.7 Recuperação

A recuperação da MPC foi avaliada através da contaminação das fitas contendo EC humano, EC suino e da pele de porco com concentrações conhecidas (CQB= 30; CQM = 150; CQA= 240 ng/mL) de MPC em triplicata. As fitas foram colocadas em tubos tipo *ependorfs* (Axygen®) e deixadas em contato com as soluções até completa evaporação do solvente. Em seguida foi adicionado 950µL de metanol e 50 µL de PI, sendo os tubos mantidos sob agitação por 6 horas a 32°C. Por fim, as soluções foram filtradas com filtros de 0,45µm (Millex<sup>®</sup> -HV-PVDF) e quantificadas pelo método desenvolvido.

#### 4.2.4.8 Efeito matriz

O efeito matriz foi verificado através de 6 fitas provenientes de tapes iniciais; 6 últimas fitas provenientes dos últimos tapes do total de 20 fitas e 6 soluções para cada Controle de qualidade baixo (CQB) e alto (CQA). O fator de matriz normalizado (FMN) foi obtido para cada amostra, através da fórmula descrita na equação 7:

$$FMN = \frac{\text{Resposta do analito em matriz/Resposta do PI em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução/Resposta do PI em solução}} \quad (\text{Equação 7})$$

O efeito matriz foi tido como insignificante quando o coeficiente de variação (CV) dos FMNs relativos a todas as amostras inferiores a 15%.

### 4.3 Equivalência farmacêutica

Os testes de EF foram conduzidos conforme determinado pela RDC nº 37/2011, que trata da isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência, permite que a avaliação da BE do produto tópico com ação local seja substituída por testes de EF, conforme descrito na RDC nº 31/2010 e na monografia farmacopeica do produto, no caso da MPC, segundo a farmacopeia britânica (BRASIL, 2011; BRASIL 2010; BRITISH PHARMACOPEIA, 2008). Assim foram realizados os seguintes testes: características organolépticas, pH, densidade, espalhabilidade, reologia, viscosidade e teor.

#### 4.3.1 Características Organolépticas

O aspecto, odor e cor de cada produto foram avaliados. Para avaliação do aspecto observou-se visualmente se as formulações em estudo mantinham as mesmas características “macroscópicas” do MR (padrão) ou se ocorreram alterações como turvação por exemplo. A análise da cor foi realizada por meio visual. Na análise visual (colorimetria visual) comparou-

se visualmente a cor das formulações genéricas e similar com a cor do medicamento de referência. A análise foi visualizada sob condições de luz branca artificial (BRASIL, 2008). Com relação ao odor, as formulações genéricas, similar e o medicamento referência, acondicionados no mesmo material de embalagem, tiveram seu odor comparado diretamente através do olfato (BRASIL, 2008).

#### 4.3.2 pH

O pH das formulações contendo MPC foram avaliados utilizando um potenciômetro digital com eletrodo de vidro e sensor de temperatura, modelo PG1800, da marca GEHAKA, previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 a uma temperatura de  $25 \pm 0,5$  °C. Foram realizadas seis análises replicadas e os resultados apresentados por média  $\pm$  desvio padrão (DP) (BRASIL, 2008).

#### 4.3.3 Densidade aparente

A densidade aparente foi determinada utilizando um picnômetro com uma capacidade de 5 mL. O procedimento foi realizado em sextuplicata de acordo com a metodologia da Farmacopeia Brasileira de 2010 (BRASIL, 2010).

#### 4.3.4 Espalhabilidade

A determinação da espalhabilidade foi realizada através do método adaptado de Borghetti e Knorst (2006). Em uma placa de vidro disposta sobre papel milimetrado, aplicou-se 0,5 g de cada formulação e sobre a amostra foi colocada uma placa de vidro de peso conhecido. Após decorrido o tempo de um minuto de espalhamento, o diâmetro foi aferido em direções opostas e o diâmetro médio foi calculado.

Posteriormente, o mesmo procedimento foi repetido até um total de 5 placas. Os resultados foram expressos como extensibilidade da amostra em função do peso aplicado, conforme descrito na equação 4 abaixo (KNORST, 1991; BORGHETTI E KNORST, 2006):

$$E_i = d^2 \times \pi / 4 \quad (\text{Equação 4})$$

Em que:

$E_i$  = capacidade de espalhamento da amostra para um dado peso  $i$  (mm<sup>2</sup>);

$d$  = diâmetro médio (mm).

#### 4.3.5 Comportamento Reológico e viscosidade aparente

O comportamento reológico foi avaliado em viscosímetro rotacional da marca *Rheology International*® e análise dos dados com o software *Microsoft*® *Excel*. A viscosidade aparente foi determinada a 30 rpm enquanto as viscosidades relativas foram

determinadas num gradiente de cisalhamento crescente e decrescente com velocidade de rotação de 10 a 100 rpm usando *spindle* S7 e temperatura 25°C. A partir da construção do gráfico de viscosidade versus taxa de cisalhamento foi identificado o comportamento reológico dos produtos.

#### 4.3.6 Teor

A metodologia utilizada para o ensaio de teor foi a descrita na Farmacopeia Britânica (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2008) visto que a Farmacopeia Brasileira 5ª edição não apresenta monografia para os produtos em estudo contendo MPC (Farmacopeia Brasileira, 2010).

##### 4.3.6.1 Preparação das amostras

Uma amostra padrão contendo 50 µg/ml de MPC foi preparada utilizando a substância química de referência fornecida pela Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, com lote nº13508/2015 e teor 99,6%. Amostras em triplicata de cada formulação comercial foram preparadas de modo a extrair das respectivas pomadas a mesma concentração contida na amostra padrão (50 µg/ml). A solução utilizada na extração corresponde a fase móvel e consiste na utilização de tampão acetato de amônio a 0,025 M e pH 6,3 / acetonitrila (ACN) nas proporções 75:25. As condições cromatográficas foram as mesmas descritas no item 4.2.1.

##### 4.3.6.2 Cálculo do teor

O cálculo do teor das amostras analisadas foi realizado após obtenção das médias da triplicata, sendo calculado o percentual obtido desta em relação a amostra padrão utilizada como referência. A tolerância permitida para o teor do produto em questão é de 90 a 115 % da quantidade rotulada (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2008).

#### 4.4 Estudo de liberação *in vitro* da MPC

O estudo de liberação *in vitro* foi conduzido utilizando-se células de difusão tipo Franz, automatizadas (*Vision Microette*®) com área difusional de 1,77 cm<sup>2</sup> e capacidade de 6,5 ± 0,2 mL.

##### 4.4.1 Seleção do meio receptor

A composição do meio receptor deve demonstrar ser capaz de manter as condições *sink*. As condições *sink* devem ser avaliadas para que, entre outros fatores, a concentração de saturação do fármaco no meio receptor, não seja atingida durante o estudo de liberação

(COSTA, 2011). Assim, a solubilidade foi determinada para a MPC em tampão fosfato pH 7,4 permitindo a manutenção da condição *sink*, não ocasionando aumento apreciável da concentração de MPC no meio receptor e não alterando a forma de dosagem por retrodifusão através da membrana. Além disso, o tampão 7,4 é compatível com o método analítico CLAE-UV desenvolvido, podendo ser injetado diretamente no equipamento.

#### 4.4.2 Preparo da membrana sintética hidrofílica

Foi utilizada membrana sintética de éster (acetato) de celulose (Millipore<sup>®</sup>), lote R5PA87384), porosidade de 0,45µm. A membrana foi previamente hidratada em tampão fosfato pH 7,4 por um período de 12 horas.

#### 4.4.3 Montagem das células de Franz

O compartimento receptor das células de Franz foi completamente preenchido com solução receptora. As membranas foram dispostas na célula de modo que ficassem em contato com a solução receptora sem a formação de bolhas. E no compartimento doador foi colocado 200 mg ± 1 mg (área de exposição 1,77 cm<sup>2</sup>) de cada formulação teste, incluindo o produto de referência, Bactroban<sup>®</sup>. O sistema foi mantido sob agitação magnética (300 rpm). As células foram mantidas em banho circulante a 32 ± 1°C.

#### 4.4.4 Coleta e Quantificação das Amostras

Alíquotas de 1 mL foram coletados automaticamente nos seguintes tempos: 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos. O volume retirado durante as coletas foi automaticamente repostado com solução receptora para manutenção das condições '*sink*'. Em seguida, as amostras foram filtradas em membrana 0,45 µm, quantificadas através de CLAE-UV (método descrito no item 4.6.1) e utilizadas nos cálculos da quantidade real liberada (equação 5). As análises foram realizadas em sextuplicatas para cada formulação. Os resultados foram plotados para a definição do modelo de cinética adequado para cada formulação.

$$Q_{real,t} = Ct.Vr + \sum Vc.Cc \quad (\text{Equação 5})$$

Na qual:

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

Ct = concentração obtida referente ao tempo t;

Vr = volume de solução receptora (6,5 mL)

Cc = concentração da amostragem anterior

Vc = volume coletado

#### 4.4.5 Análise da cinética de liberação *in vitro*

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

- Ordem zero: quantidade liberada por área ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) *versus* tempo (h);
- Primeira ordem: log da quantidade liberada por área ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) *versus* tempo (h).
- Higuchi: quantidade liberada por área ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) *versus* raiz quadrada do tempo (h), conforme a equação 6:

$$\frac{M_t}{M_{\infty}} = K_H \sqrt{t} + b \quad (\text{Equação 6}).$$

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

#### 4.4.6 Análise comparativa das taxas de liberação

As taxas de liberação *in vitro* entre as formulações foram comparadas seguindo o guia SUPAC-SS 1724. Conforme proposto por Shah, 2015, para que o produto de teste seja equivalente à referência, o intervalo de confiança deve estar entre 75 e 133,33% (SHAH, 2015; USP, 2014; FDA, 1997).

### 4.5 Estudo de permeação/retenção e de dermatofarmacocinética (DPK) *in vitro/ in vivo* da MPC

#### 4.5.1 Procedimento do estudo de permeação/retenção e de DPK *in vitro* em pele da região dorsal do porco

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

Para verificar a função de barreira da pele, a medição da perda de água transepidérmica (PAT) foi realizada com o *Tewameter* (Courage + Khazaka eletrônico GmbH -CK eletrônico). Uma área de pele de porco com dimensões de 1,77  $\text{cm}^2$  foi exposta na

abertura da célula de Franz vertical (*Vision<sup>®</sup> Microette*), e mantida assim com o auxílio de uma garra. Uma dose única de 100 mg das formulações aprovadas nos testes iniciais de EF e IVRT foi aplicada nas áreas expostas. O lado dérmico da pele foi mantido em contato com o líquido receptor constituído por tampão fosfato (25 mM) pH 7,4, o qual foi mantido em constante agitação por uma barra magnética.

Após 6 horas, a formulação residual foi removida da pele de porco com *swabs* contendo álcool isopropílico Biosoma<sup>®</sup>, por duas vezes e uma amostra (1 mL) de líquido receptor foi coletada manualmente para posterior quantificação. Imediatamente após, a 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 (fita Scotch Reserve, 3M, St. Paul, MN, EUA), após a aplicação de uma pressão constante usando uma pinça. Vinte fitas foram utilizadas em cada pele de porco. Cada fita foi pesada antes e após a remoção do EC em uma balança de precisão (marca Sartorius<sup>®</sup> modelo MSU125P-1CE-DU) para determinar a massa e a espessura da camada do EC removido (HERKENNE et al., 2006; KALIA et al., 1996; KALIA et al., 2001). Depois de pesadas, as fitas foram agrupadas da seguinte forma para extração: 1-2; 3-5; 6-8; 9-12; 13-16; 17-20. Cada pele de porco (epiderme e derme viável) foi triturada e colocada em tubos do tipo *ependorfs* (Axygen<sup>®</sup>) para extração com 950µL de metanol e 50µL de PI por 6h em banho a temperatura controlada (32°C) sob agitação constante. As fitas foram extraídas da mesma forma e em seguida todas as amostras foram filtradas e analisadas por LC-MS/MS conforme descrito no item 4.2.3.

#### 4.5.2 Procedimento do estudo de DPK in vivo em voluntários humanos sadios

##### 4.5.2.1 Comitê de ética e seleção dos voluntários

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

Os critérios de inclusão foram: idade entre 18-40 anos; homem ou mulher não grávida de qualquer origem étnica; saudável; não fumante; disposição para fornecer informações básicas (ex., idade, altura, peso, sexo e etnia); fornecer consentimento informado por escrito antes do início de qualquer procedimento de estudo; concordar em não participar de outro ensaio clínico durante o período de estudo; capaz de se comunicar bem com os investigadores; capaz de aderir às restrições do estudo e do cronograma de exame; ter um

antebraço de pelo menos 22 cm de comprimento já que a área de trabalho começa, pelo menos, 5 cm do pulso e termina com um mínimo de 0,5 cm abaixo da curva do braço no cotovelo.

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

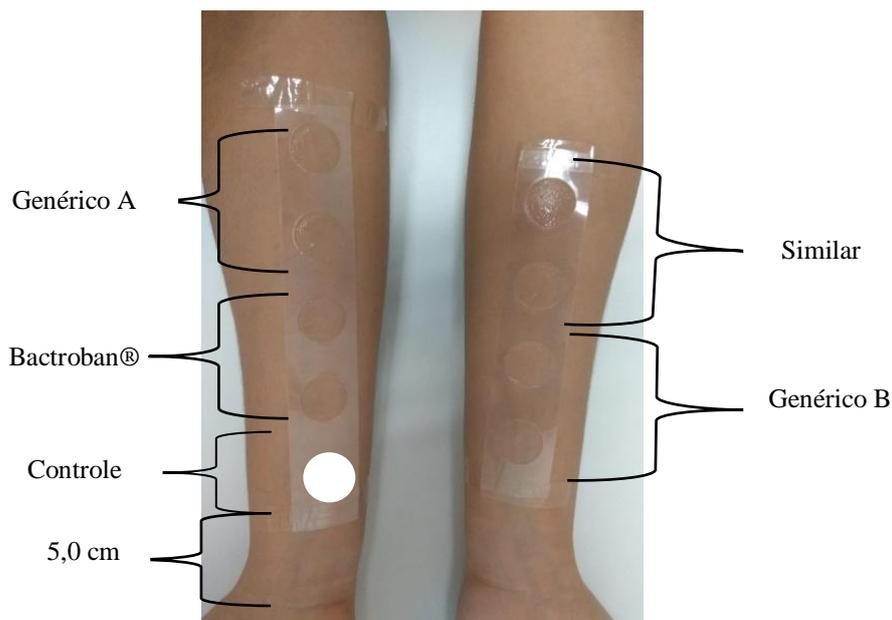
#### **4.5.2.2 Tolerabilidade**

A tolerabilidade foi avaliada registrando os eventos adversos relatados espontaneamente pelos voluntários e visualmente observados durante o tempo do estudo.

#### **4.5.2.3 Estudo de Bioequivalência *in vivo* de formulações contendo MPC através da DPK**

A fim de confirmar os resultados apresentados pelo medicamento similar através dos testes de EF e IVRT, o mesmo foi incluído no estudo de DPK *in vivo*. Assim, no dia do estudo, o antebraço foi higienizado e após 1 hora, as formulações foram aplicadas em 8 locais de tratamento (quatro formulações por voluntário, dois locais de aplicação por formulação, sendo 4 em cada antebraço) que foram randomizados, mas a mesma ordem foi mantida por antebraços de cada voluntário (figura 14). Em um local não tratado foi realizado o *tape stripping* que foi utilizado como controle branco (sem fármaco) para a análise dos dados.

Figura 14- Oito locais de aplicação das formulações demarcados na porção ventral de cada antebraço.



Fonte: Acervo pessoal.

Cada local de aplicação foi demarcado com um molde em forma circular de adesivo (Scotch Tape Livro, 3M, St. Paul, MN, EUA) com uma área de  $2,54\text{cm}^2$ . Uma dose de  $63,5\text{mg}$  de cada formulação foi aplicada em cada local com o dedo calçado por uma luva.

Depois de 6 horas (tempo de absorção), a formulação residual foi removida de todos os locais de aplicação com o auxílio de dois *swabs* contendo álcool isopropílico (Biosoma<sup>®</sup>). Imediatamente a seguir, os locais de aplicação foram delimitados por um molde ( $1,77\text{cm}^2$  em área) e foi realizado o procedimento de *tape stripping*. O EC foi progressivamente obtido pela remoção sequencial das fitas (fita Scotch Reserve, 3M, St. Paul, MN, EUA), após a aplicação de uma pressão constante usando uma pinça. Vinte fitas foram utilizados em cada local de aplicação. Para verificar a função de barreira da pele, foi medida a perda de água transepidérmica (PAT) com o auxílio do Tewameter (Courage + Khazaka eletrônico GmbH - CK eletrônico). Cada fita foi pesada antes e após a remoção do estrato córneo em uma balança de precisão (Sartorius<sup>®</sup>) para determinar a massa e a espessura da camada do EC removido (HERKENNE et al., 2006;. KALIA et al., 1996;. KALIA et al., 2001). A MPC presente em cada fita foi subsequentemente extraída e analisada pelo método analítico descrito em 4.2.6.

#### 4.5.2.4 Análise dos dados para avaliação da Bioequivalência

O valor médio e os intervalos superior e inferior com de 90% confiança foram calculados para cada produto  $i$  e considerando todos os voluntários para 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 6 horas. Considerando, que as medidas de absorção cutânea apresentam uma distribuição log-normal, previamente à análise estatística, realizou-se a transformação logarítmica de todas as grandezas de forma a normalizar a distribuição dos dados analisados (CORNWELL, et al. 1995).

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

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

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

Com a massa e a espessura da camada EC removidos, as concentrações foram expressas como a quantidade de fármaco ( $\mu\text{g}$ ) por mg de EC  $\text{cm}^2$  de cada fita.

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

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Validação dos métodos analítico e bioanalítico.

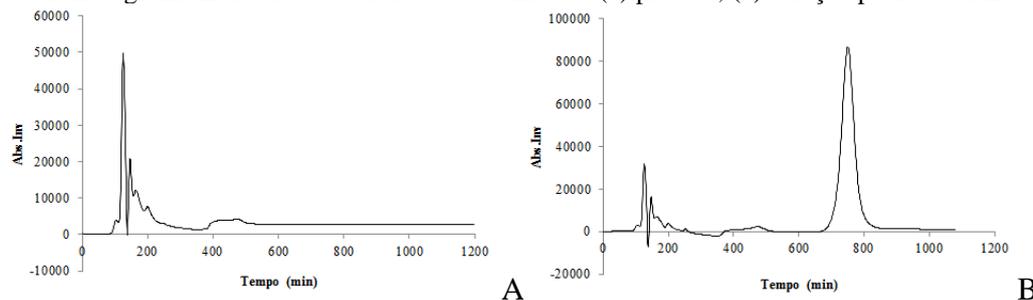
#### 5.1.1 Validação analítica do método por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de ultravioleta (CLAE-UV)

Conforme estabelecido na norma RE nº 899 da ANVISA (ANVISA, 2003), o método foi validado com base nos seguintes parâmetros: seletividade, especificidade, linearidade, exatidão, precisão intermediária e precisão avaliada pela repetibilidade.

##### 5.1.1.1 Seletividade e especificidade

Amostras de placebo foram analisadas em triplicata para verificação da especificidade/seletividade do método analítico. O método proposto demonstrou ser seletivo e específico o que pôde ser confirmado pela ausência de picos das amostras placebos no tempo de retenção da MPC (figura 15).

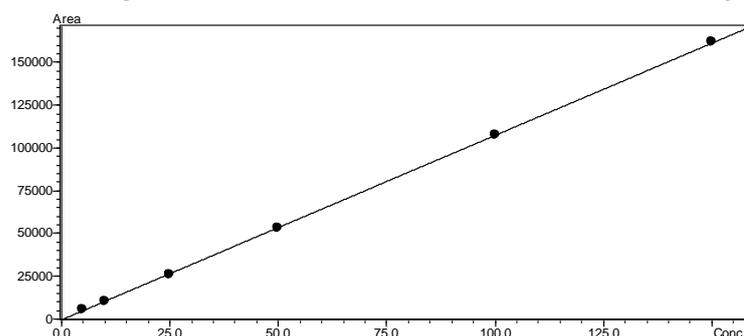
Figura 15- Cromatograma indicativo da seletividade do método (a) placebo, (b) solução padrão de MPC.



##### 5.1.1.2 Linearidade

A curva de calibração da MPC demonstrou que o método é linear no intervalo de 5-150µg/mL. A equação da reta obtida foi  $y = 10777,2x - 367,9$ , com um coeficiente de correlação de  $r^2 = 0,9999$ . Segundo a ANVISA (BRASIL, 2003), o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,99. Sendo assim, o valor de  $r^2$  obtido na análise da MPC pelo método CLAE-UV desenvolvido obedece aos limites estabelecidos (figura 16) (BRASIL, 2003).

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



### 5.1.1.3 Precisão, exatidão e repetibilidade

Para avaliar a precisão do método, o ensaio de repetitividade a partir de seis réplicas da concentração teste resultou em uma concentração média de 50,03 µg/mL. Os dados da repetitividade e da precisão intermediária podem ser visualizados na tabela 1. Após tratamento estático por ANOVA foi constatado que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os resultados obtidos em dias diferentes e por analistas diferentes, pois o valor de T calculado foi menor que o T tabelado.

Tabela 1- Repetitividade e Precisão intermediária entre analistas e dias diferentes.

| Repetibilidade | Concentração |      | CV           |      |
|----------------|--------------|------|--------------|------|
|                | Dia 1        |      | Dia 2        |      |
|                | Concentração | CV   | Concentração | CV   |
| Analista 1     | 50,03 ± 0,62 | 1,23 | 50,30 ± 1,57 | 3,12 |
| Analista 2     | 49,57 ± 0,26 | 0,53 | 51,25 ± 1,22 | 2,39 |

O método também foi considerado exato, pois os resultados encontrados apresentaram concordância com os resultados da análise de três concentrações (baixa, média e alta) da solução de MPC (tabela 2).

Tabela 2- Resultados da exatidão.

| Concentração |              |       | Dados estatísticos |       |      |      |       |
|--------------|--------------|-------|--------------------|-------|------|------|-------|
| Teórica      | Experimental |       | Média              | DP    | CV   | %    |       |
| 25           | 25,28        | 24,59 | 23,22              | 24,36 | 1,05 | 4,30 | 97,45 |
| 50           | 49,69        | 50,25 | 49,94              | 49,97 | 0,29 | 0,58 | 99,93 |
| 100          | 100,40       | 99,16 | 99,93              | 99,83 | 0,62 | 0,62 | 99,83 |

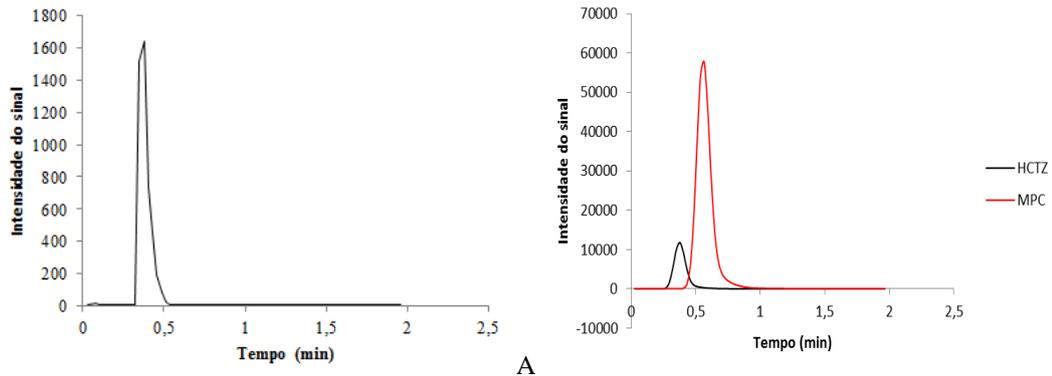
### 5.1.2 Validação do método por LC-MS/MS

Foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, especificidade, linearidade, exatidão, precisão, estabilidade das amostras, a recuperação e o efeito matriz, conforme as orientações da RDC nº 27/2012 da ANVISA.

#### 5.1.2.1 Seletividade e especificidade

Amostras de placebo foram analisadas em triplicata para verificação da especificidade/seletividade do método analítico. O método proposto demonstrou ser seletivo e específico o que pôde ser confirmado pela ausência de picos das amostras placebos no tempo de retenção da MPC, conforme demonstrado na figura 17.

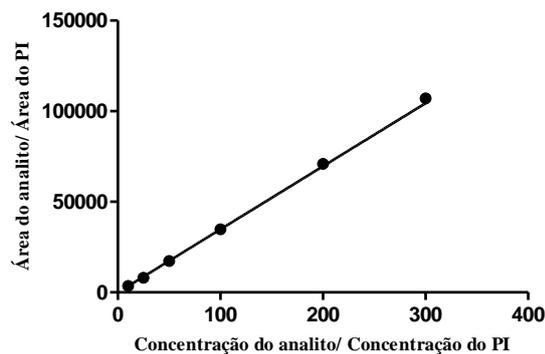
Figura 17- Pico cromatográfico do placebo adicionado de PI (A) Pico cromatográfico da amostra contendo MPC adicionada de PI (B).



### 5.1.2.2 Linearidade

A curva de calibração da MPC demonstrou que o método é linear no intervalo de 10-300 ng/mL. A equação da reta obtida foi  $y = 0,0182x - 0,0151$ , com um coeficiente de correlação de  $r^2 = 0,9999$  (figura 18).

Figura 18- Curva da Regressão Linear obtida da média de três curvas de calibração autênticas.



### 5.1.2.3 Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão intradias e interdias foram satisfatórias. Os dados obtidos para as fitas em humanos e para as fitas em suínos (tabela 3) estão em conformidade com os limites aceitáveis de acordo com a resolução para validação de métodos bioanalíticos (ANVISA, 2012).

Tabela 3- Resultados da precisão e exatidão para as fitas em pele humana e em pele de porco.

| Concentração (ng/mL) | Intradias ( ng mL <sup>-1</sup> ) (n=5) |            | Interdias ( ng mL <sup>-1</sup> ) (n=15) |              |              |              |
|----------------------|---|------------|--|--------------|--------------|--------------|
|                      | Humano                                  | Porco      | Humano                                   |              | Porco        |              |
|                      | Média±DP                                | Média±DP   | Precisão (%)                             | Exatidão (%) | Precisão (%) | Exatidão (%) |
| 10                   | 11,92±0,54                              | 11,3± 1,86 | 4,53                                     | 19,20        | 16,49        | 13,00        |
| 30                   | 34,18±2,15                              | 33,8± 2,52 | 6,28                                     | 13,93        | 7,46         | 12,67        |

|            |              |             |      |      |      |       |
|------------|--------------|-------------|------|------|------|-------|
| <b>150</b> | 153,33±13,88 | 165,40±8,73 | 9,05 | 2,22 | 5,28 | 10,27 |
| <b>240</b> | 232,4±8,87   | 253±23,02   | 3,82 | 3,17 | 9,10 | 5,42  |

#### 5.1.2.4 Estabilidade

De acordo com a resolução RDC 27/2012, a estabilidade é demonstrada quando não se observar desvio superior a 15% (quinze por cento) da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal. Os dados da triplicata de amostras contendo CQB e CQA antes e após a extração no período de 24h, 48h e 72h demonstraram que a estabilidade só foi mantida por 24h conforme pode ser observado na tabela 4. Assim, todas as amostras foram analisadas apenas dentro do intervalo de tempo assegurado.

Tabela 4- Estabilidade das amostras armazenadas após o processo de extração.

| Tempo<br>(horas) | Antes da extração     |       |                       |       | Após a extração       |       |                       |       |
|------------------|-----------------------|-------|-----------------------|-------|-----------------------|-------|-----------------------|-------|
|                  | CQB                   |       | CQA                   |       | CQB                   |       | CQA                   |       |
|                  | Média ± DP<br>(ng/mL) | EPR   |
| <b>24h</b>       | 32,26±0,91            | 7,56  | 244±1,01              | 1,67  | 32,27±1,15            | 7,56  | 245,33±2,52           | 2,22  |
| <b>48h</b>       | 39,07±3,01            | 30,22 | 286,33±9,81           | 19,31 | 38,07±2,94            | 26,89 | 283,67±1,53           | 18,19 |
| <b>72h</b>       | 40,83±3,15            | 36,11 | 287,67±11,02          | 19,86 | 38,73±3,82            | 29,11 | 284,33±6,43           | 18,47 |

#### 5.1.2.5 Efeito Matriz

Após analisar amostras provindas de 6 fitas provenientes de tapes iniciais, 6 últimas fitas provenientes dos últimos tapes do total de 20 fitas e 6 soluções para cada CQB e CQA verificou-se que o fator de matriz normalizado (FMN) foi insignificante com os CVs% dos FMNs relativos a todas as amostras inferiores a 15%, conforme mostrado na tabela 5, abaixo.

Tabela 5- Efeito matriz das amostras contendo MPC.

| Controles  | Fitas/Tapes | Média±DP  | CV (%) |
|------------|-------------|-----------|--------|
| <b>CQB</b> | Iniciais    | 0,95±0,04 | 4,38   |
|            | Finais      | 0,99±0,09 | 9,51   |
| <b>CQA</b> | Iniciais    | 1,06±0,15 | 14,29  |
|            | Finais      | 1,25±0,16 | 12,73  |

#### 5.1.2.6 Recuperação

A tabela 6 apresenta os valores percentuais de recuperação no estrato córneo (amostras contaminadas) e pele de porco (epiderme e derme). Estes resultados confirmam que o

processo de extração é eficiente para a recuperação da MPC nas fitas e na pele de porco, uma vez que a substância pode ser recuperada em quantidade significativa.

Tabela 6- Valores médios para a recuperação no estrato córneo (amostras contaminadas) e pele de porco (epiderme e derme).

| Controles<br>(n=3) | Estrato córneo        |           |                    | Epiderme e derme      |           |                    |
|--------------------|-----------------------|-----------|--------------------|-----------------------|-----------|--------------------|
|                    | Média ± DP<br>(ng/mL) | CV<br>(%) | Recuperação<br>(%) | Média ± DP<br>(ng/mL) | CV<br>(%) | Recuperação<br>(%) |
| 30                 | 29,83±0,61            | 2,05      | 99,44              | 29,27±1,01            | 3,44      | 97,56              |
| 150                | 149,00±1,00           | 0,67      | 99,33              | 149,57±1,25           | 0,84      | 99,71              |
| 240                | 238,67±7,51           | 3,14      | 99,44              | 230,00±8,00           | 3,48      | 95,83              |

## 5.2 Equivalência farmacêutica

Os ensaios nacionalmente exigidos no estudo de equivalência farmacêutica, que foram conduzidos neste trabalho são: característica organolépticas, densidade, viscosidade, reologia, espalhabilidade, teor e pH.

Com relação as característica organolépticas, as formulações cópias (genéricos A e B e similar) apresentaram coloração branca e brilhosa, homogêneas e inodoras idênticas ao medicamento de referência. Assim, os medicamentos não apresentaram alterações no reconhecimento primário do produto.

Os resultados de teor de fármaco, pH, viscosidade aparente e densidade de cada formulação contendo MPC estão demonstrados na Tabela 7.

Tabela 7- Resultados da avaliação do teor, pH, viscosidade aparente e densidade das formulações contendo MPC.

| Formulações | Teor (%)   | pH          | Viscosidade aparente (Pa.s) | Densidade   |
|-------------|------------|-------------|-----------------------------|-------------|
| Referência  | 114 ± 0,56 | 7,46 ± 0,06 | 61,32 ± 4,24                | 1,18 ± 0,01 |
| Genérico A  | 107 ± 0,09 | 6,39 ± 0,06 | 123,12 ± 2,38               | 1,17 ± 0,01 |
| Genérico B  | 91 ± 0,27  | 7,81 ± 0,06 | 45,94 ± 4,17                | 1,17 ± 0,01 |
| Similar     | 84 ± 0,45  | 7,76 ± 0,04 | 95,95 ± 0,90                | 1,17 ± 0,01 |

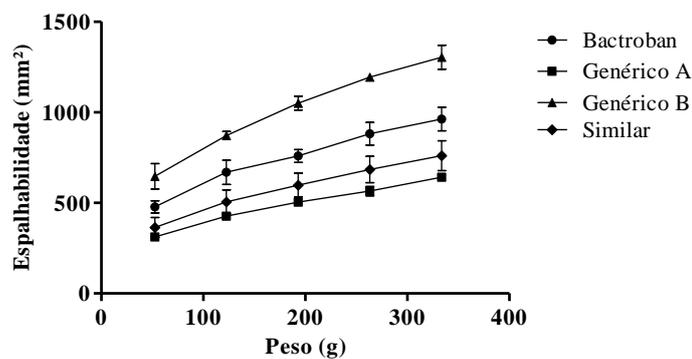
Uma vez que a farmacopeia não define um critério de aceitação para os testes de viscosidade e densidade, os únicos parâmetros que podem ser utilizados, para definir a equivalência entre as diferentes formulações, são os teste de teor e pH (SOARES, 2017). Com relação ao teor, as formulações apresentaram-se dentro do limite preconizado pela Farmacopéia Britânica (90 – 115%), com exceção do produto similar (BRITISH

PHARMACOPEIA, 2008). Desta forma, segundo os testes de equivalência farmacêutica descritos na legislação brasileira (RDC 31/2010), o produto similar não seria considerado equivalente ao produto de referência.

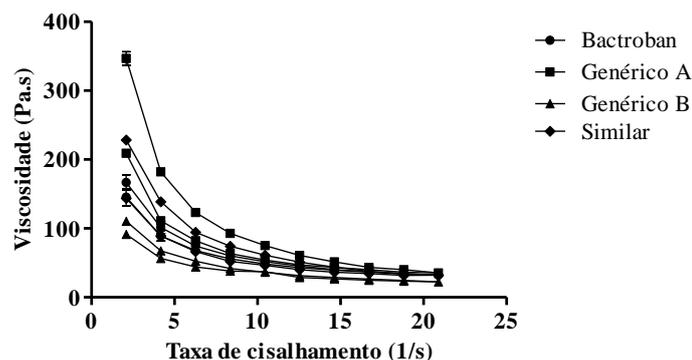
O pH das formulações contendo MPC apresentaram-se dentro da faixa de estabilidade dos componentes ativos utilizados e de tolerância biológica para produtos cutâneos (3,0 – 9,0) como apresentado na tabela 1 acima (AULTON, 2005). Para além do disposto na legislação nacional, diversos autores têm considerado o pH como um atributo de qualidade crítico durante a comparação de produtos testes com o seu referência, uma vez que o pH do veículo pode influenciar o estado de ionização do ativo, a solubilidade, a distribuição de fármaco dentro da microestrutura (Q3), e conseqüentemente na sua estabilidade e segurança (SHANLEY, 2016; MURTHY, 2016; ILIC et al., 2017).

A reologia dos produtos semissólidos também está diretamente atrelada à microestrutura (Q3) podendo, portanto, influenciar a entrega do ativo através da pele e sua eficácia terapêutica (KRISHNAIAH et al., 2014). Como a espalhabilidade de um produto está associada ao seu comportamento reológico e as suas propriedades sensoriais, foram conduzidos testes para avaliação destes parâmetros conforme demonstrado na figura 19- A e B.

Figura 19- Espalhabilidade (A) e viscosidade x taxa de cisalhamento (B) das formulações contendo MPC.



A



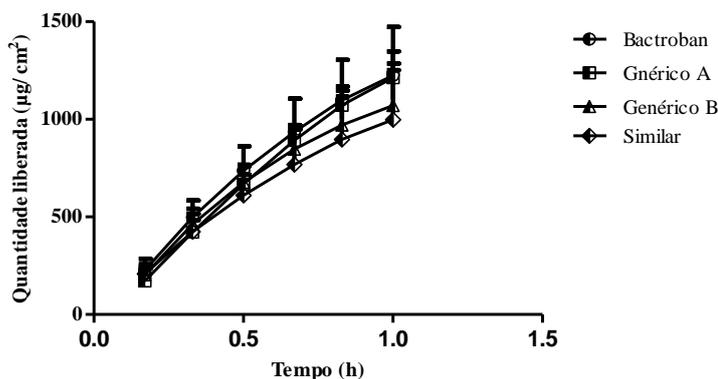
B

Através da análise do reograma apresentado na figura 19-B, é possível observar que as formulações apresentaram um comportamento típico de fluidos não-newtonianos do tipo pseudoplástico com tixotropia, uma vez que suas viscosidades diminuíram gradualmente à medida que o estresse de cisalhamento aumentou (CORRÊA et al., 2005; LAHOUD; CAMPOS, et al., 2010; FIGUEIRA, 2012). Tixotropia é desejável em formulações tópicas, porque ajuda a manter a estabilidade física, além disso, pode influenciar a liberação de fármacos para a pele por desordem estrutural do sistema, onde a difusão dessas substâncias é facilitada (DI MAMBRO et al, 2005). As informações relativas à espalhabilidade (figura 19-A) são importantes porque, dependendo das suas características reológicas, o produto pode ser aplicado com mais facilidade sobre a pele danificada e em menor quantidade, levando a uma redução na quantidade de formulação utilizada sendo importante inclusive, na adesão do paciente a terapia (BORELLA, 2010). A análise dos dados da espalhabilidade demonstrou que, embora as formulações cópias contendo MPC (genéricos A, B e similar) tenham apresentado comportamento pseudoplástico, e mesma composição qualitativa (excipientes de mesma função: um tipo ou a mistura de dois tipos de polietilenoglicóis) (quadro 4), eles mostram diferença estatisticamente significativa na viscosidade aparente e espalhabilidade ( $p > 0,05$ ) em relação ao produto referência, provavelmente devido a diferença quantitativa dos excipientes (Q2) e/ou em virtude da técnica de preparo. A fim de investigar estes impactos na liberação do fármaco da formulação, estudos de liberação *in vitro* foram conduzidos conforme descrito detalhadamente no tópico a seguir (item 5.2).

### **5.3 Estudo de liberação *in vitro* da MPC**

Avaliando-se as taxas de liberação apresentadas pelas formulações estudadas os perfis cinéticos foram classificados pelo modelo cinético de Higuchi. Os perfis de liberação das formulações também foram avaliados de forma comparativa, conforme proposto por Shah (2015), entre o produto de teste e a referência (figura 20) utilizando a metodologia descrita no Guia SUPAC-SS 1724 (FDA, 1997; USP, 2014).

Figura 20- Perfil de liberação das formulações contendo MPC.



Após a avaliação estatística comparativa das taxas de liberação dos produtos genéricos contendo MPC (tabela 8), eles foram considerados equivalentes ao Bactroban®, utilizando apenas 6 repetições. O produto similar, mesmo após o uso de 18 repetições, foi considerado não equivalente. Vale salientar que o produto similar apresentou teor abaixo do estabelecido e, por isso, já havia sido considerado não equivalente ao produto referência conforme a legislação nacional (RC 37/2011).

Tabela 8- Resultado estatístico comparativo entre as formulações referência e testes.

| Fármaco | Comparação              | Valores-limite com IC de 90% | Conclusão      |
|---------|-------------------------|------------------------------|----------------|
| MPC     | Referência x Genérico A | 87,69 - 129,22               | Semelhante     |
|         | Referência x Genérico B | 75,47 - 110,10               | Semelhante     |
|         | Referência x Similar    | 63,00 - 84,52                | Não semelhante |

De acordo com Davis e Khanderia (1972), a atividade termodinâmica e a viscosidade têm efeito determinante sobre a liberação do fármaco. Vários autores observaram que o aumento da viscosidade do veículo causa a formação de uma estrutura mais rígida e, portanto a taxa de liberação do ativo encontra-se diminuída (CHORILLI et al., 2007; BRUSCHI et al., 2007; WANG et al., 2001; BARRY, 1983). Entretanto, no caso dos produtos contendo MPC, a diferença de viscosidade entre a formulação referência e genéricos A e B não foi fator preponderante para que suas taxas de liberação fossem também diferentes. Assim, no caso de pomadas contendo MPC (formulação simples com uma fase), a diferença de viscosidade entre a formulação de referência e as genéricas A e B não influenciou suas taxas de liberação. Conseqüentemente, a pomada MPC, poderia ser analisada tal como o esboço do guia da pomada de aciclovir (FDA, 2012), onde as formulações são consideradas bioequivalentes através da similaridade dos resultados de IVRT (Q3), quando consideradas Q1 e Q2

semelhantes e sendo classificada com uma formulação classe 1, conforme a SCPT proposta por Shah, 2015, evitando assim o estudo clínico.

#### 5.4 Estudo dermatofarmacocinético (DPK) *in vitro/ in vivo*

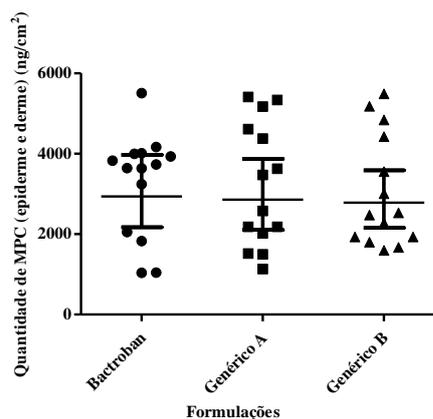
##### 5.4.1 Estudo de DPK *in vitro* em pele da região dorsal do porco

Os resultados apresentados pelo medicamento similar através dos estudos de EF e IVRT demonstraram que o mesmo foi considerado não equivalente e não semelhante em relação ao MR. Assim, este medicamento foi excluído do teste de DPK *in vitro*, sendo incluído apenas nos estudos de DPK *in vivo* a fim de verificar sua BE.

Os modelos *in vitro* são comumente usados para avaliar a absorção percutânea, sobretudo em decorrência de algumas dificuldades de se avaliar a permeabilidade da pele em relação a novas moléculas ou novas formulações, usando apenas experimentos *in vivo* (FARAHMAND; MAIBACH, 2009). Aqui, independentemente das formulações utilizadas, a permeação, retenção e estudo de DPK em 6 horas, o fármaco não alcançou a solução receptora utilizando a região dorsal da pele de porco em concentração superior ao limite de quantificação do método que é 10 ng/mL.

O estudo de retenção (quantidade de MPC na epiderme e derme viável) demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de MPC para as diferentes formulações (ANOVA de Friedman e teste de Mann Whitney) (figura 21).

Figura 21- Quantidade de MPC na epiderme e derme das formulações na pele dorsal de porco (n = 14).



Seguindo o mesmo cálculo realizado por N'Dri-Stempfer, 2008, a figura 22-A e 22-B mostra a quantidade total de fármaco (ng/cm<sup>2</sup>), medido nas fitas dos locais de aplicação dos genéricos A e B e do Bactrobran® em catorze áreas de pele dorsal de porco, sendo a figura 22-A sem as duas primeiras fitas (n=18) e a 22-B com as duas primeiras fitas (n=20). As tabelas 9 e 10 listam as quantidades totais médias de fármaco por centímetro quadrado para

cada produto, medidas em cada uma das áreas de aplicação após 6 horas, sem as duas primeiras fitas e com as duas primeiras fitas, respectivamente. Não houve diferença estatística entre o medicamento de referência e os genéricos A e B (ANOVA e teste T) independentemente da inclusão das duas primeiras fitas, o que demonstra que o procedimento de limpeza realizado foi eficiente para remoção das formulações sobre a pele.

Figura 22- Quantidade total de fármaco ( $\text{ng}/\text{cm}^2$ ), medido nas fitas dos locais de aplicação dos genéricos A e B e do Bactrobran® em catorze áreas de pele dorsal de porco, sendo a figura 22-A sem as duas primeiras fitas ( $n=18$ ) e a 22-B com as duas primeiras fitas ( $n=20$ ).

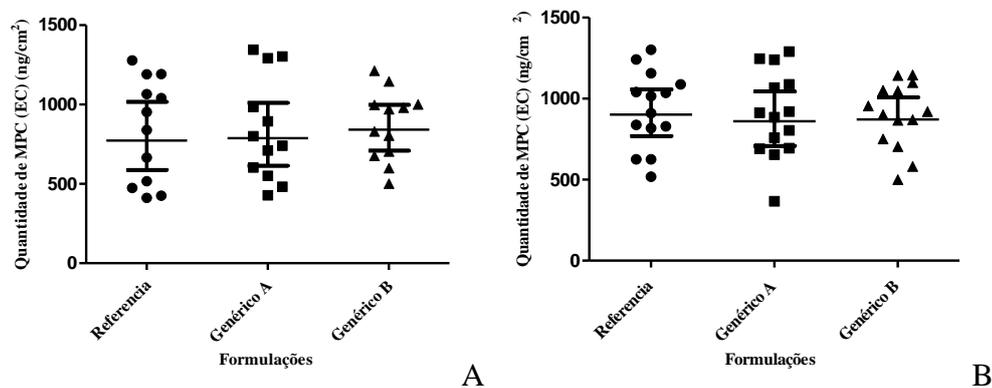


Tabela 9-

Tabela 9- Média, DP e CV% para a quantidade de fármaco por centímetro quadrado no EC 6 h após a aplicação sem as duas primeiras fitas das três formulações contendo MPC ( $n = 14$ ).

| Concentração   | Estatística | Formulações |            |            |
|--|-------------|-------------|------------|------------|
|  |             | Bactrobran® | Genérico A | Genérico B |
| Concentração de fármaco absorção $\text{ng}/\text{cm}^2$ | Média       | 837,7       | 844,4      | 868,7      |
|  | DP          | 325,7       | 325,4      | 219,2      |
|  | CV%         | 38,88%      | 38,54%     | 25,24%     |

Tabela 10- Média, DP e CV% para a quantidade de fármaco por centímetro quadrado no EC 6 h após a aplicação com todas as fitas das três formulações contendo MPC ( $n = 14$ ).

| Concentração   | Estatística | Formulações |            |            |
|--|-------------|-------------|------------|------------|
|  |             | Bactrobran® | Genérico A | Genérico B |
| Concentração de fármaco absorção $\text{ng}/\text{cm}^2$ | Média       | 931,7       | 901,7      | 896,0      |
|  | DP          | 236,8       | 265,1      | 202,2      |
|  | CV%         | 25,41%      | 29,40%     | 22,57%     |

Estes resultados demonstram que estudos realizados com a pele excisada de porco (geralmente considerada como modelo aceitável para mimetizar a pele humana), pode ser útil para predição de um modelo *in vivo*, sendo inclusive de grande valor a disponibilidade desta

alternativa no desenvolvimento e na otimização de formulações tópicas (LEAL et al., 2017; CORDERY et al., 2017).

#### 5.4.2 Tolerabilidade

Um total de 14 voluntários saudáveis, 11 mulheres e 3 homens, foram incluídos no estudo após a assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). A média (faixa) da idade, do peso e da altura dos voluntários eram de 25 anos (20-39); 63,5 (55-80) kg; e 164 (156-175) cm, respectivamente. Cinco voluntárias apresentaram fototipo de pele II e V e nove voluntários tiveram fototipo de pele III e IV. Ao final do estudo observou-se que todos os voluntários apresentaram vermelhidão temporária em alguns locais após o procedimento de *tape stripping*.

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

O estudo de DPK *in vivo* foi conduzido com todas as formulações a fim de verificar a correlação entre os resultados obtidos nos testes de EF e IVRT. Assim, a BE foi avaliada após 6 horas de aplicação do medicamento de referência Bactroban® e dos três medicamentos testes (genérico A, B e similar) usando a razão do log transformado da quantidade de fármaco( $\text{ng}/\text{cm}^2$ ) (média  $\pm$  intervalo de confiança de 90%) (tabela 11).

Tabela 11- Avaliação de bioequivalência dos medicamentos contendo MPC (genéricos A, B e similar) em comparação com o medicamento de referência (Bactroban®).

| Formulação/ Estatística | Genérico A | Genérico B | Similar |
|-------------------------|------------|------------|---------|
| <b>Média</b>            | 0,964      | 0,970      | 0,547   |
| <b>CI superior</b>      | 1,053      | 1,173      | 0,383   |
| <b>CI inferior</b>      | 0,883      | 0,803      | 0,782   |

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. Os resultados corroboram com os dados obtidos nos testes de EF e IVRT demonstrando a aplicação bem sucedida do método N'Dri-Stempfer, tal como já havia sido testada em nosso grupo, para preparações contendo metronidazol, demonstrando mais uma vez, ser suficiente o uso de apenas 14 voluntários para distinguir os produtos de forma clara (ARAUJO, 2016). Vários outros trabalhos têm demonstrado utilidade da técnica de DPK *in vivo* na comparação de produtos tópicos à exemplo: DE FREITAS et al., 2015; HERKENNE et al., 2006; PERSHING et al., 2002. Estes trabalhos confirmam a capacidade deste método para

demonstrar a bioequivalência de PTD, ainda que o Brasil, não possua requisitos específicos na abordagem desta técnica.

Ainda que as formulações aqui testadas sejam simples e contenham apenas polietilenoglicol e MPC, é de se esperar que qualquer alteração de excipientes na composição venha a impactar na eficácia e segurança do medicamento. Á exemplo, um estudo conduzido por Radka e Josef, em 2014, utilizando o medicamento de referência aqui estudado (Bactroban®), demonstrou que a adição de alaptide micronizada a 1% (agente de permeação cutânea) foi capaz de aumentar a permeação do antibiótico em 5 vezes no intervalo de 1 hora. Isso só demonstra que apesar de excipientes serem considerados farmacologicamente inativos, eles podem exercer um efeito direto ou indireto na penetração de fármacos na pele e, em decorrência disso, diferenças na biodisponibilidade de diferentes formulações tópicas, contendo a mesma concentração de fármaco, vêm sendo observada ao longo dos anos, o que só reforça a grande importância de uma readequação da nossa legislação (SOARES et al., 2015; RADKA; JOSEF, 2014; HARRISON et al., 2009).

#### *5.4.4 DPK: pontos críticos e refinamento*

O método DPK foi descrito pela FDA em um guia específico (FDA, 1998) para a avaliação da BE de medicamentos tópicos, mas foi parcialmente retirado em 2002, principalmente em virtude de problemas com relação a reprodutibilidade do método (FDA, 2002; PERSHING, 2001; CONNER, 2001; FRANZ, 2001). Alguns artigos têm abordado os pontos críticos e limitações do método que devem ser considerados, à exemplo:

- (1) o sítio de ação do ativo deve se limitar ao EC ou epiderme viável sem que ocorra qualquer outro fenômeno significativo na pele (ligação, metabolismo, etc).
- (2) características do ativo como peso molecular, lipofilicidade, etc.
- (3) composição/características dos excipientes à exemplo dos agentes de permeação cutânea.
- (4) Reprodutibilidade do método: sítio de aplicação, tipo de fita, pressão de aplicação, velocidade de remoção, etc. (BOIX-MONTANES, 2011; LADEMANN et al., 2009).

N'DRI-STEMPFER e colaboradores (2009) propuseram diversas melhorias no método de DPK publicado anteriormente pelo FDA (1998), entre eles: (1) Melhora no procedimento de limpeza do excesso de formulação em cada local de aplicação antes da

realização do *tape stripping*; (2) inclusão e determinação da concentração de fármaco nas duas primeiras fitas; (3) aumento no número de fitas coletados combinado com um método que garanta a remoção de quase todo o EC como por exemplo a gravimetria; (4) melhor controle da área de amostragem com as fitas, que deve ficar no interior de área de aplicação da fármaco (evitar efeitos de borda) e (5) procedimento de análise que possibilite a determinação do fármacos em todos os tapes, sozinhos ou associados em grupos. Assim, a principal questão agora, seria qual a melhor abordagem para avaliar esses dados. Em um estudo piloto (N'DRI-STEMPFER et al., 2009), a massa de EC removido por cada fita foi quantificada através da pesagem das fitas antes e após aplicação na pele. A partir destas medições, o EC coletado nas fitas foi considerado completamente reprodutível. Como resultado, o ajuste das concentrações de fármaco coletados nas diferentes quantidades EC de cada voluntário não foi considerado necessário. Isso significa que a massa de EC coletada em cada fita não precisaria ser pesada (N'DRI-STEMPFER et al., 2009). Estes dados foram corroborados por Leal et al., 2017 em estudo utilizando o econazol e mais tarde, um outro estudo realizado no nosso grupo utilizando o metronidazol, obteve resultados semelhantes (dados não publicados).

No nosso estudo, considerando ou não a quantidade de estrato córneo coletada bem como a inclusão ou não das 2 primeiras fitas, o resultado foi o mesmo, ou seja, não houve diferença estatisticamente significativa entre os produtos avaliados (*one-way* análise de variância  $p < 0,5$ ). Desta forma, este procedimento pode ser considerado seguro e reprodutível na avaliação da bioequivalência de produtos tópicos.

## CONCLUSÃO

---

## 6 CONCLUSÃO

- Os métodos desenvolvidos por CLAE-UV para procedimentos analíticos e por LC-MS/MS para procedimentos bioanalíticos apresentaram confiabilidade e segurança necessárias pois atenderam as especificações para os parâmetros avaliados conforme suas respectivas resoluções, RE 899/2003 e RDC nº 27/2012 da ANVISA.
- Os ensaios de equivalência farmacêutica contemplados na legislação brasileira atual, foram úteis para avaliação de (Q1) e (Q2) e demonstraram que o medicamento similar não foi considerado equivalente ao medicamento de referência Bactroban®.
- O estudo de liberação *in vitro* realizado através do guia SUPAC-SS 1724 do FDA conforme proposto por Shah 2015, foram úteis para avaliação de (Q3) e demonstrou ser o medicamento similar o único não semelhante ao medicamento de referência (Bactroban®) dentre todas as formulações testadas.
- Os testes físico-químicos associados à taxa de IVRT contribuíram para avaliar a bioequivalência das formulações contendo MPC, corroborando com guias proposto internacionalmente e auxiliando a classificar as formulações contendo MPC a 2% na forma farmacêutica pomada, como um medicamento classe 1, conforme o SCPT proposto por Shah (2015), evitando assim o ensaio clínico e apoiando a proposta do Sistema de Classificação de Medicamentos Tópicos (SCPT) baseado em Q1, Q2 e Q3 com vistas a facilitar o desenvolvimento de produtos genéricos e reduzir requerimentos regulatórios de modo que, um número maior de medicamentos tópicos com custo razoável estaria disponíveis para os pacientes e a importância de assegurar a qualidade do produto estaria mantida.
- O uso das definições de Q1, Q2 e Q3 demonstraram ser de grande relevância no desenvolvimento e no registro de produtos genéricos tópicos, com o objetivo principal de assegurar uma formulação com a mesma composição quantitativa (Q1) e qualitativa (Q2) e com um arranjo mais semelhante possível (Q3) da formulação de referência. Objetivo não contemplado pela legislação brasileira, onde os excipientes presentes nos medicamentos cópia podem diferir qualitativamente e quantitativamente do medicamento de referência, levando ao 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 evidenciando a grande importância de uma readequação da nossa legislação.

- Os resultados de DPK *in vitro* e *in vivo* demonstram que os genéricos A e B são estatisticamente semelhantes ao Bactroban®, corroborando com o resultado da EF e IVRT.
- Os resultados de DPK *in vivo* corroboram com os resultados de EF e IVRT no que diz respeito ao medicamento similar, demonstrando ser este bioinequivalente ao medicamento de referência Bactroban®.
- Os estudos de DPK *in vitro* e *in vivo* conduzidos contribuem para o refinamento deste método relativamente simples e mais barato em relação aos testes clínicos.
- A futura ênfase da avaliação BE para produtos dermatológicos tópicos seria direcionada ao refinamento e padronização das abordagens existentes, ao desenvolvimento de novas abordagens BE alternativas e a integração delas de modo a estabelecer as diretrizes detalhadas para cada método e a harmonização destes métodos pelos órgãos reguladores internacionais.
- Vale salientar a importância da contribuição de pesquisas acadêmicas neste âmbito que cooperam não só com as indústrias e as agências regulatórias, mas também com a qualidade do tratamento de inúmeras pessoas que utilizam produtos tópicos no tratamento de diversas doenças dado o enorme potencial da via cutânea na administração de medicamentos.

## REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) – consulta – medicamentos. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/q/?substancia=6489>>. Acesso em: 07 dez. 2017.
- ALEXANDER, R.G. et al. The chemistry of pseudomonic acid. Part 1. The absolute configuration of pseudomonic acid A. **J Chem Soc Perkin Trans 1.**, 561-565, 1978.
- 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.
- ARAÚJO, T. P. et al. Topical bio(in)equivalence of metronidazole formulations *in vivo*. **Int J Pharmaceut.**, 541, p. 167-172, 2018.
- 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 Pharm Sci.**, 13: 11-20, 2010.
- AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ed., Artmed, 677p., Porto Alegre, 2005.
- BACTROBAN®**. Product monography. Glaxosmithkline Inc. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=6973492013&pIdAnexo=1753982](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=6973492013&pIdAnexo=1753982)> Acesso em: 21 fev. 2016.
- BAINES, P.J. et al. Mupirocin: Chemistry and metabolism. Em: Wilkinson JD e Price JD, eds. London: **Royal Society of Medicine**, 13-22, 1984.
- BARAJAS-NAVA, L. A. et al. Antibiotic prophylaxis for preventing burn wound infection. **Cochrane Database Syst. Rev.**, v6, 2013.
- BARBERO A. M.; FRASCH, H. F. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: A quantitative review. **Toxicol. in Vitro**, 23 (1), p. 1 – 13, 2009.
- BARONI, A. et al. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clinics in Dermatology.**, 30, 257–262, 2012.
- BARRY, B. W. **Dermatological formulations: percutaneous absorption**. New York: Marcel Dekker, 1983.
- BARRY, B. W. Liberação transdérmica de fármacos. Em: AULTON M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. Segunda edição. Porto Alegre: Artmed,p. 504-536, 2005.
- BARRY, B. W. Reflections on transdermal drug delivery. **Pharmaceutical Science & Technology Today.**, v. 2, n. 2, p. 41-43, 1999.

BEMVINDO, C.S. **Estudo comparativo da liberação e penetração cutânea de nitrato de miconazol de emulsões tópicas comerciais**. 2006. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

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.

BORELLA, J. C. et al. Avaliação da espalhabilidade e do teor de flavonoides em forma farmacêutica semissólida contendo extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, 31(2):193- 197, 2010.

BORGHETTI, G. S.; KNORST, M. T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Braz. J. Pharm. Sci.**, 42 (4): 532-537, 2006.

BOUWSTRA, J. A. et al. New aspects of the skin barrier organization. **Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.**, 14 (1), 52, 2001.

BOUWSTRA, J. A.; PILGRIM, K.; PONEC, M. Structure of the skin barrier. In: Elias PM, Feingold KR, editors. **Skin barrier**. New York: Taylor and Francis, p. 65-95, 2006.

BRADY, A.C. et al. Survey of International Regulatory Bioequivalence Recommendations for Approval of Generic Topical Dermatological Drug Products. **The AAPS Journal.**, 17(1):121-133, 2015.

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). Resolução 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. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa nº 30, de 2 de fevereiro de 2016. **Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica - DBCA**. Brasília, DF, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 37, 03 de agosto de 2011. Dispõe sobre o Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Perguntas e respostas relacionada a resolução RDC nº 73, de 7 de abril de 2016 que 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.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos**. 2 ed. Brasília, DF, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 899, 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27, 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**, 2012.

BRITISH PHARMACOPOEIA. **Mupirocin Ointment**. London: Stationery Office, 2008.

BRONAUGH, R. L.; MAIBACH, H. I. **Percutaneous absorption: Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology**. 4a edição. Boca Raton: Taylor e Francis Group, 2005.

BRÖTZE, O. H.; BRUNNER, N.A. How many modes of action should an antibiotic have? **Curr. Opin. Pharmacol.**, 8:564–573, 2008.

BRUSCHI, M.L. et al. Semisolid systems containing propolis for the treatment of periodontal disease: *In vitro* release kinetics, syringeability, rheological, textural, and mucoadhesive properties. **J. Pharm. Sci.**, 96 (8): 2074-89, 2007.

BRYSKIER, A. **Antimicrobial agents: antibacterials and antifungals**. ASM Press, Washington, DC, 2005.

CALABRESE, E.J. Gastrointestinal and dermal absorption: interspecies differences. **Drug Metabolism Reviews**, v.15, p.1013–1032, 1984.

CERN, A. et al. Effect of solubilizing agents on mupirocin loading into and release from PEGylated nanoliposomes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 103:2131-2138, 2014.

CESUR, S. Topical antibiotics and clinical use. **Mikrobiyol Bul.**, 36(3-4):353-61, Jul-Oct, 2002.

CHANG, R. K. et al. Generic Development of Topical Dermatologic Products: Formulation Development, Process Development, and Testing of Topical Dermatologic Products. **AAPS J.**, 15(1): 41-52, 2013.

CHORILLI, M. et al. Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos. **Revista Brasileira Farm.**, v. 88, n.1, p. 7-13, 2007.

CONLY, J. M. and JOHNSTON, L.B. Mupirocin - Are we in danger of losing it? **J Infect Dis.**, 13 (3): 157-159, mai-jun, 2002.

CORDERY, S. F. et al. Topical bioavailability of diclofenac from locally-acting, dermatological formulations. **Int J Pharm.**, 529 (1-2), p. 55-64, 2017.

CORNWELL, P.A.; BARRY B.W. Effects of penetration enhancer treatment on the statistical distribution of human skin permeabilities. **Int J Pharm.**, 117; p. 101-112, 1995.

CORRÊA, N. M. et al. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, 41(1): 78-8, 2005.

COSTA, M. A. B. **Caracterização, desenvolvimento e validação do Método analítico de teor e perfil de liberação in vitro – Suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 ml.** 2011. 182f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro – Rio de Janeiro.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance, **Microbiology and molecular biology review**, p. 417–433, 2010.

DAVIS, S. S.; KHANDERIA, M. Viscoelastic properties of pharmaceutical semi-solids: characterization of the Plastibases for bioavailability studies. **J Pharm Pharmacol.** Dec; 24:Suppl:176P-177, 1972.

DEMANA, P.H. et al. Evaluation of the proposed FDA pilot dose response methodology for topical corticosteroid bioequivalence testing. **Pharm Res.** 1997;14:303–308.

DI MAMBRO, V. M.; FONSECA, M. J. V. Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. **J Pharm Biomed. Anal** 37(2): 287–95; 2005.

DORRANI, M. et al. TXA497 as a topical antibacterial agent: Comparative antistaphylococcal, skin deposition, and skin permeation studies with mupirocin. **Int J Pharm.**, 476, 199-204, 2014.

ECHEVARRÍA, L. et al. Development and validation of a liquid chromatographic method for in vitro mupirocin quantification in both skin layers and percutaneous penetration studies. **Journal of Chromatography B**, 796, 233–241, 2003.

ELIAS, P.M. Epidermal lipids, barrier function and desquamation. **J Invest Dermatol.**, v. 80, p. 44s-49s, 1983.

ELIAS, P. M. Stratum corneum defensive functions: an integrated view. **J Invest Dermatol.**, 125:183–200, 2005.

EMPINOTTI, J. C. et al. Pyodermitis. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 87, n. 2, p. 277-284, 2012.

FARAHMAND, S.; MAIBACH, H. I. Estimating skin permeability from physicochemical characteristics of drugs: A comparison between conventional models and an in vivo-based approach. **Int J Pharm.**, 375; p.41–47, 2009.

FIGUEIRA, T. G. Aplicação de pomada de ácido hialurônico extraído da crista do frango para reparo tecidual de feridas cutâneas em ratos. 2012. 102p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

FISHER, A. C. Advancing pharmaceutical quality: An overview of science and research in the U.S. FDA's Office of Pharmaceutical Quality. **Int. J. Pharm.**, 515(1): 390–402, 2016.

FRANZ, T. J. Percutaneous absorption. on the relevance of in vitro data. **J Invest Dermatol.**, 64 (3): 190-5, 1975.

FRANZ, TJ. Assessing the bioequivalence of topical & transdermal drug products, **AAPS annual Meeting**, Washington (DC), Oct 2011.

FRUIJTIER-PÖLLOTH, C. Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products. **Toxicology.** 214 1–38, 2005.

GILABERTE, Y.; PRIETO-TORRES, L.; PASTUSHENKO, I.; JUARRANZ, U. Chapter 1 - Anatomy and Function of the Skin. **Nanoscience In Dermatology.** Amsterdam, 2016.

GAO, Q. et al. Microdialysis as a tool to determine the skin concentration of mometason furoate in rats. **Pharmazie**, 69: 787–791, 2014.

GOEBEL, K. **Estudo de liberação *in vitro* do diclofenaco dietilamônio em especialidades farmacêuticas.** 2012. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, p. 1–18, 2001.

HADGRAFT, J.; WHITEFIELD, M.; ROSHER, P.H. Skin penetration of topical formulations of ibuprofen 5%: an in vitro comparative study. **Skin Pharmacol Physiol.**, 16, 137–142, 2003.

HARRISON, L.I. et al. A pharmaceutical comparison of different commercially available imiquimod 5% cream products. **J Am Acad Dermatol.**, v. 20, n.3, p.160-164, 2009.

HERKENNE, C. et al. Pig Ear Skin ex Vivo as a Model for in Vivo Dermatopharmacokinetic Studies in Man. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 8, 2006.

ILIC, T. et al. Critical quality attributes, in vitro release and correlated *in vitro* skin permeation—*In vivo tape stripping* collective data for demonstrating therapeutic (non)equivalence of topical semisolids: a case study of “ready-to-use” vehicles. **Int. J. Pharm.**, v. 528, n. 1-2, p. 253-267, 2017.

**IMPETIGO.** Disponível em: <[www.google.com.br/search?q=Impetigo](http://www.google.com.br/search?q=Impetigo)>. Acesso em: 07 dez 2017.

JAIN, P. Bioequivalence of Topical Forms Dosage. **J Farmacovigilância** 2, v.2, n2, 2014.

KALIA, Y. N.; PIROT, F.; GUY, R. H. Homogeneous transport in a heterogeneous membrane: water diffusion across human stratum corneum in vivo. **Biophys. J.**, v. 71, p. 2692-2700, 1996.

KALIA, Y.N. et al. Assessment of topical bioavailability in vivo: the importance of stratum corneum thickness. **Skin Pharmacol.**, v.14, p. 82-86, 2001.

KANFER, I. Strategies for the Bioequivalence Assessment of Topical Dermatological Dosage Forms. **J Bioequiv Availab** 2, p.102-110, 2010.

KIELHORN, J.; MELCHING-KOLLMUß, S.; MANGELSDORF, I. Environmental Health Criteria 235: **Dermal Absorption**. WHO Library Cataloguing-in-Publication-Data, 2006.

KRISHNAIAH, Y.S. et al. Development of performance matrix for generic product equivalence of acyclovir topical creams. **Int. J. Pharm.** V. 475, p. 110–122, 2014.

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

LAHOUD, M. H.; CAMPOS, R. Aspectos teóricos relacionados à reologia farmacêutica. **Visão Acadêmica**. 11(1), 2010.

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.

LEYDEN, J. J. Mupirocin: A new topical antibiotic. **Clinical development of mupirocin**. Volume 22, Number 5, Part I. May, 1990.

LIONBERGER R. **Topical Bioequivalence Update at: Advisory Committee for Pharmaceutical Science**. Disponível em: <[http://www.fda.gov/ohrms/dockets/AC/04/slides/4034S2\\_12\\_Lionberger.ppt](http://www.fda.gov/ohrms/dockets/AC/04/slides/4034S2_12_Lionberger.ppt)> Acesso em: 20 dez 2017.

LIONBERGER, R. FDA Critical Path Initiatives: Opportunities for Generic Drug Development. **The AAPS Journal**. v. 10, n. 1, 2008.

LIRA, A. A. M. et al. Desenvolvimento preliminar de gel de lapachol: estudo de permeação in vitro. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 1, p. 35-41, 2004.

LIU, B.; POP M. ARDB—Antibiotic Resistance Genes Database. **Nucleic Acids Res.** v. 37, p. 443-447, 2009.

LODEN, M. et al. Bioequivalence determination of topical ketoprofen using a dermatopharmacokinetic approach and excised skin penetration. **Int J Pharm** v. 284; n

LU, M. et al. Advance in bioequivalence assessment of topical dermatological products. **Asian J. Pharmacol.** v.11, n.6, p. 700-707, 2016.

MADISON, K. C. Barrier Function of the Skin: “La Raison d’être” of the Epidermis. **The journal of investigative dermatology**, v. 121, n.2, 2003.

MARTINS, M.R.; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, p. 33-54, 2002.

MATEUS, R. et al., Percutaneous absorption of salicylic acid – *in vitro* and *in vivo* studies. **Int J Pharmaceut.** <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.08.061>. 2014.

MELO, E. K. S. **Caracterização e estudos de liberação e permeação cutânea *in vitro* de preparações tópicas do cidofovir.** 2012. 123f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

MEYER, W.; SCHWARZ, R.; NEURAND, K. The skin of domestic mammals as a model for the human skin, with special reference to the domestic pig. **Current Problems in Dermatology.** n.7, p. 39–52, 1978.

MONTEIRO-RIVIERE, N.; RIVIERE, J.E. The pig as a model for cutaneous pharmacology and toxicology research. **Advances in Swine in Biomedical Research.** Plenum Press, New York, p. 425– 458, 1996.

MUGGLESTONE, C.J.; MARIZ, S.; LANEC, M. E. The development and registration of topical pharmaceuticals. **Int. J. Pharm.,** v.435, p. 22–26, 2012.

**MUPIROCIN.** Disponível em <<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00410>> Acesso em: 07 dez. 2016.

MURTHY N. S.; SHIVAKUMAR. H. N. Topical and Transdermal Drug Delivery. **Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems.** Department of Pharmaceutics, the University of Mississippi, USA, 2010.

MURTHY, N.S. **Topical Semisolid Drug Product Critical Quality Attributes (Q3 Characterization) With Relevance to Topical Bioequivalence.** Disponível em: <<http://www.pharmtech.com/pharmtech-webcasts>> Acesso em: 21 dez. 2017.

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

N'DRI-STEMPFER, B. et al. Optimizing metrics for the assessment of bioequivalence between topical drug products. **Pharm. Res.,** v. 25, p. 1621-1630, 2008.

NISHIHATA, T. et al. Percutaneous absorption of diclofenac in rats and humans: aqueous gel formulation. **Int J Pharm.,** v. 46, p.1-7, 1988.

OPATRILOVA, R.; JAMPILEK, J. Rapid Screening of Mupirocin Skin Permeation Modification by Micronized and Nanonized Alaptide. **ADMET & DMPK 2.,** v.1. p. 56-62, 2014.

OSTRENGA, J.; STEINMETZ, C.; POULSEN, B. Significance of vehicle composition. I. Relationship between topical vehicle composition, skin penetrability and clinical efficacy. **J Pharm Sci.,** v. 60, p. 1175–1179, 1971.

PAPP, A.; HARTWELL, R.; EVANS, M.; GHAHARY, A. The safety and tolerability of topically delivered kynurenic acid in humans. A Phase 1 Randomized Double-Blind Clinical Trial. **J. Pharm. Sci.** doi: 10.1016/j.xphs.2018.01.023, 2018.

PIRES, C. A. et al. Infecções bacterianas primárias da pele: perfil dos casos atendidos em um serviço de dermatologia na Região Amazônica, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n. 2, p. 45-50, 2015.

PORRAS-LUQUE, J. I. Antimicrobianos tópicos en dermatología. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 98, p. 29-39, 2007.

PRAÇA, G. S. F. et al. Avaliação de parâmetros críticos para estudos *in vitro* de permeação e penetração na pele usando modelos de pele animal. **Eur J Pharm Sci.**, v. 111, p. 121–132, 2017.

RANEY, S.G. et al. Pharmacokinetics-based approaches for bioequivalence evaluation of topical dermatological drug products. **Clin. Pharmacokinet.**, v. 54, p.1095-1106, 2015.

REIFENRATH, W.G.; SPENCER, T.S. Evaporation and penetration from skin. In: Bronaugh, R., Maibach, H. (Eds.), **Percutaneous Absorption: Mechanisms, Methodology and Drug Delivery**. Marcel Dekker, Inc New York, p. 305– 325, 1985.

SANTOS, P. et al. Oxybutynin permeation in skin: the influence of drug and solvent activity. **Int. J. Pharm.**, v. 384, p. 67–72, 2010.

SATO, M. E. O. et al. Permeação cutânea in vitro do ácido kójico. **Braz J Pharm Sci.**, v.43, n.2, p.195-203, 2007.

SHAH, V. P et al. *In vivo* percutaneous penetration/absorption. **Int J Pharm**, v. 74, p. 1-8, 1991.

SHAH, V. P. et al. A science based approach to topical drug classification system (SCPT). **Int. J. Pharm.**, v. 491, n.1, p. 21-25, 2015.

SHAH, V. P.; ELKINS, J. S.; WILLIAMS, R. L. *In vitro* drug release measurement for topical glucocorticoid creams. **Pharmacoepial Forum**, v. 19, n. 2, p. 5048-5060, 1999.

SHANLEY, A. Topical Formulation: Moving From Art to Science. APIs, Excipients, and Manufacturing, **Supplement to Pharmaceutical Technology**, v. 40, n.9, p. 26–29, 2016.

SILVA, J.A. et al. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.31. n3, p.125-131, 2010.

SOARES, K.C.C. et al. Bioequivalence of dermatological topical medicines: the brazilian scenario and the challenges for health surveillance. *Ciência & Saúde Coletiva*. 20(11):3599-360, 2015.

SOARES, K. C. C. **O registro de medicamentos tópicos no brasil**. 2017. 109f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de Brasília – Brasília.

STEVENS, D. L. Impetigo. **Netter's Infectious Diseases**, p. 78-80, 2012.

STORPIRTIS S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C. **Ciências Farmacêuticas: Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

SUHONEN, T. M.; BOUWSTRA J. A.; URTTI, A. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural. **J. Control. Rel.**, v.59, p. 149–161, 1999.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA / THE NATIONAL FORMULARY. **USP 37–NF 32; GENERAL CHAPTER <1724> Semisolid Drug Products - Performance Tests**, p. 1273–1284, 2014.

TSAKOVSKA, I. et al. Quantitative structure-skin permeability relationships. **Toxicology**, v.387, p. 27–42, 2017.

USA. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration (FDA).Center of Drug Evaluation and Research (CDER). **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 (CDER). **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). Administration, Office of Generic Drugs. **Draft guidance on acyclovir ointment**. 2012. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm296733.pdf>>. Acesso em 13 nov. 2017.

USA. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration (FDA). Administration, Office of Generic Drugs. **Draft guidance on acyclovir cream**. 2014. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM428195.pdf>>. Acesso em 13 nov. 2017.

USA. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration (FDA). Administration, Office of Generic Drugs. **Draft guidance on cyclosporine ophthalmic emulsion**. 2013. Disponível em:<<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm358114.pdf>>. Acesso em 13 nov. 2017.

USA. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration (FDA). Administration, Office of Generic Drugs. **Draft Guidance on Difluprednate ophthalmic emulsion**. 2016. Disponível em:<<https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceinformation/guidances/ucm481813.pdf>> Acesso em 13 nov. 2017a.

USA. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration (FDA). Administration, Office of Generic Drugs. **Draft guidance on ivermectin cream topical**. 2017. Disponível em:<<https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM573031.pdf>> Acesso em 13 nov. 2017a.

USA. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration (FDA). Administration, Office of Generic Drugs. **Draft guidance on docosanol cream topical.** 2017. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM572999.pdf>> Acesso em 13 nov. 2017b.

USA. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration (FDA). Administration, Office of Generic Drugs. **Draft guidance on lidocaine and Prilocaine cream.** Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM428209.pdf>> Acesso em 15 de dez de 2017.

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

USA. **Topical Drug Products Regulatory Requirements.** Apresentação by Vinod P.Shah, disponível em: <<http://www.ipapharma.org/pdf/speaker/1.02%20Vinod%20Shah%20topical.pdf>> Acesso em: 21 dez. 2017.

VECCHIA, B.E.; BUNGE, Animal models: A comparison of permeability coefficients for excised skin from humans and animals. **Dermal Absorption Models in Toxicology and Pharmacology.** In: Riviere, J.E. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, pp. 305–333, 2006.

WAGNER, H. et al. Human Skin Penetration of Flufenamic Acid: *In Vivo/In Vitro* Correlation (Deeper Skin Layers) for Skin Samples from the Same Subject. **J Invest Dermatol.**, v. 118, n.3, p. 540-4, 2002.

WALKER, M.; DUGARD, P. H.; SCOTT, R.C. In vitro percutaneous-absorption studies – a comparison of human and laboratory species. **Human Toxicology 2**, p. 561– 562, 1983.

WANG, Y.Y.; HONG, C.T.; CHIU, W.T, FANG, J. Y. *In vitro* and *in vivo* evaluations of topically applied capsaicin and nonivamide from hydrogels. **Int J Pharm**, v. 224, p. 84-104, 2001.

WARD, A; CAMPOLI-RICHARDS, D. M. Mupirocin: A Review of Its Antibacterial Activity, Pharmacokinetic, Properties and Therapeutic Use. **Drugs.** v. 32, p. 425-444, 1986.

WATKINSON, R. M. et al. Optimisation of cosolvent concentration for topical drug delivery – III: influence of lipophilic vehicles on ibuprofen permeation. **Skin Pharmacol. Physiol.**, v.24, p. 22–26, 2011.

WERTZ, P. W.; VAN DEN BERGH, B. The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers. **Chem Phys Lipids.**, v. 91, p.85-96, 1988.

WESTER, R.; MAIBACH, H. In: Drill, V.A., Lazar, P. (Eds.), **Cutaneous Toxicology**. Academic, New York, p. 111, 1977.

WIKETT R. R; VISSCHER M. O. Structure and function of the epidermal barrier. **American Journal of Infection Control.**, v. 34, ed 10, p. S98-S110, 2006.

WILHELM, K. P.; MAIBACH, H. I. Factors predisposing to cutaneous irritation. **Dermatol Clin.**, v. 8, p. 17-22, 1990.

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

## 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, rubriche 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 reprodutíveis. Dessa forma, poderão ser utilizadas para o estabelecimento da (in)equivalência entre formulações que contêm o mesmo ativo 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><br> | <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](http://aplicacao.saude.gov.br/plataformabrasil/visao/pesquisador/gerirPesquisa/gerirPesquisaAgrupador.jsf) 🔍 ☆ 🌐 ☰

**Saúde**  
Ministério da Saúde

 **Plataforma Brasil**  principal  sair

Público
Pesquisador
Alterar Meus Dados

LEILA BASTOS LEAL - Pesquisador | V3.0

Cadastros 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

## ANEXO C – Comprovante de submissão do artigo

**BJPS Admin <onbehalf@manuscriptcentral.com>**

para leila.leal, isabelle.fitti., mim, giovana.sousa, davi.santana, leila.leal

06-Dec-2017

Dear

Dr.

Leal:

Your manuscript entitled "**Topical Bioequivalence: Evaluation of Hydrocortisone acetate, Betamethasone valerate and Mupirocin marketed Brazilian products**" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.

Your manuscript ID is BJPS-2017-0804.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/bjps-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/bjps-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.

Sincerely,

Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences Editorial Office