



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

ISABELLE MOURA FITTIPALDI DE SOUZA DANTAS CAVALCANTI

**BIOEQUIVALÊNCIA TÓPICA DE FORMULAÇÕES CONTENDO
GLICOCORTICOIDES: avaliação dermatofarmacodinâmica x
dermatofarmacocinética (dpk)**

**Recife
2020**

ISABELLE MOURA FITTIPALDI DE SOUZA DANTAS CAVALCANTI

**BIOEQUIVALÊNCIA TÓPICA DE FORMULAÇÕES CONTENDO
GLICOCORTICOIDES: avaliação dermatofarmacodinâmica x
dermatofarmacocinética (dpk)**

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

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Leila Bastos Leal

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

Recife

2020

Catálogo na fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

- C376b Cavalcanti, Isabelle Moura Fittipaldi de Souza Dantas.
Bioequivalência tópica de formulações contendo glicocorticoides:
avaliação dermatofarmacodinâmica x dermatofarmacocinética (dpk) /
Isabelle Moura Fittipaldi de Souza Dantas Cavalcanti. – 2020.
129 f.: il.; tab.; 30 cm.
- Orientadora: Leila Bastos Leal.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2020.
Inclui referências, apêndices e anexos.
1. Glicocorticoides. 2. Bioequivalência. 3. Equivalentes farmacêuticos.
4. Administração cutânea. 5. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. I.
Leal, Leila Bastos (Orientadora). II. Título.
- 615.3 CDD (20.ed.) UFPE (CCS2020-176)

ISABELLE MOURA FITTIPALDI DE SOUZA DANTAS CAVALCANTI

**BIOEQUIVALÊNCIA TÓPICA DE FORMULAÇÕES CONTENDO
CORTICOIDES: avaliação dermatofarmacodinâmica x dermatofarmacocinética
(dpk)**

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

Aprovada em: 19 de fevereiro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Leila Bastos Leal (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

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

Prof.^a Dr.^a Mônica Felts de La Roca Soares (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Cláudia Elise Ferraz Silva (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Ana Amélia Moreira Lira (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Sergipe

Prof.^a Dr.^a Kelen Carine Costa Soares (Examinadora Externa)
Agência Nacional de Vigilância Sanitária

À minha mãe Edine, pela dedicação e
amor incondicional, e ao meu marido
Eduardo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem ele eu não teria traçado o meu caminho, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada.

À minha mãe Edine, pois confiou em mim e sempre me apoia em tudo. Sei que você não mediria esforços para que este sonho se realizasse. Sem sua compreensão, ajuda e confiança, nada disso seria possível hoje. A você, além da dedicatória desta conquista, dedico a minha vida. Te amo!

Ao meu marido Eduardo, por toda paciência, compreensão, carinho e amor e por me ajudar muitas vezes a achar soluções quando elas pareciam não existir. Você foi a pessoa que compartilhou comigo os momentos de tristeza e alegria. Te amo!

À minha Orientadora, Prof.^a Dr.^a Leila Bastos Leal, pela confiança, orientação, ensinamentos, sempre dedicando parte de seu tempo com paciência, compreensão e incentivo que me fizeram crescer.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Davi Pereira de Santana, pelos ensinamentos e apoio.

Aos meus amigos, em especial a Carol Chagas, Irla e Karol, que estiveram ao meu lado, sempre ajudando no que fosse preciso e fazendo o dia-a-dia de trabalho ser mais leve.

À Giovana por toda a ajuda que foi de suma importância.

Ao professor Danilo Bedor, e Wellithom por todo auxílio nos ensaios analíticos.

A todos os integrantes do NUDFAC, por todo apoio e ajuda.

Ao professor Isadore Kanfer (Univerdade de Toronto/Universidade de Rhodes), e ao farmacêutico Daniel da Mota pelo auxílio nos cálculos do estudo dermatofarmacodinâmico.

A todos os voluntários que participaram com dedicação e paciência dos estudos.

A todos os professores e funcionários que fazem parte da pós-graduação, sempre solícitos e gentis.

A CAPES pela concessão da bolsa.

A todos que contruíram de uma forma ou de outra para realização deste trabalho, deixo meus sinceros agradecimentos.

A Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) minha segunda casa desde a graduação, pela estrutura fornecida.

“Somos aquilo que tem de acontecer.”
(LISPECTOR, 2014, p.84).

RESUMO

Os glicocorticoides de uso tópico, entre eles, o acetato de hidrocortisona (AHC), valerato de betametasona (VBM) e propionato de clobetasol (PPC), considerados segundo o formulário britânico nacional como corticoides de baixa, média e alta potência, respectivamente, são utilizados no tratamento de diversas patologias, entre elas a psoríase. Além das formulações de referência, esses fármacos estão disponíveis no mercado brasileiro também como produtos genéricos, sendo, portanto, intercambiáveis. Para registro destes produtos, de acordo com a legislação atual, é necessário apenas a realização de estudos de equivalência farmacêutica (EF), que avalia unicamente parâmetros físico-químicos das formulações, não havendo garantia de que estes medicamentos genéricos possuem o mesmo grau de segurança e eficácia do medicamento de referência. Baseado no acima exposto, neste estudo foram avaliadas seis formulações genéricas cremosas contendo AHC 1%, VBM 0,1%, ou PPC 0,05%, disponíveis no mercado brasileiro, e comparadas com o seu respectivo medicamento de referência, através de ensaios físico-químicos e estudos de liberação *in vitro*. Estudos *ex vivo* e *in vivo* (dermatofarmacocinéticos e dermatofarmacodinâmicos) foram também realizados para formulações contendo PPC a 0,05%. Os ensaios de EF realizados, conforme preconizado pela legislação Brasileira vigente, demonstraram que 5 dentre 6 formulações genéricas estudadas, com exceção do genérico A contendo AHC, foram considerados equivalentes ao medicamento referência. Considerando o guia SUPAC-SS 1724 para avaliação do estudo de liberação *in vitro* como critério de admissão de equivalência, apenas o genérico D contendo VMB, foi considerado equivalente. As formulações de PPC (genéricos E e F) avaliadas neste trabalho, foram consideradas bioequivalentes com o medicamento referência através da dermatofarmacodinâmica e dermatofarmacocinética. Por fim, concluímos que este estudo será útil para usuários, pesquisadores e agência regulatória brasileira, no que trata do registro de produtos tópicos genéricos contendo glicocorticosteroides.

Palavras-chave: Glicocorticoides. Bioequivalência. Equivalentes Farmacêuticos. Administração cutânea. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

ABSTRACT

The topical glucocorticoids, including hydrocortisone acetate (AHC), betamethasone valerate (VBM) and clobetasol propionate (PPC), considered, according to the British national form as low, medium and high potency corticosteroids, respectively, are used in the treatment of several pathologies, including psoriasis. In addition to the brand-name drugs, these products are also available on the Brazilian market as generic products, and are therefore interchangeable. For the registration of these products, according to the current legislation, it is only necessary to carry out pharmaceutical equivalence (PE) studies, which are evaluated only for physical-chemical use of the formulations, without guarantee that these generic drugs are used with the same degree of safety and efficacy as the brand-name formulation. Based on the above, in this study, six generic drug formulations containing 1% AHC, 0.1% VBM or 0.05% PPC, available on the Brazilian market, were evaluated and compared with their reference drug, through physical-chemical tests and *in vitro* release studies. *Ex vivo* and *in vivo* studies (dermatopharmacokinetics and dermatopharmacodynamics) were also performed for formulations containing PPC. The PE tests carried out, as recommended by the current Brazilian legislation, demonstrated that 5 of the 6 generic formulations studied, with the exception of the specified generic A A AHC, were equivalent to the brand-name drug. Considering the SUPAC-SS 1724 guide for evaluating the *in vitro* release study as an equivalence admission criterion, only the generic D containing VMB was considered equivalent. The PPC formulations (generic E and F) evaluated in this work, were considered bioequivalent with the reference drug through the dermatopharmacokinetics and dermatopharmacodynamics evaluation. Finally, we conclude that this study will be useful for users, researchers and the Brazilian regulatory agency, regarding the registration of generic topical products containing glucocorticosteroids.

Keywords: Glucocorticoids. Therapeutic Equivalency. Pharmaceutical equivalents. Administration Cutaneous. Brazilian Health Surveillance Agency.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química do propionato de clobetasol.....	30
Figura 2 - Estrutura química do valerato de betametasona.....	31
Figura 3 - Estrutura química do acetato de hidrocortisona	32
Figura 4 - Representação da estrutura da pele.....	34
Figura 5 - Representação da técnica de <i>tape-stripping</i>	38
Figura 6 - Branqueamento cutâneo momentâneo causado por glicocorticoide.....	40
Figura 7 - Sistema de Classificação de Formulações Tópicas.....	43
Figura 8 - Diagrama esquemático mostrando os sítos de aplicação das formulações demarcadas na região ventral de cada antebraço.....	55
Figura 9 - Representação esquemática da aplicação sequenciada com remoção sincronizada.....	56
Figura 10 - Cromatograma indicativo da seletividade do método (a) Placebo, (b) solução padrão de AHC (A), VBM (B), PPC (C).....	72
Figura 11 - Curva de regressão linear obtida da média de três curvas de calibração do AHC (A), VMB (B), e PPC (C).....	73
Figura 12 - Cromatograma indicativo da seletividade do método PPC (A) e DB (B)...	74
Figura 13 - Curva de regressão linear obtida da média de três curvas de calibração autênticas.....	75
Figura 14 - Cromatograma ilustrativo do efeito matriz (a) epiderme/derme, (b) EC do (A) PPC e (B) PI.....	76
Figura 15 - Perfil de liberação das formulações contendo AHC (A), VBM (B) e PPC (C).....	79
Figura 16 - Área sob a curva em todos os tempos e o modelo $E_{\text{máx}}$ ajustado (linha sólida) do Berlison® (A), Betnovate® (B) e Psorex® (C), aos dados de duração dose-resposta do branqueamento dos 12 participantes de pesquisa do estudo piloto.....	83

Figura 17 - Branqueamento causado pelas formulações de PPC, após 10 minutos de contato das formulações.....	85
Figura 18 - Branqueamento causado pelas formulações de PPC, cerca de 19 horas após a remoção das formulações.....	86
Figura 19 - Perfil cinético da quantidade de PPC no EC <i>in vivo</i> durante a fase de absorção e eliminação.....	90
Figura 20 - Quantidades de fármaco por unidade de área (ng/cm ²) das determinações em duplicata em cada voluntário para as três formulações de PPC avaliados após 10 minutos de absorção (A), e 19 horas de eliminação (B).....	91
Figura 21 - Comparação do fluxo <i>in vivo</i> e fluxo <i>in vitro</i> deduzido na avaliação de PPC no EC em voluntários humano (n=14) e pele de porco (n=6).....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos glicocorticoides tópicos de acordo com sua potência pela Fundação Nacional de Psoríase dos EUA.....	27
Tabela 2 - Classificação dos glicocorticoides tópicos de acordo com sua potência pelo Formulário Britânico Nacional.....	28
Tabela 3 - Classificação dos glicocorticoides tópicos de acordo com sua potência pelo Consenso Brasileiro de Psoríase.....	28
Tabela 4 - Ensaios necessários para registro de medicamentos tópicos genéricos pelas agências reguladoras do Brasil, EUA, Canadá, Europa e Austrália.....	46
Tabela 5 - Condições cromatográficas para detecção do AHC, VBM e PPC por CLAE -UV.....	49
Tabela 6 - Representação esquemática do modelo de aplicação das formulações no estudo principal.....	58
Tabela 7 - Composição das formulações de AHC.....	65
Tabela 8 - Composição das formulações de VBM.....	66
Tabela 9 - Composição das formulações de PPC.....	67
Tabela 10 - Resultados do pH, teor, viscosidade aparente e densidade do AHC, VBM e PPC.....	69
Tabela 11 - Estabilidade das amostras armazenadas antes e após o processo de extração.....	77
Tabela 12 - Valores médios para a recuperação do PPC no EC e epiderme/derme...	77
Tabela 13 - Solubilidade do AHC, VBM e PPC à 32°C em três diferentes meios receptores Média $\pm$ DP, n=3.....	78
Tabela 14 - Resultado estatístico comparativo entre as formulações referência e genéricas de AHC, VBM e PPC.....	80

Tabela 15 - Taxa de liberação e coeficiente de determinação das formulações contendo o fármaco AHC, VBM e PPC.....	82
Tabela 16 - Valores médios de ASC dos participantes de pesquisa que atenderam ao critério de resposta à duração de dose (Genérico E x Referência).....	86
Tabela 17 - Valores médios de ASC dos participantes de pesquisa que atenderam ao critério de resposta à duração de dose (Genérico F x Referência).....	87
Tabela 18 - Concentração de PPC recuperado do EC após absorção e eliminação, fluxo deduzido do fármaco para o tecido viável durante o período de eliminação ($J_{in vivo}$) e a constante de taxa de primeira ordem (K) que descreve a eliminação do EC. Média aritmética $\pm$ intervalo de confiança de 90% (n = 14).....	92
Tabela 19 - Avaliação de bioequivalência dos medicamentos contendo PPC (genéricos E e F) em comparação com medicamento de referência (Psorex®) determinada em 14 voluntários da concentração de PPC / área. Bioequivalência foi avaliada através da razão entre o log transformado da concentração de fármaco no EC (média $\pm$ 90% de intervalo de confiança) após 10 minutos de absorção, com ou sem eliminação de 19 horas.....	93
Tabela 20 - Média da quantidade de PPC na epiderme/derme (ng/cm^2), após um período de absorção e eliminação (n=6)	96
Tabela 21 - Média aritmética da quantidade de PPC no EC (ng/cm^2), após um período de absorção e eliminação, incluindo o intervalo de confiança superior e inferior (n=6).....	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrópico
AEM	Agência Europeia de Medicamentos
AHC	Acetato de hidrocortisona
AINE	Anti-inflamatório não esteroide
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC	Área sob a curva
BE	Bioequivalência
BD	Biodisponibilidade
CLAE-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção Ultravioleta
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
D.P	Desvio padrão
DPK	Dermatofarmacocinética
EC	Estrato córneo
EF	Equivalência farmacêutica
EMA	Agência Europeia de Medicamentos
EUA	Estados Unidos da América
F. BRAS	Farmacopeia Brasileira
FDA	Food and Drug Administration
GCs	Glicocorticoides
GCTs	Glicocorticoides tópicos
HSD1	Hidroxiesteróide desidrogenase tipo 1
HSD2	Hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2

IC	Intervalo de confiança
IGDRP	International Generic Drug Regulators Pilot
ILs	Interleucinas
INS	Instituto Nacional de Saúde
IVRT	<i>in vitro</i> Release Test
LC MS/MS	Liquid chromatography tandem-mass spectrometry
OMS	Organização Mundial de Saúde
PPC	Propionato de clobetasol
PI	Padrão interno
Q1	Similaridade qualitativa
Q2	Similaridade quantitativa
Q3	Similaridade microestrutural
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução
RNA mensageiro	Ácido ribonucleico mensageiro
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
SCFT	Sistema de Classificação para Formulações Tópicas
TNF	Fator de Necrose Tumoral
VBM	Valerato de betametasona

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	centímetro
cm ²	centímetro quadrado
cv %	coeficiente de variação percentual
°C	grau Celsius
g	grama
h	hora
Log P	coeficiente de partição
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
ng	nanograma
Pa.s	Pascal segundo
%	porcentagem
pH	potencial hidrogeniônico
r	coeficiente linear
rpm	rotações por minuto
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVOS	24
2.1	OBJETIVO GERAL	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
3.1	CORTICOSTEROIDES.....	25
3.1.1	Glicocorticoides tópicos.....	26
3.1.2	Classificação dos glicocorticoides.....	26
3.2	PROPIONATO DE CLOBETASOL.....	29
3.3	VALERATO DE BETAMETASONA.....	31
3.4	ACETATO DE HIDROCORTISONA.....	32
3.5	PELE.....	33
3.5.1	Pele humana.....	33
3.5.2	Pele animal.....	35
3.6	BIODISPONIBILIDADE RELATIVA/BIOEQUIVALÊNCIA: TÓPICA.....	36
3.7	ESTUDO DERMATOFARMACOCINÉTICO (DPK).....	37
3.8	ESTUDO DERMATOFARMACODINÂMICO.....	39
3.9	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE BIOEQUIVALÊNCIA TÓPICA.....	42
3.10	LEGISLAÇÃO BRASILEIRA X LEGISLAÇÃO INTERNACIONAL: BIOEQUIVALÊNCIA DE FORMULAÇÕES TÓPICA.....	44
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
4.1	INSUMOS E FORMULAÇÕES.....	47
4.1.1	Insumos.....	47
4.1.2	Formulações.....	47

4.2	EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA	47
4.2.1	Avaliação das características organolépticas	47
4.2.2	Determinação do pH.....	47
4.2.3	Densidade aparente.....	48
4.2.4	Determinação da viscosidade aparente.....	48
4.2.5	Teor.....	48
4.2.6	Análise estatística.....	48
4.3	VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO/BIOANALÍTICO.....	48
4.3.1	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de ultravioleta (CLAE-UV).....	48
4.3.2	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de massas (LC-MS/MS).....	49
4.3.2.1	Condições cromatográficas.....	50
4.3.2.2	Validação do método.....	50
4.3.2.3	Efeito matriz.....	50
4.3.2.4	Estabilidade das amostras.....	50
4.3.2.5	Recuperação.....	51
4.3.3	Análise dos dados.....	51
4.4	ESTUDO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO AHC, VBM e PPC.....	51
4.4.1	Seleção do meio receptor.....	51
4.4.2	Cinética de liberação <i>in vitro</i>	52
4.4.3	Coleta e quantificação de AHC, VBM e PPC nas amostras.....	52
4.4.4	Análise da cinética de liberação <i>in vitro</i>	52
4.4.5	Análise comparativa das taxas de liberação.....	52
4.5	ESTUDO DERMATOFARMACODINÂMICO.....	53
4.5.1	Estudo piloto.....	53
4.5.1.1	Demarcação dos locais de tratamento.....	54

4.5.1.2	Aplicação randomizada, remoção da formulação e avaliação do branqueamento.....	55
4.5.1.3	Análise dos dados.....	56
4.5.2	Estudo principal (Bioequivalência).....	57
4.5.2.1	Demarcação dos locais de tratamento e aplicação das formulações.....	57
4.5.2.2	Aplicação randomizada remoção da formulação e avaliação do branqueamento.....	57
4.5.2.3	Análise dos dados de bioequivalência.....	58
4.6	ESTUDO DERMATOFARMACOCINÉTICO (DPK) <i>IN VIVO</i>	59
4.6.1	Design do estudo.....	59
4.6.2	Tape-stripping.....	60
4.6.3	Tolerabilidade.....	61
4.6.4	Processamento das amostras.....	61
4.6.5	Análise dos dados.....	61
4.7	ESTUDO DE PERMEAÇÃO <i>EX VIVO</i> , RETENÇÃO CUTÂNEA E <i>TAPE-STRIPPING</i> DO PPC EM PELE ANIMAL (SUÍNA).....	63
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1	FORMULAÇÕES.....	65
5.2	EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA.....	69
5.2.1	Avaliação das características organolépticas.....	69
5.2.2	Determinação do pH, teor, viscosidade aparente e densidade.....	69
5.3	VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO/BIOANALÍTICO.....	71
5.3.1	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de ultravioleta (CLAE-UV).....	71
5.3.2	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de massas (LC-MS/MS).....	74
5.3.2.1	Efeito matriz.....	75

5.3.2.2	Estabilidade das amostras.....	76
5.3.2.3	Recuperação.....	77
5.4	ESTUDO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO AHC, VBM e PPC.....	77
5.4.1	Seleção do meio receptor.....	77
5.4.2	Cinética de liberação <i>in vitro</i>.....	78
5.5	ESTUDO DERMATOFARMACODINÂMICO.....	83
5.5.1	Estudo piloto.....	83
5.5.2	Estudo principal.....	84
5.6	ESTUDO DERMATOFARMACOCINÉTICO (DPK) <i>IN VIVO</i>	89
5.6.1	Tolerabilidade.....	89
5.6.2	Estudo piloto.....	89
5.6.3	Estudo principal (Bioequivalência).....	91
5.7	DERMATOFARMACOCINÉTICA x DERMATOFARMACODINÂMICA.....	94
5.8	ESTUDO DE PERMEAÇÃO <i>EX VIVO</i> , RETENÇÃO CUTÂNEA E <i>TAPE-STRIPPING</i> DO PPC EM PELE ANIMAL (SUÍNA).....	95
6	CONCLUSÃO.....	98
	REFERÊNCIAS.....	100
	APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO NO <i>LATIN AMERICAN JOURNAL OF PHARMACY</i>.....	114
	ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DERMATOFARMACOCINÉTICA.....	122
	ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DERMATOFARMACODINÂMICA.....	125

1 INTRODUÇÃO

Os glicocorticoides tópicos (GCTs), disponíveis como medicamentos genéricos e/ou referência, são os medicamentos mais frequentemente prescritos pelos dermatologistas, e sua eficácia clínica no tratamento de doenças, entre elas a psoríase e dermatite atópica, está relacionada com os seus efeitos vasoconstritores, anti-inflamatórios, imunossupressores e anti-proliferativos (WIEDERSBERG *et al.*, 2008).

Em se tratando de doenças dermatológicas, os diferentes tratamentos existentes variam quanto a via de administração, mecanismo de ação, toxicidade e eficácia. A escolha da terapia mais adequada é influenciada, entre outros, pelo grau de acometimento e localização da doença, eficácia, tempo de uso e efeitos colaterais do medicamento, acessibilidade ao tratamento, preferência e qualidade de vida do paciente (MYERS; GOTTLIED; MEASE, 2006). Neste sentido, pacientes que apresentam quadro leve de psoríase, fazem a utilização de GCTs entre eles o acetato de hidrocortisona (AHC), o valerato de betametasona (VBM) e o propionato de clobetasol (PPC), como uma alternativa ao tratamento.

Contudo, a eficácia de um ativo administrado topicamente depende, 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 medicamento tópico, dependa amplamente dos componentes da formulação, sendo de grande importância a comprovação da bioequivalência (BE) entre formulação de referência e genérica, que, em princípio, devem ter o mesmo grau de segurança e eficácia (CHANG *et al.*, 2013).

Formulações de uso tópico e ação local, candidatos a medicamento genérico nos Estados Unidos da América (EUA), só podem ser registrados como tal, se forem apresentados estudos clínicos que comprovem a bioequivalência (BE) entre estes medicamentos e seus respectivos medicamentos de referência. Já para os GCTs, a avaliação dermatofarmacodinâmica utiliza o guia *Topical dermatologic corticosteroids: in vivo bioequivalence*. Este guia é recomendado e aceito para esta finalidade (FDA, 1995; FDA, 1998; SHAH *et al.*, 1998; BRADDY *et al.*, 2014; LU *et al.*, 2016).

O FDA aprovou em 1998, um *draft* de bioequivalência tópica, baseado na dermatofarmacocinética de fármacos (DPK). No entanto, em 2002 removeu esta diretriz, em virtude de resultados contraditórios obtidos por diferentes laboratórios (FDA, 1998; FDA, 2002). Vale salientar que a avaliação por DPK é aceita na África do Sul e Japão para comprovação de bioequivalência de produtos tópicos. Nesta mesma direção, nos anos de 2012, 2013, 2016 e 2017 o FDA publicou alguns *drafts* possibilitando o uso do teste de liberação *in vitro*, juntamente com a caracterização físico - química para estabelecer a biodisponibilidade relativa/ bioequivalência de formulações tópicas como aciclovir pomada, ciclosporina emulsão oftálmica, difluprednato emulsão oftálmica, aciclovir creme e docosanol creme, desde que as formulações teste e referência se apresentassem semelhantes qualitativamente (Q1) e quantitativamente (Q2).

No que diz respeito ao Brasil, a RDC nº 37/2011, que trata da isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência, permite que a avaliação da bioequivalência do medicamento de ação local, seja substituída por testes de equivalência farmacêutica (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 com a função pretendida na forma farmacêutica (BRASIL, 2010b; BRASIL, 2011). Estes testes de equivalência farmacêutica tratam da caracterização físico-química e microbiológica da formulação e fornecem informações importantes quanto aos atributos de qualidade dos medicamentos testados (FISHER *et al.*, 2016).

Por outro lado, 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 da Farmacopeia Americana (*General Chapters 1724: Semisolid Drug Products Performance tests*) (BRASIL, 2016). Entretanto, em nenhum momento estes medicamentos registrados como genéricos realizaram o referido teste. Seja por ocasião do registro, ou pós registro.

No tratamento tópico, a penetração no estrato córneo (EC) é o passo limitante para absorção cutânea do GC, onde a quantidade de GC que alcança a célula alvo será determinada pela sua partição e taxa de transporte através do EC, sendo esse

processo grandemente influenciado pelas propriedades físico-químicas do fármaco e do veículo (CARON *et al.*, 1990; CROSS *et al.*, 2003). A eficácia clínica *in vivo* de uma formulação de GC, depende de sua biodisponibilidade no local da ação (WIEDERBERG, 2008). Diante disso, a avaliação da BD/BE entre a formulação de referência e genérico, é fundamental para garantia da eficácia clínica.

Diante disto, o objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho de métodos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* na determinação de BD/BE de GCTs genéricos do mercado brasileiro, em relação ao seu medicamento referência contendo os fármacos acetato de hidrocortisona (AHC) creme 1%, valerato de betametasona (VBM) creme 0,1% e propionato de clobetasol (PPC) creme 0,05%.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste projeto é realizar uma avaliação dermatofarmacodinâmica em humanos com o propósito de demonstrar que experimentos relacionados à atuação dos glicocorticoides tópicos na forma farmacêutica creme, são correlacionáveis com resultados *in vivo* através de análises dermatofarmacocinéticas, visando avaliar a biodisponibilidade relativa/ bioequivalência dos medicamentos genéricos frente ao medicamento de referência.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a equivalência farmacêutica das formulações de AHC, VBM e PPC (característica organolépticas, pH, densidade, viscosidade aparente e teor);
- Comparar o perfil de liberação *in vitro* do AHC, VBM e PPC utilizando membrana sintética (acetato de celulose);
- Comparar o perfil de permeação *ex vivo*, retenção cutânea e *tape-stripping* do PPC em pele animal (suína);
- Realizar estudo piloto para determinação *in vivo*, do tempo de absorção e eliminação, e determinação dos parâmetros farmacocinéticos do PPC no estrato córneo (EC);
- Realizar estudo dermatofarmacocinético (DPK) do PPC *in vivo*;
- Realizar estudo dermatofarmacodinâmico piloto do AHC e VBM, e piloto/principal do PPC *in vivo* segundo o guia para Bioequivalência de corticoides (*Topical dermatologic corticosteroids: in vivo bioequivalence*, 1995);

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CORTICOSTEROIDES

A introdução dos corticosteroides na medicina se deu em 1950, sendo indicado inicialmente para o tratamento da artrite reumatoide, e a partir disso passou a ser utilizado em diversas especialidades médicas, como a dermatologia, a endocrinologia, a oncologia e a oftalmologia (FINAMOR *et al.*, 2002).

Os corticosteroides são hormônios de natureza esteroidal produzidos nas glândulas suprarrenais e constituem duas famílias: os mineralocorticoides e os glicocorticoides (FUCHS; WANNMACHER, 1998).

Os mineralocorticoides são responsáveis pela retenção de sódio e água pelos rins e regulação do equilíbrio eletrolítico. Em seres humanos a aldosterona é o principal representante. Os glicocorticoides (GCs) influenciam em diversos processos metabólicos do organismo, entre eles, o metabolismo dos carboidratos, e o cortisol (hidrocortisona) é o principal representante dessa classe (GOODMAN; GILMAN, 2005). A regulação desses hormônios acontece pela ação do sistema renina-angiotensina, para os mineralocorticoides, tendo o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), como responsável pela regulação dos glicocorticoides (KOUNTZ; CLARK, 1997; FINAMOR *et al.*, 2002).

A forma biologicamente ativa do cortisol, pode ser convertido em sua forma inativa de cortisona pela 11 β - hidroxisteróide desidrogenase tipo 2 (11 β - HSD2), presente em tecidos alvo mineralocorticoides, por exemplo o rim. Já a reação inversa é catalisada pela enzima 11 β - hidroxisteróide desidrogenase tipo 1 (11 β - HSD1), que converte a cortisona em cortisol e é encontrada sobretudo no fígado (KADMIEL; CIDLOWSKI, 2013).

Os GCs endógenos são hormônios essenciais à vida e regulam uma variedade de processos fisiológicos envolvidos no desenvolvimento, metabolismo intermediário, homeostase, função imune, cardiovascular, reprodução e cognição (BOARDMAN *et al.*, 2014). Os GCs são os medicamentos anti-inflamatórios mais amplamente prescritos para tratar inúmeras condições inflamatórias, sendo utilizados de asma a psoríase (GERSTEIN *et al.*, 2012; OH *et al.*, 2017).

3.1.1 Glicocorticoides tópicos

Os GCTs ainda são um dos tratamentos mais populares para uma ampla variedade de distúrbios da pele, como de reações alérgicas, dermatite de contato, psoríase, vitiligo e outras doenças auto-imunes com sintomas de pele (FERNÁNDEZ-CAMPOS *et al.*, 2017).

Os efeitos dos GCTs estão relacionados a quatro mecanismos de ação principais: efeito anti-inflamatório, imunossupressor, antiproliferativo e vasoconstritor (GOODMAN; GILMAN, 2005; WILLIAMS, 2005). Onde:

1. O efeito anti-inflamatório dos corticosteroides tópicos é mediado pela inibição da liberação da fosfolipase A2, enzima necessária para a produção de prostaglandinas, leucotrienos e outros derivados do ácido araquidônico.

2. O efeito imunossupressor é mediado pela sua capacidade de suprimir significativamente a produção e a ação de fatores envolvidos no processo inflamatório.

3. O efeito antiproliferativo é mediado pela sua capacidade de interferir na síntese e mitose do DNA.

4. O efeito vasoconstritor dos corticoides tópicos é a partir da ação sobre os vasos dérmicos superficiais, por inibição de vasodilatadores naturais, incluindo anti-histamínicos, bradicininas e prostaglandinas.

3.1.2 Classificação dos glicocorticoides

A eficácia de um GCT está relacionada a sua potência farmacológica, e a sua capacidade de absorção nas células alvo dentro da epiderme viável e derme. A potência é uma função complexa das propriedades físicas e químicas do fármaco e do seu veículo (WIEDERSBERG *et al.*, 2008).

O padrão-ouro para medir a potência é o ensaio vasoconstritor (CHABASSOL; GREEN, 2012). A classificação americana inclui sete grupos de potência (Tabela 1). O formulário Britânico Nacional e o consenso Brasileiro apresentam apenas quatro grupos (Tabela 2 e 3), para o tratamento da psoríase.

As formulações de glicocorticoides no mesmo grupo de potência têm eficácia semelhante e um potencial semelhante para provocar efeitos secundários. Ou seja,

quanto maior a potência, maior a eficácia terapêutica, mas também maiores os efeitos adversos (WIEDERSBERG *et al.*, 2008).

Tabela 1 - Classificação dos glicocorticoides tópicos de acordo com sua potência pela Fundação Nacional de Psoríase dos EUA.

Classe	Fármaco	Concentração (%)	Forma farmacêutica
Superpotente	Propionato de clobetasol	0,05	Loção, spray, shampoo, creme, solução
	Diacetato de diflorasine	0,05	Pomada
	Desoximetasona	0,25	Spray
	Propionato de halobetasol	0,05	Creme, pomada
	Fluocinonide	0,1	Creme
	Flurandrenolide	0,05	Adesivo
	Betametasona aumentada	0,05	Pomada
Potente	Betametasona aumentada	0,05	Creme
	Furoato de mometasona	0,1	Pomada
	Diacetato de diflorasine	0,05	Creme, pomada
	Halcinonide	0,1	Creme, pomada
	Fluocinonide	0,05	Creme, pomada, gel
	Desoximetasona	0,05 / 0,25	Creme, pomada, gel
Força média superior	Propionato de fluticasona	0,005	Pomada
	Fluocinonide	0,05	Creme
	Valerato de betametasona	0,12	Espuma
Força média	Flurandrenolide	0,05	Pomada
	Furoato de mometasona	0,1	Creme, loção
	Triancinolona acetônida	0,1	Creme, spray
	Acetonida flocinolone	0,025	Pomada
	Desoximetasona	0,05	Creme, pomada
	Valerato de hidrocortisona	0,2	Pomada
Força média inferior	Acetonida fluocinolone	0,01 / 0,025	Creme, shampoo
	Flurandrenolide	0,05	Creme, loção
	Propionato de fluticasona	0,05	Creme, loção
	Prednicarbate	0,1	Creme
	Desonida	0,05	Loção
	Butirato de hidrocortisona	0,1	Creme, loção, pomada, solução
	Valerato de hidrocortisona	0,2	Creme
	Probutato de hidrocortisona	0,1	Creme
Suave	Dipropionato de alclometasone	0,05	Creme, pomada
	Acetonida fluocinolone	0,01	Óleo, solução
	Desonide	0,05	Gel, espuma
Menos potente	Hidrocortisona	0,5 / 1,0 / 2,0 / 2,5	Creme, pomada, loção, spray

Fonte: Disponível em: www.psoriasis.org

Tabela 2 - Classificação dos glicocorticoides tópicos de acordo com sua potência pelo Formulário Britânico Nacional

Classe	Fármaco	Concentração (%)
Superpotente	Halcinonide	0,1
	Propionato de clobetasol	0,05
Potente	Dipropionato de betametasona	0,05
	Valerato de betametasona	0,1
	Acetonida flucinolone	0,025
	17-butilato de hidrocortisona	0,1
	Monohidrato de halometasone	0,05
	Valerato de diflucortolone	0,1
Média	Butirato de clobetasona	0,05
	Triancinolona acetona	0,02
	Acetonida fluocinolone	0,005
Baixa	Hidrocortisona	---
	Acetato de hidrocortisona	1
	Metilprednisolona	0,25
	Dipropionato de alclometasona	0,05
	Butil ester Fluocortyn	0,75
	Acetonida fluocinolone	0,0025
	Prednisolona	0,5
	Dexametasona	0,01-0,1

Fonte: Formulário Britânico Nacional, 2017.

Tabela 3 - Classificação dos glicocorticoides tópicos de acordo com sua potência pelo Consenso Brasileiro de Psoríase (2012)

Classe	Fármaco	Concentração (%)
Superpotente	Propionato de clobetasol	0,05
	Halcinonida	0,1
	Desoximetasona	---
	Valerato de diflucortolona	0,03
Potente	Dipropionato de betametasona	0,05
	Valerato de betametasona	0,1
	Triancinolona acetona	---
	Butirato de hidrocortisona	---
	Desonida	0,1

Classe	Fármaco	Concentração (%)
Média	Propionato de fluticasona	0,05
	Aceponato de metilprednisolona	0,1
	Butirato de clobetasona	---
	Desonida	0,05
	Triancinolona acetonida	0,1
Baixa	Acetato de hidrocortisona	1
	Dexametasona	0,1-0,2

Fonte: Consenso Brasileiro de Psoríase (2012)

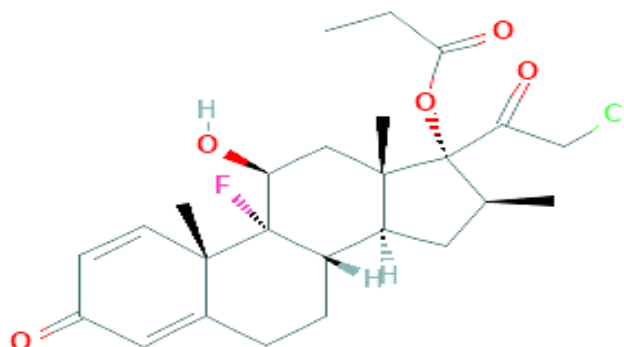
Os glicocorticoides de baixa potência são preferidos para áreas com alta penetração, incluindo axilas, virilhas, órgãos genitais e face. Eles são preferidos para lactentes, crianças e idosos devido ao aumento da susceptibilidade dessas populações aos efeitos colaterais. Em pacientes que necessitam de terapia a longo prazo e / ou aplicação em uma área grande, também são recomendados esteroides de baixa potência (CHABASSOL; GREEN, 2012).

Enquanto que os glicocorticoides tópicos de alta potência devem ser reservados para áreas com baixa penetração, incluindo palma das mãos, solas dos pés, cotovelos, joelhos. Além disso, ao usar esses agentes, recomenda-se que uma vez que o controle é obtido, o paciente deve passar a utilizar um agente de potência inferior para controle da patologia. As terapias de alta potência só devem ser usadas por curtos períodos de tempo para evitar efeitos adversos (CHABASSOL; GREEN, 2012).

3.2 PROPIONATO DE CLOBETASOL

O 17 - propionato de clobetasol (PPC) (Figura 1), de fórmula molecular $C_{25}H_{32}ClFO_5$, e peso molecular 467 g/mol, é conhecido quimicamente como [17-(2'-cloroacetil) - 9-fluoro-11-hidroxi -10,13,16-trimetil - 3-oxo - 6,7,8,11,12,14,15, 16-octahidrociclopenta[a]fenantreno-17-il] propanoato.

Figura 1 - Estrutura química do propionato de clobetasol



Fonte: PUBCHEM, 2020.

Sua estrutura apresenta ésteres e alquil-vinil cetonas como grupos funcionais. E devido a menor quantidade de grupos polares presentes na molécula, o composto é praticamente insolúvel em água, moderadamente solúvel em álcool, solúvel em acetona, clorofórmio, dimetilsulfóxido, dioxana e metanol, e levemente solúvel em benzeno e éter (ANVISA, 2012).

É uma molécula lipofílica, apresentando Log P 4,18 (PUBCHEM, 2020). O Log P é determinado pela medida da distribuição do fármaco entre a água e um solvente orgânico adequado, sendo definido como o grau de lipofilicidade de uma substância. Fármacos com características lipofílicas apresentam valores de Log P > 0, enquanto que Log P > 3 indicam fármacos muito lipofílicos (AULTON, 2005).

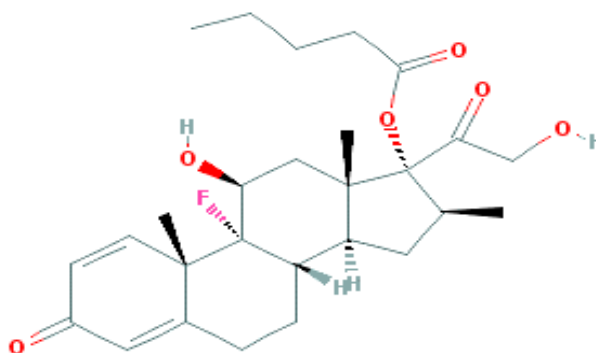
É um glicocorticoide sintético, classificado como de super potência antiinflamatória e imunossupressora, que é administrado topicamente para tratamento de processos inflamatórios como psoríase, dermatite atópica grave, lúpus eritematoso discóide (GOODMAN; GILMAN, 2005). Porém, quando utilizado por um período prolongado, pode ser absorvido através da pele para o sistema circulatório, causando afinamento da pele, atrofia celular, mudanças na cor e quantidade de cabelo, podendo levar a supressão renal, ganho de peso inexplicado, retardo no crescimento em crianças (FANG *et al.*, 1999; ANVISA, 2012).

O PPC é comercializado apenas em formulações de uso tópico, já que possui super potência, e sua absorção sistêmica está relacionada a ocorrência de efeitos adversos acentuados, como supressão adrenal e a síndrome de Cushing (SPARIDANS *et al.*, 2010; TEMPARK *et al.*, 2010).

3.3 VALERATO DE BETAMETASONA

O 17- valerato de betametasona (VBM) (Figura 2), de fórmula molecular $C_{27}H_{37}FO_6$ e peso molecular de 476,58 g/mol, é conhecido quimicamente como (8S,9R,10S,11S,13S,14S,16S,17R) - 9-fluoro - 11 - hydroxy - 17 - (2 hydroxyacetyl) 10,13,16 - trimethyl - 3 - oxo - 6, 7, 8, 11, 12, 14, 15, 16, 17- dodecahydro - 3H cyclopenta [a] phenanthren - 17 - yl pentanoate (PUBCHEM, 2020).

Figura 2 - Estrutura química do valerato de betametasona



Fonte: PUBCHEM, 2020.

É um pó branco, inodoro, com ponto de fusão de 183 - 184 °C, praticamente insolúvel em água (20°C), solúvel em etanol (1:14), clorofórmio (1:2) e acetona (ACOFARMA, 2000).

Possui log P de 3,6 (PUBCHEM, 2020), característica de um fármaco muito lipofílico.

O 17 - valerato de betametasona é instável e na presença de ácido ou base pode sofrer um rearranjo para o seu isômero 21 - valerato de betametasona, que por sua vez é menos ativo (GARDI *et al.*, 1963; VITALI; GARDI, 1972; YIP; LI, 1979; ANDERSON; TAPHOUSE, 1981; BUNDGAARD; HANSEN, 1981; YIP; LI, 1983; ANDERSEN; BUDGAARD, 1984).

É um potente corticoide disponível para administração oral, parenteral, injeção local, por inalação ou aplicado topicamente na forma de creme, unguento, loção ou gel 0,1% (p / p) (PARKER; PARKER, 2004; SOLON *et al.*, 2016). As formulações dermatológicas contendo VBM são amplamente utilizadas para o tratamento de uma variedade de condições da pele, como a inflamação (SMITH *et al.*, 1985; PARKER;

PARKER, 2004; SOLON *et al.*, 2016). Sendo conhecido por sua eficácia, bem como segurança no tratamento de pacientes com psoríase vulgar (CHRISTIANSEN *et al.*, 1985; SVENSSON *et al.*, 1992).

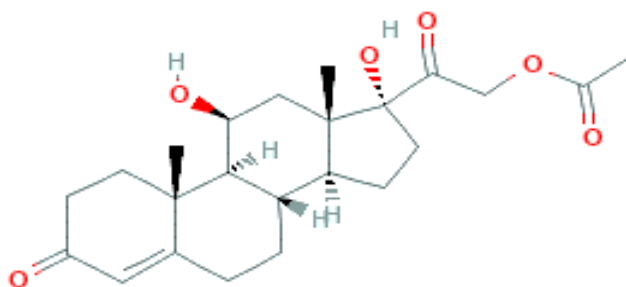
Sua alta atividade terapêutica está estritamente correlacionada com a introdução de uma ligação dupla adicional nas posições 1 - 2 (corticosteroides Δ^1) no anel A em relação aos compostos parentais (cortisona e hidrocortisona). Além disso, a presença de 9 α - flúor aumenta a potência anti-inflamatória, mas também aumenta acentuadamente a atividade mineralocorticoide, que é um efeito indesejável durante a administração sistêmica. No entanto, a introdução do grupo 17 α - hidroxí pode atenuar a atividade mineralocorticoide (MIOLO *et al.*, 2009).

Para melhorar as propriedades farmacocinéticas para uso tópico são utilizados ésteres de betametasona, como o 17 - valerato de betametasona, que melhora o transporte da betametasona através da pele. Para formulações sistêmicas, são utilizados outros ésteres e sais, como o 21 - fosfato dissódico, que permite preparar soluções aquosas para injeção (MIOLO *et al.*, 2009).

3.4 ACETATO DE HIDROCORTISONA

O acetato de hidrocortisona (AHC) (Figura 3) é um corticoide designado quimicamente como [2 - [(8S, 9S, 10R, 11S, 13S, 14S, 17R) -11,17-di-hidroxi-10,13-dimetil-3-oxo-2,6,7,8,9,11,12,14,15,16-deca-hidro-1H-ciclopenta [a] fenantren-17-il] - 2-oxoetil] acetato, sua fórmula molecular é $C_{23}H_{32}O_6$, e peso molecular de 404,50 g/mol (PUBCHEM, 2020).

Figura 3 - Estrutura química do acetato de hidrocortisona



Fonte: PUBCHEM, 2020.

É um pó cristalino branco a quase branco, inodoro, com ponto de fusão de 220°C, praticamente insolúvel em água (20°C), pouco solúvel em etanol e clorofórmio, solúvel em dimetilformamida (ACOFARMA, 2000).

Possui um coeficiente de partição (Log P) de 2,2 (PUBCHEM, 2020). Compostos com Log P na faixa de 1 - 2,5 possuem características favoráveis a permeação na pele (YANO; NODA, 1986) e apesar do AHC ter log P dentro da faixa citada anteriormente, ele possui um fluxo muito baixo, o que pode ser atribuído a sua baixa solubilidade (RAGHAVAN *et al.*, 2000; RAGHAVAN *et al.*, 2001).

O AHC é um corticoide não fluorado de potência baixa, que possui propriedade anti-inflamatória, antiprurítica e vasoconstritora. Cogita-se que a absorção do AHC quando administrado topicamente, é de 1-5% da dose administrada, podendo sua absorção ser maior em áreas como rosto, virilha, axila ou pele ferida ou inflamada, como lesões de dermatite atópica (HÁJKOVÁ *et al.*, 2003).

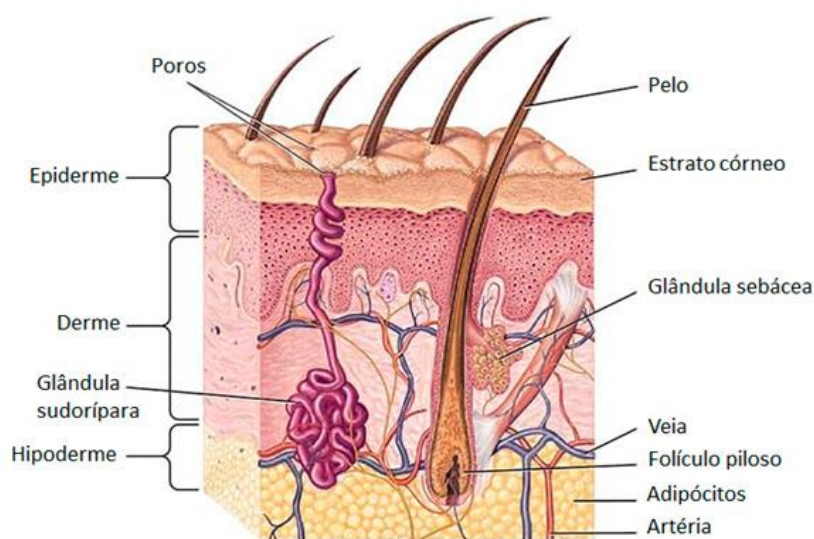
O AHC, assim como todo corticoide, difunde-se através das membranas celulares e forma complexos com receptores citoplasmáticos específicos. Estes complexos entram no núcleo celular, ligam-se em regiões específicas do DNA conhecidas como promotores de genes responsivos a corticoides e estimulam a transcrição do RNA-mensageiro, e subsequente síntese proteica de várias enzimas inibitórias responsáveis pelos efeitos anti-inflamatórios dessa classe terapêutica (ADCOCK *et al.*, 2006; RANG *et al.*, 2007).

3.5 PELE

3.5.1 Pele humana

A pele é o maior órgão do corpo, com uma área de aproximadamente 2 m², e espessura variando de 0,5 a 4 mm. É uma barreira protetora, assegurando as relações entre o meio interior e exterior, imprescindível à existência de vida, sendo composta por três camadas: a epiderme, a derme e a hipoderme (Figura 4) (CHIEN, 1992; CHANG *et al.*, 2012).

Figura 4 - Representação da estrutura da pele



Fonte: Disponível em: <https://afh.bio.br/sistemas/tegumentar/1.php> - acessado em 29/01/2020.

A hipoderme é um tecido subcutâneo formado por gordura e músculo, e atua como um isolador de calor, na proteção mecânica do organismo às pressões e traumatismos externos, e armazenamento de energia (BECHELLI; CURBAN, 1988). É a camada responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas na qual se apoia (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1999; SHERIDAN, TOMPKINS, 1999).

A derme é a camada abaixo da epiderme, tem em média 2 mm de espessura, contém colágeno, fibras elásticas, vasos sanguíneos, nervos, além de folículos capilares e glândulas sebáceas e sudoríparas. As principais células da derme são fibroblastos, envolvidos na resposta imune e inflamatória e sobre os quais são encontrados receptores de GC (ANDERSON; CASSIDY, 1973).

Já a epiderme é avascular (a derme é a fonte de nutrientes para a epiderme), e as substâncias essenciais são transportadas apenas por difusão passiva. (ANDERSON; CASSIDY, 1973). É constituída em sua maioria por queratinócitos, mas também possui melanócitos, células de Langerhans, células de Merkel, e linfócitos, sendo os últimos encontrados apenas em casos de inflamação (WICKETT; VISSCHER, 2015). Sua principal característica é a estratificação, constituída por quatro camadas distintas: córnea, granulosa, espinhosa e basal. As diferentes camadas mostram as fases pelas quais passam as células, que, produzidas nos

estratos mais profundos, sofrem o processo de cornificação à medida que atingem os estratos mais superficiais (DANGELO & FATTINI, 2005; TOSATO, 2010).

O EC é a camada mais externa da pele, sendo constituído por células achatadas, mortas, sem núcleos, e citoplasma abundante em queratina (corneócitos), que apresentam resistência ao impacto, além de impedir a perda de água transepidermal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). A medida da perda de água transepidermal, é útil para identificar danos causados por certas substâncias químicas, injúrias físicas (como *tape stripping*), ou condições patológicas, visto que a perda de água transepidermal aumenta proporcionalmente ao nível do dano (BARONI et al., 2012).

De maneira geral, o EC atua como o passo limitante da penetração do fármaco às camadas mais internas da pele, diferente da derme, que não apresenta função significativa de barreira (AULTON, 2005; MATHUR, SATRAWALA, RAIPUT, 2010).

Para o GC, as células alvo são os queratinócitos e fibroblastos presentes na epiderme e derme viável, respectivamente, onde estão localizados os receptores de GC (PONEC; KEMPENAAR; DE KLOET, 1981; MARKS; BARLOW; FUNDER, 1982). Tendo atingido os tecidos alvo, a captação celular e o tempo de permanência do esteróide, bem como sua afinidade pelo receptor de GC, determinarão o efeito clínico (PONEC; POLANO, 1979; BAXTER, 1990; PONEC et al., 1993).

3.5.2 Pele animal

Para avaliação da quantidade de fármaco capaz de alcançar as camadas viáveis da pele, estudos de permação e retenção cutânea são empregados. Muitas vezes modelos de pele animal de vários mamíferos, roedores e répteis são utilizados como substitutos à pele humana (WALKER et al., 1983; VECCHIA; BUNGE, 2006). 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 (WESTER; MAIBACH, 1977; MEYER et al., 1978; REIFENRATH; SPENCER, 1985; MONTEIRO-RIVIERE; RIVIERE, 1996).

Por razões éticas, a realização de pesquisa utilizando pele de primatas é restrita. Diante disso, alguns estudos tem relatado que a espessura do estrato córneo (EC), e parâmetros como a difusividade e o coeficiente de permeabilidade da água através da pele do porco *in vitro* e da pele humana *in vivo* são correlacionáveis (MEYER et al., 1978; CALABRESE, 1984; MONTEIRO-RIVIERE; RIVIERE, 1996; SEKKAT et al. 2002).

A avaliação da espessura das camadas da pele suína, demonstrou que a espessura do EC está entre 21-26 μm e a epiderme viável apresenta espessura na faixa de 66-72 μm . O que é muito semelhante a da epiderme humana que mede cerca de 70 μm . A estrutura folicular da pele de porco, também se assemelha a dos seres humanos, com pelos e infundíbulo estendendo-se profundamente na derme. As alterações anatômicas vasculares e os arranjos das fibras de colágeno na derme, bem como o EC em termos de composição lipídica, são semelhantes entre o homem e o porco (CILURZO, MINGHETTI, SINICO, 2007; GODIN & TOUITOU, 2007).

3.6 BIODISPONIBILIDADE RELATIVA/BIOEQUIVALÊNCIA: TÓPICA

Biodisponibilidade (BD) é definida como a velocidade e a extensão de absorção de um princípio ativo em uma forma de dosagem, obtida a partir de sua curva concentração/tempo na circulação sistêmica ou sua excreção na urina (BRASIL, 1999b).

A Bioequivalência (BE) baseia-se na demonstração de equivalência farmacêutica entre produtos apresentados sob a mesma forma farmacêutica, contendo idêntica composição qualitativa e quantitativa de princípio (s) ativo (s), e que tenham comparável biodisponibilidade, quando estudados sob um mesmo desenho experimental (BRASIL, 1999b).

A dificuldade de encontrar novos fármacos para o tratamento das mais diversas doenças, além do alto valor destes medicamentos, gerou a necessidade de as empresas desenvolverem medicamentos genéricos. Hoje já existe um conhecimento aprofundado e regulamentado sobre o desenvolvimento de produtos genéricos orais. No entanto, a assertiva não é verdadeira quando se trata de medicamentos tópicos (FERNANDEZ-CAMPOS *et al.*, 2017; LU *et al.*, 2016).

Os principais métodos para avaliação da BD/BE tópica podem ser divididos em 2 abordagens: (a) *in vitro*, incluindo os ensaios de liberação e permeação cutânea; e (b) *in vivo*, que envolve os ensaios clínicos, a dermatofarmacodinâmica (ex: vasoconstrição), a dermatofarmacocinética (DPK) (ex: *tape-stripping*) e a microdiálise dérmica.

Internacionalmente, os métodos *in vitro* não podem ser utilizados em substituição a avaliação *in vivo* para avaliar a bioequivalência tópica, devido à falta de

fortes correlações entre esses dois modelos. Dessa maneira, os estudos clínicos e os estudos de resposta dermatofarmacodinâmica, este último utilizado apenas para corticoides, são os únicos métodos aceitos pelo FDA para avaliar BD/BE de formulações tópicas.

Embora os estudos clínicos sejam considerados como "padrão-ouro", esses estudos são relativamente insensíveis, dispendiosos, demorados e requerem um grande número de sujeitos (SHAH *et al.*, 1998; WIEDERSBERG *et al.*, 2008).

Em contrapartida, os estudos de resposta farmacodinâmica são relativamente fáceis de realizar, utilizam um número menor de participantes, os expõem a uma pequena quantidade de formulação por um curto período de tempo e são bastante reproduzíveis e amplamente aceito no contexto internacional (FDA, 1995; WIEDERSBERG *et al.*, 2008).

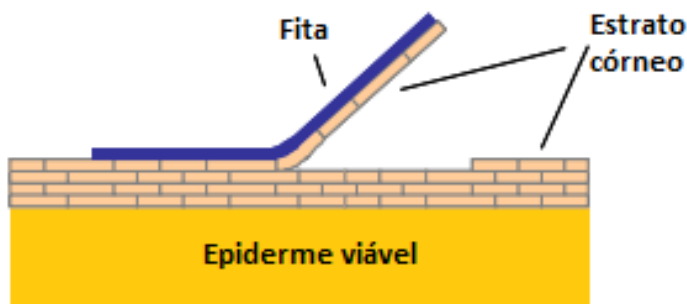
A avaliação por DPK pode ser utilizada na obtenção de informações sobre a absorção e eliminação do fármaco fazendo uma abordagem comparável a farmacocinética no sangue, plasma e urina, porém aplicada a pele (FDA, 1998). De acordo com Duarte, 2017, esta abordagem pode também ser utilizada para avaliação do medicamento tópico, após múltiplas aplicações (DUARTE, 2017). Até o momento, é aceita para fins de BE de medicamentos tópicos apenas no Japão e África do Sul (BRADDY *et al.*, 2014)

Outros métodos de avaliação de BD/BE promissores entre eles a microdiálise (SCHNETZ; FARTASH, 2001), a microperfusão de fluxo aberto (HOLMGAARD *et al.*, 2012), a espectroscopia de raman confocal (CASPER *et al.*, 2001), foram propostos para uso quando a ação do medicamento ocorre em camadas da pele mais profundas. No entanto, ainda não foram aprovados para esta finalidade.

3.7 ESTUDO DERMATOFARMACOCINÉTICO (DPK)

A abordagem dermatofarmacocinética (DPK) baseia-se na medida da quantidade de fármaco presente no EC em função do tempo após aplicação e remoção do medicamento, com o auxílio de fitas adesivas (Figura 5) (N'DRI-STEMPFER *et al.*, 2008; PERSHING *et al.*, 2003).

Figura 5 - Representação da técnica de *tape-stripping*



Fonte: Adaptado de WIEDERSBERG *et al.*, 2009.

Em 1998, o FDA lançou um *draft* para realização de bioequivalência tópica, baseada na DPK (FDA, 1998), onde os produtos teste e referência eram aplicados na pele e as camadas de EC coletadas por *tape stripping* e analisadas, visando quantificar o fármaco em função do tempo. A avaliação estatística demonstrou que a hipótese de usar o perfil cinético para testar a bioequivalência falhou, visto que foram encontrados resultados contraditórios por diferentes laboratórios, quando uma validação cruzada foi realizada usando este modelo (PERSHING *et al.*, 2003).

Após esse episódio, em 2002, o FDA removeu esta diretriz (FDA, 2002), ao mesmo tempo em que incentivou os pesquisadores a avaliarem o motivo dessa falha visando reduzir a variabilidade do referido procedimento. Neste sentido, N'Dri-Stempfer *et al.*, 2008, propuseram várias melhorias para atingir esse objetivo, entre elas, incluir as duas primeiras fitas na análise de DPK; melhorar a quantificação do fármaco; melhor remoção do excesso de formulação aplicada na pele ao final do experimento através da modificação no procedimento de limpeza; controlar o efeito de borda, visando padronizar a metodologia de amostragem; garantir que “todo” o EC foi removido ao final do procedimento de *tape stripping*. Estas mudanças no procedimento têm sido corroboradas por diversos pesquisadores no mundo, incluindo o Brasil, gerando propostas entre elas, o controle das condições ambientais durante o estudo e a remoção dos tapes mudando as direções no sentido horário (AU; SKINNER; KANFER, 2008; N'DRI-STEMPFER *et al.*, 2009; KANFER, 2010; PARFITT; SKINNER; KANFER, 2011; CORDERY *et al.*, 2017; ARAÚJO *et al.*, 2018; NALLAGUNDLA; PATNALA; KANFER, 2018; CHAGAS *et al.*, 2020, no prelo).

O descarte ou não das duas primeiras fitas adesivas é controverso. Alguns autores defendem o descarte das duas primeiras fitas considerando que o fármaco presente, mesmo após o procedimento de limpeza da pele, não será absorvido. Outros autores afirmam que, com um procedimento de limpeza bem definido, a fração do fármaco restante pode fornecer informação valiosa não devendo ser descartada, sendo particularmente importante para fármacos de baixa penetração ou lenta liberação da formulação (WIEDERSBERG; LEOPOLD; GUY, 2009; ARAÚJO *et al.*, 2018; CHAGAS *et al.*, 2020, no prelo).

Mesmo após as diversas sugestões de modificação no procedimento de DPK, sua aceitabilidade como uma alternativa aos estudos clínicos de BD/BE ainda é prejudicado devido a problemas de padronização do estudo (BOIX-MONTANES, 2011).

Na linha do tempo um outro *draft*, que foi publicado em 2018 pela agência europeia de medicamentos (EMA), com consulta pública finalizada em 30/06/2019, já traz o estudo de amostragem de EC *in vivo* (tape *stripping*) para formulações semi-sólidas, como um método cinético de permeação, visando demonstrar equivalência, em substituição aos estudos clínicos de equivalência terapêutica. Neste guia, diversas propostas de melhorias descritas anteriormente foram aplicadas, sendo recomendado também um estudo piloto para determinação dos tempos de absorção e eliminação, além da avaliação da perda de água transepidermal como método para padronizar a quantidade de fitas a serem utilizadas/ quantidade de EC coletado. Neste guia, as duas primeiras fitas devem ser avaliadas separadamente (EMA, 2018).

3.8 ESTUDO DERMATOFARMACODINÂMICO

Como dito anteriormente, o único método de substituição aos ensaios clínicos, para os corticoides tópicos, aceito pelas agências reguladoras, entre elas o FDA, é o estudo farmacodinâmico (FDA, 1995). Sua abordagem baseia-se no efeito de vasoconstrição de corticoides tópicos, capaz de produzir branqueamento da pele, no local de aplicação (Figura 6) (SINGH *et al.*, 1999). A intensidade do branqueamento da pele correlaciona-se com a potência do fármaco e pode ser mensurada visualmente ou através de um cromômetro, em diferentes tempos (HAIGH; KANFER, 1984; AU, 2008).

Figura 6 - Branqueamento cutâneo momentâneo causado por glicocorticoide.



Fonte: A autora, 2019.

O estudo dermatofarmacodinâmico é muito mais simples e envolve um menor número de participantes que o número de pacientes utilizados nos ensaios clínicos para avaliação de BD/BE. No entanto, vários aspectos negativos relacionados a esta técnica podem ser ressaltados, entre eles a alta variabilidade entre os sujeitos, o que requer um número relativamente maior de participantes, quando comparado o DPK, por exemplo. Neste ensaio, os participantes do estudo são classificados em detectores e não detectores, diminuindo assim, o número de dados para avaliação da bioequivalência. Além disso, deve ser realizado um estudo piloto, com o intuito de determinar a duração de dose que será utilizada no estudo principal (FDA, 1995; YACOBI *et al.*, 2014).

Além do branqueamento, outras respostas farmacodinâmicas, como por exemplo, o efeito de vasodilatação de AINEs tópicos causados pelo ácido nicotínico pode ser usado para avaliar a absorção de AINEs tópicos por um velocímetro de Doppler a laser (POELMAN *et al.*, 1989; CHAN; PO, 1992; LU *et al.*, 2016).

A metodologia original de branqueamento da pele, comumente referida como o teste de vasoconstrição de McKenzie - Stoughton, empregava a avaliação visual do grau de branqueamento por observadores treinados (MCKENZIE; STOUGHTON, 1962). Vários estudos realizados destacaram questões relacionadas a bioequivalência entre o medicamento (corticoide) referência e o seu genérico. As formulações genéricas de corticoides tópicos aprovadas antes de 1962, não eram obrigadas a realizar testes de bioequivalência *in vivo* para serem comercializadas, logo, quando muitas dessas formulações genéricas foram submetidas a ensaios de

vasoconstrição, demonstraram ser diferentes da sua formulação de referência (STOUGHTON, 1987; JACKSON *et al.*, 1989; OLSEN, 1991). No entanto, as desigualdades não eram todas unilaterais a favor dos medicamentos de referência.

Para eliminar a natureza altamente subjetiva desta avaliação, o guia do FDA 1995, faz a exigência que a estimativa do branqueamento relacionado a vasoconstrição causada pelo uso do corticoide tópico, seja feita utilizando o cromômetro Minolta (FDA, 1995).

Este instrumento analisa a luz de uma fonte de xenônio, incidente na superfície a ser medida, quantificando a luz refletida em três índices de cores: escala A (verde - avermelhada), escala B (amarelo - azul) e escala L (claro - escuro). Esses três valores definem um ponto único em um mapa de cores tridimensional, definindo a cor absoluta da superfície medida. O referido instrumento executa de forma precisa e reprodutível para superfícies sólidas e planares que são completamente uniformes em cores e topografia (SMITH *et al.*, 2002).

A análise dos dados utilizando a escala A, deve ser realizada em um protocolo de ensaios piloto e principal, com correções das leituras pela linha de base. Os valores da escala A mostram maior sensibilidade ao longo da progressão da resposta de branqueamento, seguidos pelos dados da escala L e da escala b, respectivamente (FDA, 1995).

Na metodologia proposta pelo guia, o estudo piloto é utilizado para determinar a duração da dose apropriada que será utilizada no estudo principal de bioequivalência *in vivo*. Os métodos de aplicação e remoção das formulações nesses estudos podem ser de aplicação escalonada com remoção sincronizada, onde o medicamento é aplicado nos sítios da pele em tempos diferentes e removido ao mesmo tempo, ou de aplicação sincronizada com remoção escalonada, onde o medicamento é aplicado sítios da pele ao mesmo tempo e removida em tempos diferentes (FDA, 1995).

A partir dos perfis de resposta versus tempo resultantes do estudo piloto, as áreas sob a curva (ASC) são calculadas e plotadas como uma função da duração da dose para obter as relações dose / resposta. A partir destes perfis, determina-se o ASC_{0-24} , E_{max} (valor máximo ajustado da ASC), e as durações de dose apropriadas ED_{50} , D_1 e D_2 para uso no estudo principal de bioequivalência.

ED₅₀ é a duração da dose necessária para atingir 50% de E_{max}. D₁ e D₂ correspondem a metade do ED₅₀ e duas vezes o ED₅₀, respectivamente. O estudo de bioequivalência principal, em seguida, compara a resposta *in vivo* do produto teste com o referencial, usando ferramentas estatísticas apropriadas para documentar se a bioequivalência foi ou não alcançada.

O objetivo do estudo principal é investigar a bioequivalência *in vivo* da formulação teste em relação a formulação de referência. A ASC para D₁ (ASC₁) e D₂ (ASC₂) são calculadas para cada participante, e os que mostram mais de 1,25 nesta relação (ASC D₂ / ASC D₁) são considerados "detectores". Os dados desses sujeitos detectores são usados para avaliação da BE. Com base nesse modelo, os medicamentos genéricos e os medicamentos de referência propostos devem atender aos critérios de aceitação da BE onde o intervalo de confiança (IC) de 90% deve estar entre 80,00% e 125,00% para a resposta farmacodinâmica observada (FDA, 1995).

3.9 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE BIOEQUIVALÊNCIA TÓPICA

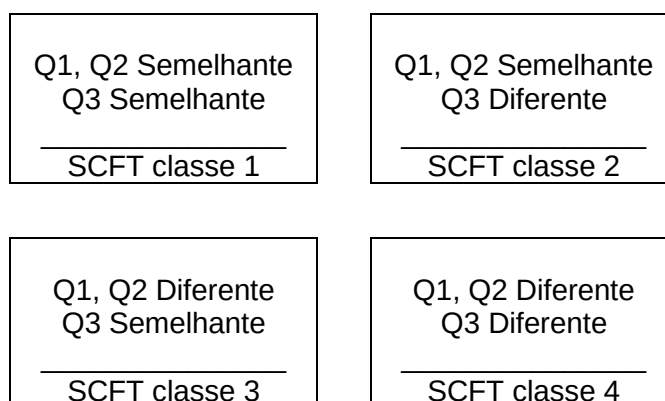
De acordo com o guia do FDA, por si só, o ensaio de liberação *in vitro* "não é um substituto para os testes de BD e BE". Porém, afirma que um fabricante pode realizar pequenas alterações no seu produto e usar o ensaio de liberação *in vitro* para demonstrar a "semelhança" entre eles. Dessa forma, é possível presumir a possibilidade de uma maior utilização para este ensaio, como parte de uma série de testes, que possam ser utilizados para estabelecer a BE de medicamentos de uso tópico (FDA, 1998). Esta avaliação é em parte facilitada, considerando que, nos EUA, os ingredientes inativos de uma formulação tópica genérica devem ser qualitativamente (Q1) e quantitativamente (Q2) semelhantes ($\pm 5\%$), em comparação com a formulação referência (SHAH; HOWARD; MAIBACH, 2014). No Canadá, Q1 deve ser essencialmente o mesmo, e Q2 podendo variar $\pm 10\%$ entre medicamento teste e referência (BRADDY *et al.*, 2014).

No ano de 2012 o FDA lançou um *draft* para o aciclovir pomada (FDA, 2012), onde possibilita o uso do teste de liberação *in vitro*, juntamente com a caracterização físico-química da forma farmacêutica, para estabelecer a bioequivalência de formulações tópicas. Contudo, as formulações teste e referência devem se apresentar Q1 e Q2 semelhantes. Vale ressaltar que até a presente data, nem este, nem outros *drafts* contendo a ciclosporina emulsão oftálmica (FDA, 2013), o aciclovir creme (FDA,

2016a), o difluprednato emulsão oftálmica (FDA, 2016b), docosanol creme (FDA, 2017), que apresentam o mesmo objetivo do *draft* anteriormente mencionado, ainda não foram publicados como um guia de oficial, a ser seguido.

No ano de 2015, Shah *et al.* propôs o desenvolvimento do Sistema de Classificação para Formulações Tópicas (SCFT) (Figura 7), baseado na composição qualitativa (Q1) e quantitativa (Q2) dos excipientes, e utiliza o teste de liberação *in vitro* como ferramenta para avaliar a microestrutura da formulação (Q3). Na comparação entre a formulação teste e referencia, esta classificação tem como objetivo reduzir requerimentos regulatórios, facilitando assim o desenvolvimento de formulações genéricas, sem perda da qualidade das formulações comercializadas (SHAH *et al.*, 2015).

Figura 7 - Sistema de Classificação de Formulações Tópicas



Fonte: Adaptado de SHAH *et al.*, 2015.

Assim, com base na composição (Q1 e Q2) e na similaridade IVRT (Q3), as formulações comparadas são classificadas como SCFT classe 1, 2, 3 e 4. De acordo com classificação proposta, apenas as formulações SCFT classe 1 e 3 são elegíveis para obtenção de bioisenção. SCFT classe 2 e 4, não são elegíveis para bioisenção e exigem estudos de BE *in vivo* para aprovação do medicamento genérico (SHAH *et al.*, 2015).

Baseado no acima exposto, a finalidade do SCFT para produtos tópicos é seguir uma abordagem semelhante ao Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) de medicamentos de uso oral, tendo como base princípios científicos desenvolvidos especificamente para produtos tópicos semissólidos. Ao contrário do SCB que se baseia nas características de solubilidade e permeabilidade do fármaco,

o SCFT proposto considera a composição qualitativa e quantitativa dos ingredientes inativos e o arranjo microestrutural. Nos dois sistemas de classificação, a sua aplicabilidade para a concessão de bioisenção depende do uso de testes *in vitro* como ferramentas de decisão fundamentais (SHAH *et al.*, 2015).

Para avaliar a microestrutura do medicamento referência e teste, muitas técnicas podem ser utilizadas, entre elas a Calorimetria Diferencial de Varredura, técnicas de microscopia ou dispersão a laser, parâmetros reológicos, estudos de visco-elasticidade, entre outros (CHEONG; HENG; WONG, 1992; PERRENO; WIDMANN, 1994; ADEYEYE *et al.*, 2002; MARÍN-QUINTERO *et al.*, 2013; FERNANDEZ-CAMPOS *et al.*, 2017).

3.10 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA X LEGISLAÇÃO INTERNACIONAL: BIOEQUIVALÊNCIA DE FORMULAÇÕES TÓPICAS

No âmbito dos aspectos regulatórios nacionais, as legislações vigentes para registro de medicamentos genéricos e similares de uso tópico e ação local não solicitam a apresentação de estudos de BE ou estudos clínicos para candidatos a genérico. Através da RDC nº 37/2011, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), trata da isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência, e permite que a avaliação da bioequivalência do medicamento tópico, seja substituída por testes de equivalência farmacêutica (EF), descritos na RDC nº 31/2010, desde que o medicamento teste apresente a mesma concentração do fármaco em relação ao medicamento de referência e excipientes de mesma função, em concentrações compatíveis com a função pretendida na forma farmacêutica (BRASIL, 2010b; BRASIL, 2011).

Os testes de equivalência farmacêutica citados anteriormente, englobam a caracterização físico-química e microbiológica da formulação, fornecendo informações importantes relacionadas aos atributos de qualidade dos medicamentos testados (FISHER *et al.*, 2016). Estes testes avaliam basicamente o aspecto, identificação, teor, peso médio, pH, viscosidade e densidade, de tal maneira que a liberação e/ ou a permeação do fármaco a partir da formulação não são avaliadas no momento do registro (SOARES *et al.*, 2015).

Considerando que os medicamentos tópicos genéricos disponíveis no mercado brasileiro, em sua maioria, diferem da formulação referência na composição qualitativa e quantitativa de seus excipientes (fato este permitido pela legislação brasileira) e, adicionalmente, de acordo com a RDC 37/2011 essas formulações são bioisentas do estudo de bioequivalência, uma grande dúvida acaba sendo gerada sobre a eficácia dessas formulações (SOARES *et al*, 2015).

Em dezembro de 2018 a ANVISA publicou o guia nº 20/2019, versão 1, que trata dos requisitos de qualidade para o registro de medicamentos tópicos e transdérmicos inovadores, genéricos e similares, descrevendo, de forma detalhada, os critérios de qualidade aplicáveis ao registro destes produtos. Este guia cita que é desejável que os produtos genéricos e similares “reflitam proximidade” Q1, Q2 e Q3 com o medicamento de referência, visto que estes parâmetros se correlacionam com a eficácia clínica do medicamento. Além disso, cita também a importância da análise da liberação *in vitro* durante o desenvolvimento da formulação, e para comparação de desempenho entre referência e genérico, utilizada para fins de registro de medicamento genérico (ANVISA, 2019a).

Somado a isto, recentemente foi publicada a consulta pública (CP) nº 760, de 19 de Dezembro de 2019, sobre critérios para a condução de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência, onde um dos principais pontos abordados relacionados a medicamentos tópicos trata dos requerimentos para condução de estudos farmacodinâmicos para corticoides (ANVISA, 2019b).

No que concerne à legislação internacional, em 2012 o projeto *International Generic Drug Regulators Pilot* (IGDRP) foi lançado com o objetivo de promover a colaboração da harmonização global da regulamentação internacional de medicamentos genéricos. Atualmente, os países participantes incluem Brasil, Canadá, Agência Europeia de Medicamentos (AEM), Estados Unidos da América (EUA), Organização Mundial da Saúde (OMS), e mais 12 países (BRADDY *et al.*, 2014).

Neste contexto, em relação aos medicamentos tópicos, atualmente o Japão e a África do Sul são os únicos países que aceitam estudo de DPK *in vivo* para avaliação da BE. Já os EUA, Austrália, Canadá, EMA, Nova Zelândia, China, África do Sul, Japão, OMS, tem adotado o estudo farmacodinâmico para avaliação de formulações

de corticoides tópicos (BRADDY *et al.*, 2014), e ao que tudo indica, será adotado também pelo Brasil.

Na tabela 4, obtida de Soares *et al.*, 2015, é possível encontrar os estudos exigidos para registro de medicamentos tópicos genéricos pelas agências reguladoras do Brasil, EUA, Canadá, Europa e Austrália.

Tabela 4 - Ensaios necessários para registro de medicamentos tópicos genéricos pelas agências reguladoras do Brasil, EUA, Canadá, Europa e Austrália.

Agência	Resolução/ Ano	Estudos <i>in vitro</i> exigidos para o registro	Estudos <i>in vivo</i> exigidos para o registro	Estudos exigidos no pós registro
Anvisa (Brasil)	RDC 37/2011	Ensaios físico-químicos e microbiológicos	Nenhum	Ensaios físico-químicos, microbiológicos e estudo de permeação (ainda sem regulamentação específica)
FDA (EUA)	CDER/1998	Ensaios físico-químicos	Estudo farmacodinâmico ou estudo clínico	Ensaios físico-químicos, ensaio de liberação (para alterações de nível 2), estudo clínico (para alteração de nível 3)
Health Canada (Canadá)	HC/1990	Ensaios físico-químicos e de liberação	Estudo farmacodinâmico ou estudo clínico	Ensaios físico-químicos, ensaio de liberação, estudo farmacodinâmico ou estudo clínico
EMA (Europa)	CPMP/1995	Ensaios físico-químicos	Estudo farmacodinâmico ou estudo clínico	Estudo farmacodinâmico ou estudo clínico
TGA (Austrália)	CPMP/1995	Ensaios físico-químicos	Estudo farmacodinâmico ou estudo clínico	Estudo farmacodinâmico ou estudo clínico

Fonte: Soares *et al.*, 2015.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 INSUMOS E FORMULAÇÕES

4.1.1 Insumos

O AHC, VBM e PPC utilizados foram padrões analíticos USP lotes HA14518, BV151203 e SLBM1905V, respectivamente. O dipropionato de beclometasona (DB) USP, lote: LRAA5289, foi utilizado como padrão interno. Todos os solventes e reagentes utilizados nas análises foram de grau analítico e as vidrarias previamente calibradas.

4.1.2 Formulações

Foram utilizados no estudo o medicamento de referência do AHC (Berlison® creme) e dois genéricos identificados neste estudo como A e B, o medicamento de referência do VBM (Betnovate® creme) e dois genéricos identificados como C e D, e o medicamento de referência do PPC (Psorex® creme) e dois genéricos, identificados como E e F. Todos adquiridos no mercado brasileiro.

4.2 EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA

Os ensaios de EF foram realizados de acordo com a RDC nº 31/2010 e a Farmacopeia Americana (BRASIL, 2010b; USP 40, 2017), uma vez que não constam monografias na Farmacopeia Brasileira para nenhum dos fármacos/ formulações utilizadas no estudo. Para cada formulação foram realizadas a avaliação das características organolépticas, determinação do pH, densidade, viscosidade e teor.

4.2.1 Avaliação das características organolépticas

Como características organolépticas foram avaliados o aspecto, o odor e a cor de cada produto.

4.2.2 Determinação do pH

O pH foi verificado utilizando pHmetro digital, modelo Hanna pH 21 previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 a uma temperatura de 25°C. As análises foram realizadas em sextuplicatas e os resultados apresentados por média $\pm$ desvio padrão (DP).

4.2.3 Densidade aparente

Foi utilizado picnômetro específico para cremes e pomadas com capacidade de no mínimo 5 mL.

4.2.4 Determinação da viscosidade aparente

A viscosidade aparente foi determinada utilizando Viscosímetro Rotacional da marca *Rheology International*® utilizando *spindle* 6 com rotação de 30 rpm. Procederam-se às análises utilizando 15 gramas de amostra a 25°C.

4.2.5 Teor

A metodologia utilizada para doseamento de AHC, VBM e PPC foi baseado na Farmacopeia Americana (USP 40, 2017), visto que não existe monografia para os respectivos fármacos na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010a).

4.2.6 Análise estatística

Todos os dados de equivalência farmacêutica foram tratados estatisticamente por ANOVA fator único (GraphPad Prism versão 5.0 Software). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$ e o nível de confiança utilizado foi de 95%.

4.3 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO/BIOANALÍTICO

4.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de ultravioleta (CLAE–UV)

Para quantificação das amostras de AHC, VBM e PPC, provenientes do estudo de liberação *in vitro*, foi realizada a validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de ultravioleta (CLAE–UV), descrito na RDC nº 166/2017. O equipamento utilizado foi um CLAE-UV (Nexera X2, Shimadzu, Japão), e os dados foram obtidos utilizando o software LC Solution® versão 1.25. A tabela 5 apresenta as condições cromatográficas utilizadas.

Tabela 5 – Condições cromatográficas para detecção do AHC, VBM, PPC por CLAE – UV.

	AHC	VBM	PPC
Comprimento de onda	250 nm	250 nm	240 nm
Coluna	C18 – 125 x 4,6mm – fase reversa	C18 – 125 x 4,6mm – fase reversa	C18 – 125 x 4,6mm – fase reversa
Fase móvel	Água: Metanol (40:60)	Água: Metanol (25:75)	Água: Acetonitrila (30:70)
Temperatura do forno	22°C	22°C	22°C
Fluxo	1 mL/min.	1 mL/min.	1 mL/min.
Injeção	20 µL	20 µL	20 µL
Tempo de corrida	7 min.	7 min.	7min

Fonte: Resultado da pesquisa

A metodologia de CLAE/UV foi validada segundo RE nº 166/17 da ANVISA (ANVISA, 2017), seguindo os parâmetros de seletividade/especificidade, linearidade, exatidão, precisão, repetibilidade e robustez. A linearidade do método foi verificada nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 2,0 e 5,0 µg/mL para o AHC e PPC, e nas concentrações de 0,02; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5 e 0,7 µg/mL para o VBM, a partir de uma solução inicial de 100 µg/mL.

4.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de massas (LC-MS/MS)

O método de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS) foi validado para quantificação das amostras contendo PPC oriundas 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 (ANVISA, 2012).

4.3.2.1 Condições cromatográficas

O sistema CLAE (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) consistiu em autoinjeter (SIL30AC), bomba binária (LC-30 AD), degaseficador (DGU-20A3) e forno (CTO-20A). O espectrômetro de massas utilizado foi AB Sciex-3200 triplo quadrupolo (MDS-SCIEX, Toronto, Canadá). A ionização dos compostos foi realizada à pressão atmosférica por eletrospray em modo positivo, e a transição de massas pelo monitoramento de reações múltiplas (MRM) para detecção do PPC e PI foi m/z 467,13 - 355,20 e 521,20 - 319,30, respectivamente. O software utilizado para aquisição e processamento dos dados foi Analyst 1.4.1 (SCIEX).

A fase móvel foi água: metanol, ambos com 0,1% de ácido fórmico (30:70) v/v, em modo isocrático no fluxo de 1,0 mL/min. A fase estacionária foi coluna cromatográfica ACE C18 125 × 4,6 mm, 5 μ m (ACE, Aberdeen, Scotland, UK) com pré-coluna Gemini C18 2 × 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA). O volume de injeção foi de 10 μ L, e o forno foi mantido à temperatura de 40°C.

4.3.2.2 Validação do método

A validação do método foi realizada em conformidade com os requisitos da RDC n.º 27/2012, sendo realizado teste de seletividade/especificidade, linearidade (10 a 500 ng/mL), exatidão, precisão, efeito matriz, estabilidade das amostras e recuperação.

4.3.2.3 Efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado utilizando o método de infusão pós-coluna, onde a infusão de uma solução de PPC (100 ng/mL) foi realizada após a coluna cromatográfica e antes da fonte de ionização, na matriz extraída (fita, epiderme/derme), e a resposta do analito infundido foi registrada. Esse método permite verificar a influência da matriz na resposta do analito.

4.3.2.4 Estabilidade das amostras

O tempo entre o procedimento de tape-stripping, e posterior extração das amostras, pode ter uma duração de até 3 dias. Diante disso, a estabilidade do fármaco nas fitas foi avaliada após 24, 48 e 72 horas. Sendo assim, fitas foram contaminadas em triplicata nas concentrações referentes ao CQB (15 ng/mL) e ao CQA (240 ng/mL), extraídas e analisadas após cada intervalo de tempo mencionado.

Em relação à fase de extração do estudo, e posterior quantificação das amostras, o procedimento também pode ser realizado em um período máximo de 3 dias. Considerando possíveis problemas, a estabilidade do fármaco na solução extraída (estabilidade pós-extração) foi avaliada após 24, 48 e 72 horas. Para avaliar a estabilidade das amostras armazenadas após a extração, fitas foram contaminadas em triplicata nas concentrações referentes ao CQB (15 ng/mL) e ao CQA (240 ng/mL), sendo analisadas após a extração decorrido cada período de tempo mencionado.

4.3.2.5 Recuperação

A recuperação do PPC foi avaliada através da contaminação das fitas contendo EC humano, EC suíno e da pele de porco com concentrações conhecidas (CQB= 15 ng/mL; CQM = 100ng/mL; CQA= 240 ng/mL) de PPC em triplicata. As fitas foram colocadas em tubos tipo eppendorfs (Axygen®) e deixadas em contato com as soluções até completa evaporação do solvente. Em seguida foi adicionado 975µL de metanol e 25 µL de PI, sendo os tubos mantidos sob agitação por 20 minutos a 22°C. Por fim, as soluções foram filtradas em filtros de 0,45µm (Millex © -HV-PVDF) e quantificadas através do método desenvolvido.

4.3.3 Análise dos dados

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

4.4 ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DO AHC, VBM E PPC

4.4.1 Seleção do meio receptor

A seleção do líquido receptor foi realizada a partir da análise da solubilidade do AHC, VBM e PPC em três diferentes meios. Para isso foi adicionado 100 mg (excesso de fármaco) a 5 mL de diferentes meios receptores: tampão fosfato pH 7.4; solução hidroalcoólica (água:etanol = 50:50) e tampão fosfato pH 7.4 com polioxietileno 20-oleil éter (Brij 020®) a 0,5%. Essas dispersões foram homogeneizadas em agitação à temperatura controlada ($32 \pm 2^\circ\text{C}$), por um período de 24 horas e em seguida centrifugadas (2500g) durante 30 minutos. Foi retirada uma alíquota do sobrenadante e filtrada com filtro (Millex-HV-© PVDF), porosidade 0,45µm. As concentrações do AHC, VBM e PPC foram determinadas por CLAE-UV.

4.4.2 Cinética de liberação *in vitro*

Os testes de liberação *in vitro* foram realizados utilizando células de difusão tipo Franz automatizadas (Microette®). A área de difusão da célula foi de 1,77 cm² onde foi aplicado 220 ± 1mg de cada formulação. Foram utilizadas membranas sintéticas de ésteres de celulose (Millipore®) com porosidade de 0,45µm lote: R5PA87384, hidratada durante 12 horas em meio receptor selecionado anteriormente (tampão fosfato pH 7,4 + Brij 020® 0,5%). O compartimento receptor tem capacidade de 6,5 ± 0,2mL, e o meio receptor foi mantido a 32 ± 1°C sob agitação constante (300 rpm).

4.4.3 Coleta e Quantificação de AHC, VBM e PPC

Foram coletados volumes de 1 mL da solução receptora nos seguintes tempos 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 e 12 horas. O meio receptor foi automaticamente repostado para manutenção da condição *sink* do sistema. As amostras foram quantificadas através de CLAE-UV.

4.4.4 Análise da cinética de liberação *in vitro*

Para análise da cinética de liberação do AHC, VBM e PPC, os resultados foram agrupados em gráficos de dispersão xy, característicos de três modelos de cinética:

- Ordem zero: quantidade liberada por área (µg/cm²) *versus* tempo (h);
- Primeira ordem: log da quantidade liberada por área (µg/cm²) *versus* tempo (h).
- Higuchi: quantidade liberada por área (µg/cm²) *versus* raiz quadrada do tempo (h).

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

4.4.5 Análise comparativa das taxas de liberação

As taxas de liberação *in vitro* entre as formulações foi realizada segundo o Guia SUPAC-SS 1724, onde o intervalo de confiança para o produto teste ser equivalente ao referência é de 75-133,33% (FDA, 1997; USP, 2014).

4.5 ESTUDO DERMATOFARMACODINÂMICO

A avaliação dermatofarmacodinâmica foi realizada seguindo guia *Topical Dermatologic Corticosteroids: In vivo Bioequivalence* (FDA, 1995).

O estudo (monocêntrico, randomizado, aberto, prospectivo) foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco/Brasil, sob o registro – CAAE Nº nº 41223414.8.0000.5208. Todos os voluntários que participaram do estudo leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declarando estarem de acordo em participar da pesquisa proposta, bem como cientes dos procedimentos, seus riscos e benefícios.

4.5.1 Estudo Piloto

O estudo piloto foi realizado utilizando o medicamento referência de cada fármaco visando determinar o tempo apropriado de exposição do ativo na pele. A partir do resultado deste teste, foram determinados os parâmetros ED₅₀, D₁ (0,5* ED₅₀) e D₂ (2* ED₅₀) a serem utilizados no estudo principal (FDA,1995).

Participaram do estudo um total de 12 voluntários sadios para cada fármaco estudado (7 mulheres e 5 homens), com idade entre 21-36 anos, que apresentaram adequada reação de vasoconstrição a corticoides tópicos e disponibilidade para seguir as restrições do estudo.

Os critérios de exclusão foram (FDA, 1995):

1. Hipertensão clinicamente significativa ou patologia circulatória;
2. Indivíduos fumando pelo menos 1 semana antes do estudo;
3. Ingestão de cafeína maior que 500 mg por dia antes ou durante o estudo;
4. História de alcoolismo clinicamente significativa ou uso de drogas;
5. Uso de medicamentos dermatológicos nos antebraços ventrais, incluindo dose anterior de corticoides tópicos em estudo de farmacodinâmica em local específico da pele, um mês antes do estudo;
6. Reações adversas a corticoides tópicos ou sistêmicos;

7. Alguma condição médica anterior ou atual, incluindo dermatite ativa ou alguma outra condição dermatológica, que possa afetar significativamente a resposta farmacodinâmica ao fármaco administrado;
8. Pessoas que necessitem depilar os antebraços ventrais para assegurar uma dose consistente na superfície da pele;
9. Uso de alguma medicação vasoativa (constritor ou dilatador), que possa modular o fluxo sanguíneo. Exemplos destes fármacos: nitroglicerina, anti-hipertensivos, anti-histamínicos, AINEs, aspirina, fenilpropanolamina, fentolamina;
10. Alguma diferença óbvia na coloração dos antebraços.

As restrições durante a realização do estudo foram:

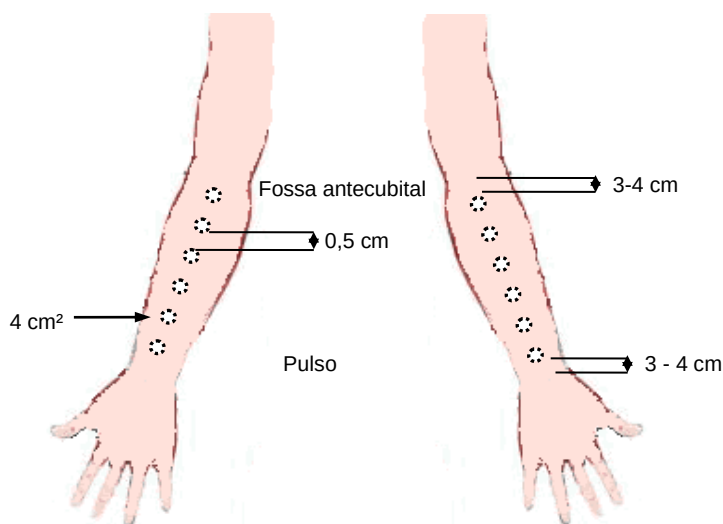
1. Não realizar exercícios com nenhum dos braços, e nenhum exercício extenuante em geral;
2. Não tomar banho durante os períodos de aplicação da formulação e avaliação do branqueamento da pele;
3. Não utilizar cremes, emolientes, ou produtos similares 24 horas e durante a realização do estudo.

4.5.1.1 Demarcação dos locais de tratamento

O tamanho dos sítios do ensaio foi escolhido para fornecer área suficiente para a avaliação da vasoconstrição (4cm²). Todos os locais foram na porção ventral dos antebraços, de maneira que os locais de aplicação das formulações estivessem distantes pelo menos 3 - 4 cm do pulso e da fossa cubital (Figura 8), e a distância entre cada local foi de 0,5 cm.

As formulações foram aplicadas em 8 sítios, sendo 4 em cada antebraço. Dois sítios a mais em cada antebraço foram reservados para o controle negativo. Esses sítios de controle não tratados em cada braço, são utilizados para permitir a correção dos sítios da pele com fármaco ativo para alterações de cor durante o estudo não relacionado com a exposição ao fármaco.

Figura 8 - Diagrama esquemático mostrando os sítios de aplicação das formulações demarcadas na região ventral de cada antebraço.



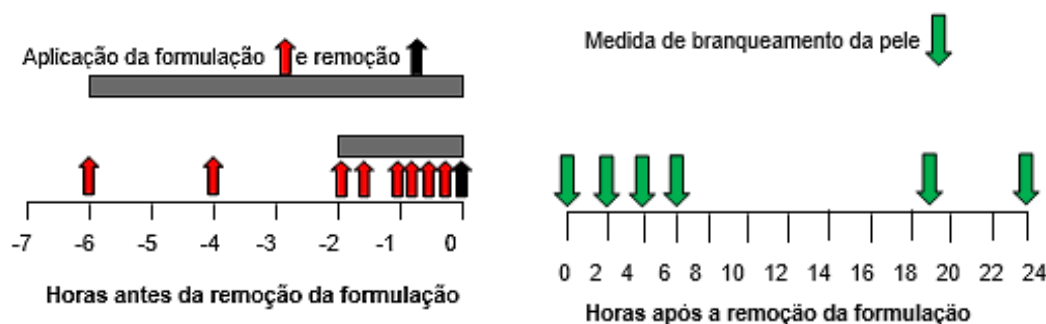
Fonte: A autora, 2019.

4.5.1.2 Aplicação randomizada, remoção da formulação e avaliação do branqueamento

Nesta fase, o estudo foi baseado apenas no produto referência, com randomização dos locais da pele (FDA, 1995). Foram utilizados o Berlison® creme, Betnovate® creme, e Psorex® creme, medicamentos referência do AHC, VBM e PCC, respectivamente.

O método utilizado foi o de aplicação escalonada com remoção sincronizada (Figura 9), onde o medicamento foi aplicado em cada sítio em tempos diferentes e removidos ao mesmo tempo. No mais, não houve oclusão dos sítios e as formulações foram aplicadas com auxílio de luva, do tipo látex (20 mg) e removidas após uma duração de dose de 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 4,0 e 6,0 h. A pele foi limpa suavemente por 3 vezes, utilizando algodão seco da marca cremer®.

Figura 9 - Representação esquemática da aplicação sequenciada com remoção sincronizada.



Fonte: WIEDERSBERG *et al.*, 2009.

O branqueamento da pele foi avaliado em cada sítio usando o chromameter (CR 700-d, Minolta, Germany) 0,5 horas antes da aplicação da formulação, e nos tempos de 0, 2, 4, 6, 19 e 24hs após a remoção da formulação. Os sítios não tratados (brancos) também foram avaliados da mesma forma, considerando o tempo antes da aplicação, e todos os demais tempos de análise. A calibração do instrumento foi realizada utilizando a tampa de calibração, fornecida juntamente com o equipamento.

4.5.1.3 Análise dos dados

Inicialmente foi realizado um ajuste dos dados brutos obtidos com a resposta de branqueamento da pele dos sítios tratados e não tratados, através da subtração do valor da linha de base medido no mesmo local.

Em seguida, cada sítio tratado já corrigido, foi ajustado mediante a subtração da média dos dois sítios não tratados (brancos) localizados no mesmo antebraço.

Utilizando a regra trapezoidal foi calculada a área sob a curva de resposta (ASC_{0-24h}) para cada sítio de aplicação. Utilizando um software de modelagem de efeito misto não linear (modelo populacional), foi determinado o $E_{máx}$, ED_{50} (duração de dose correspondente a metade da resposta máxima). A partir do ED_{50} foram determinados D_1 (menor duração de dose) e D_2 (maior duração de dose), que correspondem a metade e cerca de 2 vezes a ED_{50} , respectivamente, os quais foram utilizados no delineamento do estudo principal.

4.5.2 Estudo Principal (Bioequivalência)

O ED₅₀ obtido no estudo piloto foi utilizado para calcular os valores de D₁ e D₂, obtendo com isso, todas as durações de dose para o delineamento do estudo principal que foi realizado apenas com as formulações contendo PPC.

4.5.2.1 Demarcação dos locais de tratamento e aplicação das formulações

O tamanho dos sítios do ensaio foi o mesmo utilizado no estudo piloto (4cm²), sendo todos na porção ventral dos antebraços, mantendo as mesmas distancias descritas no estudo piloto.

As três formulações (referência, genérico E e F) foram aplicadas em 12 locais, sendo 6 em cada antebraço. Dois outros locais em cada antebraço foram reservados para o controle negativo (área não tratada).

4.5.2.2 Aplicação randomizada, remoção da formulação e avaliação do branqueamento

Assim como no estudo piloto, o método escolhido foi o de aplicação escalonada com remoção sincronizada. As formulações foram aplicadas com auxílio de luva, do tipo látex (20 mg) e removidas após a duração de dose de 10 minutos. A pele foi limpa suavemente 3 vezes, utilizando algodão seco da marca cremer®.

Participaram do estudo um total de 80 voluntários sadios, que apresentaram disponibilidade para seguir as restrições do estudo. Os critérios de exclusão, e restrições, foram os mesmos utilizados no estudo piloto.

O branqueamento da pele foi avaliado usando o spectrophotometer (CM-700d, Minolta, Germany) nos tempos de 0, 2, 4, 6, 19 e 24hs após a remoção da formulação. A calibração do instrumento foi realizada utilizando a tampa de calibração, fornecida juntamente com o equipamento.

Foi utilizado o modelo proposto pelo FDA, representado na Tabela 6, para aplicação das formulações de forma randomizada.

Tabela 6 - Representação esquemática do modelo de aplicação das formulações no estudo principal.

Fossa antecubital	
Braço esquerdo	Braço direito
D ₁	D ₂
T	R
UNT	UNT
R	T
UNT	UNT
T	R
D ₂	D ₁
R	T
Pulso	

Fonte: FDA, 1997.

Onde:

T = medicamento genérico, com duração de dose corresponde ao ED₅₀.

R = medicamento referência, com duração da dose corresponde ao ED₅₀.

D₁ = medicamento referência, com duração da dose corresponde à metade do ED₅₀.

D₂ = medicamento referência, com duração da dose corresponde a duas vezes o ED₅₀.

UNT = Não tratado

4.5.2.3 Análise dos dados de Bioequivalência

Cada dado bruto de branqueamento obtido em função do tempo, foi tratado como apresentado no estudo piloto (FDA, 1995).

Apenas os dados dos participantes considerados detectores foram incluídos na avaliação estatística. Foram considerados detectores aqueles participantes que possuíram os valores de ASC negativos para D₁ e D₂ e que atendam ao critério que a relação de ASC D₂ / ASC D₁, seja maior ou igual a 1,25.

A análise estatística requer o uso de dados não transformados, pois os valores ASC dos tratamentos T e R, calculados a partir de dados ajustados pela linha de base e corrigidos pelos sítios de controle não tratados, embora sejam geralmente negativos, às vezes podem ser positivos. A presença de dados positivos e negativos elimina o uso de transformações estatísticas convencionais.

O método utilizado foi o de Locke, que fornece um intervalo de confiança exato a partir de dados não transformados (FDA, 1995). O intervalo de confiança de 90% foi calculado em razão da média da ASC da formulação genérica e referência na dose de ED₅₀, a partir do método de Locke. Onde o intervalo de confiança (IC) de 90% na relação genérico: referência deve estar, entre 80 – 125%.

4.6 ESTUDO DERMATOFARMACOCINÉTICO (DPK) *IN VIVO*

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). Ambos os estudos piloto e principal foram realizados em local iluminado por lâmpadas fluorescentes. A temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e a umidade ($55 \pm 3\%$) foram controladas durante todo o período.

4.6.1 Design do estudo

Para selecionar os tempos de absorção e eliminação mais apropriados, foi realizado um estudo piloto para medir a concentração de fármaco no EC após uma série de diferentes tempos de absorção (2,5; 5; 7,5; 10 e 20 minutos) com posterior remoção e realização do *tape-stripping*, e uma série de tempos de eliminação (4, 6, 19, 24 e 28 horas) pós-remoção da formulação Psorex®, que manteve para todos os tempos 10 minutos de contato, e *tape-stripping* nos tempos informados anteriormente. Esse estudo foi realizado com 6 participantes de pesquisa.

A avaliação da bioequivalência (estudo principal) foi realizada utilizando 14 participantes de pesquisa para avaliação de 3 formulações, concomitantemente. Para tanto, o design do estudo foi baseado na publicação de N'Dri-Stempfer *et al.*, 2008, com a aplicação de cada formulação em duplicata, nos tempos de absorção e

eliminação. A seleção do tempo de contato da formulação (tempo de absorção) e do tempo para a avaliação da eliminação foi baseado nos resultados do estudo piloto. Os antebraços foram previamente higienizados, e após 1 hora, as formulações foram aplicadas em 12 locais de tratamento (três formulações por voluntário, dois locais de aplicação por antebraço e formulação) que foram randomizados, mas a mesma ordem foi mantida por antebraços de cada voluntário. Em uma área não tratada foi realizado o tape stripping, que foi utilizado como controle negativo (sem fármaco) para a análise dos dados.

Cada local de aplicação (2,54 cm²) foi demarcado com um molde anteriormente recortado em forma circular (Scotch Tape Livro, 3M, St. Paul, MN, EUA). Uma dose de 12,7 mg de cada formulação foi aplicada em cada local, utilizando luva do tipo látex. Após 10 minutos (tempo de absorção), a formulação residual foi removida de todos os locais de aplicação com o auxílio de 2 swabs contendo álcool (Biosoma®).

Imediatamente a seguir, os locais que correspondem ao tempo de absorção (braço esquerdo) foram delimitados por um outro menor molde (1,77 cm²) e realizado o procedimento de tape stripping. Nos demais locais do braço direito (que correspondem ao tempo de eliminação), o procedimento de tape stripping foi realizado 19 horas após a retirada das formulações. Em ambos os casos, 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. Quinze fitas foram utilizadas sequencialmente em cada local de aplicação para remoção do EC, e a perda de água transepidermica (TEWL) foi medida usando um Tewameter (Courage + Khazaka electronic GmbH -CK electronic) em todos os locais, para monitorar a coleta de EC. O PPC presente em cada fita foi subsequentemente extraído e analisado através método analítico descrito no item 4.3.2.

4.6.2 Tape-stripping

O perfil de concentração do PPC no EC após a aplicação foi determinado pela remoção sequencial das camadas de EC utilizando fita adesiva (Scotch Tape Livro, 3M, St. Paul, MN). Cada local de aplicação foi tratado com 15 fitas. Após o procedimento de extração o PPC foi analisado. Nenhuma das fitas foi descartada, assumindo que qualquer fármaco não removido da superfície da pele pelo processo de limpeza ao final do tratamento, estaria eventualmente biodisponível.

4.6.3 Tolerabilidade

A tolerabilidade em ambos os estudos (piloto e principal) foi avaliada registrando os eventos adversos relatados espontaneamente pelos voluntários e visualmente observadas durante o tempo do estudo.

4.6.4 Processamento das amostras

Após realização do procedimento de tape stripping, o fármaco foi extraído das fitas, que foram agrupadas da seguinte forma para extração: 1-2, 3-8, 9-15. A extração foi realizada colocando-se as fitas em frascos de 1,5 ml de borosilicato (Clear Sep Cap Vials, 12 x 32mm, National Scientific Company), adicionando 1,0 mL de metanol em cada frasco, posteriormente tampados, e em seguida, deixadas sob agitação por um período de 20 minutos a 22°C. A solução extratora foi filtrada com auxílio de filtro de seringa 0,45µm (Millex®HV-PVDF), transferida para vials, em seguida foram analisadas por LC MS/MS.

4.6.5 Análise dos dados

Um método de análise não compartimental foi utilizado para avaliar os resultados do estudo piloto (Phoenix WinNonlin Professional versão 5.0, Certara, Princeton, NJ, EUA). A partir dos perfis da quantidade de PPC no EC em função do tempo, foram determinados os seguintes parâmetros farmacocinéticos: (a) A quantidade máxima de fármaco no SC (C_{max}), foi observada diretamente a partir dos dados. (b) A constante que descreve a eliminação do PCC do EC (k_e), foi determinada a partir da inclinação da reta de regressão linear da fase de "eliminação" da quantidade de fármaco transformada versus perfil de tempo; (c) A meia-vida de eliminação correspondente foi calculada como $t_{1/2} = \ln 2 / k_e$; (d) A área sob curva da quantidade do fármaco no EC em função do tempo (ASC_{0-t}) foi calculada usando o método trapezoidal até o último valor medido (A_t) e (e) a extrapolação padrão para essa parte da medição final para $t = \infty$, ou seja, $ASC_{0-\infty} = ASC_{0-t} + A_t / k_e$.

No estudo principal, considerando que, as medidas de absorção cutânea apresentam uma distribuição lognormal, anteriormente à análise estatística, foi realizada uma transformação logarítmica de todas as grandezas, de forma a normalizar a distribuição dos dados analisados (CORNWELL *et al.*, 1995).

A média (para dados logaritmizados) dos valores da concentração do fármaco em duplicata para cada formulação foi calculada para cada participante de pesquisa,

e em seguida, a média geométrica (o anti-log da média dos valores transformados em log), e os valores inferior e superior do intervalo de confiança de 90% da média geométrica foi calculado tanto para o tempo de absorção como de eliminação.

Na avaliação da bioequivalência, as formulações testadas (genéricos E e F) foram consideradas bioequivalentes ao Psorex® (referência) no intervalo de confiança de 90% da razão das médias geométricas no tempo de absorção e eliminação, e a razão entre absorção e eliminação deve está contido no intervalo de 0,8 a 1,25 para atender a condição de bioequivalência (FDA, 2007).

A média do fluxo do PPC do EC para os tecidos subjacentes (epiderme viável) entre o tempo de absorção e eliminação ($J_{in vivo}$) foi calculado para cada formulação e para cada voluntário:

$$J_{in vivo} = (PPC_{absorção}/A - PPC_{eliminação}/A) / T$$

Onde:

J = fluxo ($ng.h^{-1}.cm^{-2}$)

A = área (cm^2)

T = tempo (h)

Além disso, assumindo uma liberação de primeira ordem do fármaco no EC, a constante de taxa associada, k, foi calculada por:

$$k = -\ln (PPC_{eliminação}/PPC_{absorção}) / T = -\ln (PPC_{eliminação}/PPC_{absorção}) / 19h$$

Onde:

k = taxa

-ln = logaritmo na base 10

Obs: K é a média da taxa constante, no período de eliminação de 19 horas. E pode, não necessariamente, apresentar o mesmo valor para períodos de eliminação maiores ou menores.

4.7 ESTUDO DE PERMEAÇÃO *EX VIVO*, RETENÇÃO CUTÂNEA E *TAPE-STRIPPING* DO PPC EM PELE ANIMAL (SUÍNA)

A pele da região dorsal do porco foi obtida em matadouro da região (Paulista, Pernambuco/Brasil), sendo removida pós sacrifício, antes que a pele fosse exposta ao processo de limpeza habitual em alta temperatura, para garantir a integridade da barreira da pele. A pele foi lavada com água, e os pelos visíveis foram cortados com tesouras. Em seguida, a pele foi dermatomizada em 750 μm (Zimmerair dermatome, Dover, Delaware), armazenadas a -20°C até o momento do uso. As peles foram retiradas do freezer para descongelar por 30 minutos, e proceder com a avaliação de integridade utilizando Tewametro (Courage + Khazaka electronic GmbH -CK electronic) antes de sua utilização nas células de Franz.

O estudo de permeação *in vitro* foi realizado em célula de Franz vertical (Vision®Microette), onde a pele suína dermatomizada foi mantida fixa com o auxílio de uma garra, sendo a área de pele exposta de 1,77 cm^2 . Uma dose única de 8,85 mg de formulação tópica foi aplicada em sextuplicata. O lado dérmico da pele foi mantido em contato com o líquido receptor constituído por tampão fosfato de sódio monobásico (20 mM) pH 7,4 + Brij 20, que foi mantido em constante agitação (300 rpm) pelo uso de uma barra magnética.

No primeiro experimento, após 10 minutos de contato (tempo de absorção), a formulação residual foi removida com o auxílio de swabs contendo álcool isopropílico Biosoma® (duas vezes) e uma amostra (1 mL) de líquido receptor foi coletada para análise do fármaco. Imediatamente após, a pele foi delimitada por um molde (1,77 cm^2) e foi realizado o procedimento de tape stripping.

No segundo experimento, após 10 minutos de contato (tempo de absorção), a formulação residual foi removida com o auxílio de swabs contendo álcool isopropílico Biosoma® (duas vezes) e uma amostra (1 mL) de líquido receptor foi coletada para análise do fármaco, e reposto o mesmo volume, que foi mantido em agitação até o final do experimento. Após 19 horas da retirada da formulação (tempo de eliminação), uma nova amostra (1 mL) de líquido receptor foi coletada para análise do fármaco e a pele foi delimitada por um molde (1,77 cm^2) e realizado o procedimento de tape stripping.

Em ambos os experimentos, 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. Um total de quinze fitas foram utilizadas para cada pele de porco. O fármaco presente em cada fita foi extraído e analisado pelo método analítico descrito no item 4.3.2.

Após o procedimento de tape *stripping*, a quantidade de PPC na epiderme e derme viável (avaliação de retenção) foi extraída por 20 minutos utilizando 1mL de metanol, e analisada pelo método analítico descrito no item 4.3.2.

O fluxo *in vitro* ($J_{in vitro}$) do PPC no EC entre 10min e 19 horas foi calculado para cada célula segundo descrito abaixo:

$$J_{in vivo} = (PPC_{absorção}/A - PPC_{eliminação}/A) / T$$

Onde:

J = fluxo ($ng.h^{-1}.cm^{-2}$)

A = área (cm^2)

T = tempo (h)

A análise estatística da média da quantidade do PPC no EC e na epiderme/derme (retenção) e fluxo para as diferentes formulações foi realizado através da ANOVA seguido de Bonferroni pós teste. Somado a isto, para cada formulação os mesmos parâmetros foram calculados usando o test T pareado.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 FORMULAÇÕES

As tabelas 7, 8 e 9 apresentam a composição qualitativa das formulações de AHC, VBM e PPC, respectivamente, utilizadas no estudo e comercializadas no Brasil, além de conter informações como lote e fabricante. Este último apenas para a formulação referência.

Tabela 7 - Composição das formulações de AHC.

Composição AHC			
Função	Berlison® Creme 10 mg/g Lote: YY0115N Fabricante: Bayer	Genérico A Creme 10 mg/g Lote: 3293028	Genérico B Creme 10 mg/g Lote: L1534176
Agente emulsificante	Álcool estearílico	Cera autoemulsionante não-iônica.	Cera emulsificante
	Estearato de Polioxila 40		Ácido esteárico
Emoliente	Petrolato líquido	Petrolato líquido	Miristato de isopropila
	Petrolato branco	Miristato de isopropila	Dimeticone
Umectante	_____	Propilenoglicol	Propilenoglicol
Tensoativo	_____	Polisorbato 80	_____
Modificador de reologia; Agente estabilizante	Carbômer	_____	_____
Agente alcalinizante	Hidróxido de sódio	Hidróxido de sódio	_____
Agente quelante	Edetato sódico	Edetato dissódico	Edetato dissódico dihidratado
Conservante	Metilparabeno	Metilparabeno	Metilparabeno
	Propilparabeno	Propilparabeno	Propilparabeno
Antioxidante	_____	Butilhidroxitolueno	Butilhidroxianisol
Agente tamponante	_____	_____	Fosfato de sódio dibásico
Agente acidificante	_____	_____	Ácido cítrico
Veículo	Água purificada	Água de osmose reversa	Água purificada

Fonte: Resultado da pesquisa.

Tabela 8 - Composição das formulações de VBM

Composição VBM			
Função	Betnovate® Creme 1 mg/g Lote: UM0078V Fabricante: GSK	Genérico C Creme 1 mg/g Lote: L16020784	Genérico D Creme 1 mg/g Lote: LB16E0242
Agente emulsificante	Álcool cetoestearílico Cetomacrogol	Álcool cetoestearílico	Polawax
Emoliente	Parafina líquida Vaselina branca	Petrolato branco	Petrolato branco
Umectante	_____	Triglicerídio do ácido cáprico - caprílico	Propilenoglicol
Tensoativo	_____	Polissorbato 60 Estearato de sorbitana	_____ _____
Agente alcalinizante	Hidróxido de sódio	_____	_____
Agente quelante	_____	_____	Edetato dissódico
Conservante	Clorocresol	Álcool benzílico	Metilparabeno Propilparabeno
Agente tamponante	Fosfato monossódico	Fosfato de sódio monobásico monohidratado	Metabissulfito de sódio
Agente acidificante	Ácido fosfórico	_____	_____
Veículo	Água purificada	Água purificada	Água purificada

Fonte: Resultado da pesquisa.

Tabela 9 - Composição das formulações de PPC

Composição PPC			
Função	Psorex® Creme 0,5 mg/g Lote: XB0171V Fabricante: GSK, GlaxoSmithKline	Genérico E Creme 0,5 mg/g Lote:383397	Genérico F Creme 0,5 mg/g Lote:LOG8543
Agente emulsificante	Monoestearato de glicerila	Álcool cetoestearílico	Cera autoemulsificante não iônica
	Monoestearato de glicerila autoemulsionável	Monoestearato de glicerila	Álcool cetoestearílico etoxilado
	Álcool cetoestearílico		
Emoliente	Cera branca de abelha	Petrolato líquido Petrolato branco	Oleato de decila
Umectante	Propilenoglicol	Propilenoglicol	Glicerol Propilenoglicol
Tensoativo	_____	Polissorbato 60	_____
Antiespumante	_____	_____	Simeticona
Agente alcalinizante	_____	_____	_____
Agente quelante	_____	_____	_____
Conservante	Clorocresol	Metilparabeno Propilparabeno	Metilparabeno Propilparabeno
			Butilparabeno Etilparabeno Fenoxietanol
Agente tamponante	Citrato de sódio di-hidratado	Citrato de sódio di-hidratado	_____
Agente acidificante	Ácido cítrico	Ácido cítrico	_____
Veículo	Água purificada	Água purificada	Água purificada

Fonte: Resultado da pesquisa

Comparando as diferentes formulações, podemos observar que as formulações genéricas de AHC, VBM e PPC apresentam diferença significativa na composição qualitativa (Q1) em relação à formulação referência. Os principais pontos de diferença que podemos citar entre as formulações de AHC estão relacionados aos agentes emulsificantes, doadores de viscosidade (agente estabilizante), umectantes e tensoativos. Nas formulações de VBM podemos citar os agentes umectantes e tensoativos. E nas formulações de PPC o agente emulsificante e emoliente.

As formulações genéricas de AHC apresentam agentes emulsificantes diferentes do que é encontrado na formulação referência, embora todos sejam classificados como emulsificantes não iônicos. Essas formulações também diferem da referência por possuir propilenoglicol, um agente umectante que pode atuar como promotor de permeação. Além disso, apenas o genérico A possui um componente tensoativo, o Polisorbato 80.

Ainda podemos observar a presença do carbômer, um agente incrementador de viscosidade, presente na formulação referência e ausente nas genéricas, fato esse que corrobora com os dados que serão apresentados mais adiante, onde a maior viscosidade aparente é obtido para a formulação de referência.

Em relação ao VBM, as formulações genéricas possuem triglicerídeo do ácido cáprico - caprílico e propilenoglicol, agentes umectantes e, como dito anteriormente, podem atuar como promotor de permeação, além de tensoativos, que não estão presentes na formulação de referência.

Outras diferenças que podemos mencionar está relacionada com agentes quelantes, acidificantes e alcalinizantes, que podem influenciar diretamente na estabilidade dos fármacos e diferem entre a presença e/ou ausência da formulação referência para as genéricas de ambos os fármacos.

Já em relação das formulações de PPC, as formulações genéricas apresentam agentes emolientes diferentes do encontrado na formulação de referência, além disso as formulações genéricas apresentam tensoativo e agente antiespumante, excipientes que não são encontrados na formulação de referência.

Por essa razão, podemos inferir que nenhuma das seis formulações genéricas estudadas é qualificada como Q1 semelhante, nomenclatura dada para as formulações qualitativamente iguais ao medicamento referência.

Para possibilitar que duas formulações sejam consideradas equivalentes terapeuticamente, é desejável que os excipientes das formulações sejam os mais similares possíveis. Sendo assim, as formulações genéricas tendem a “copiar” no mínimo, qualitativamente, uma formulação referência (CHANG, 2012).

Considerando os EUA, grande parte das formulações genéricas tópicas possuem qualitativamente (Q1) e quantitativamente (Q2) os mesmos excipientes do medicamento referência (SHAH, 2015). Entretanto, no Brasil esta semelhança não é um requerimento regulatório (BRASIL, 2011; SOARES *et al.*, 2015).

5.2 EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA

5.2.1 Avaliação das características organolépticas

Todas as formulações genéricas dos três fármacos em estudo apresentaram coloração branca, odor característico e aspecto homogêneo, semelhante ao medicamento de referência correspondente.

5.2.2 Determinação do pH, teor, viscosidade aparente e densidade

Os resultados de pH, teor, viscosidade aparente, e densidade de cada formulação analisada estão demonstrados na Tabela 10.

Tabela 10 - Resultados do pH, teor, viscosidade aparente e densidade do AHC, VBM e PPC.

Fármaco	Formulações	pH	Teor (%)	Viscosidade aparente (Pa.s)	Densidade
AHC	Referência	5,65 ± 0,03	95 ± 0,01	37,32 ± 0,42	0,99 ± 0,01
	Genérico A	5,57 ± 0,03	84 ± 0,07	16,05 ± 0,48	1,02 ± 0,003
	Genérico B	4,18 ± 0,01	94 ± 0,01	7,12 ± 0,09	0,99 ± 0,003
VBM	Referência	4,78 ± 0,01	107 ± 0,01	14,56 ± 0,18	0,99 ± 0,003
	Genérico C	3,77 ± 0,01	106 ± 0,01	15,10 ± 0,42	1,00 ± 0,003
	Genérico D	4,42 ± 0,02	107 ± 0,01	16,48 ± 0,33	1,01 ± 0,003
PPC	Referência	4,98 ± 0,10	102 ± 0,01	41,19 ± 0,5	0,99 ± 0,02
	Genérico E	6,01 ± 0,05	95 ± 0,02	36,40 ± 0,38	0,98 ± 0,01
	Genérico F	6,43 ± 0,05	99 ± 0,01	22,24 ± 0,26	1,00 ± 0,01

Fonte: A autora, 2019

O pH ideal de uma formulação é determinado de acordo com o pH de estabilidade dos componentes ativos utilizados bem como o pH de tolerância biológica para produtos cutâneos (3,0 - 9,0) (AULTON, 2005). O AHC e o VBM possuem estabilidade da faixa de pH de 3,5 - 5,5 e 4,5, respectivamente (THOMPSON, 2016;

KHATTAK, 2012). O PPC deve apresentar faixa de pH de 4,5 - 7,0 (USP 40, 2017). Portanto, os valores de pH evidenciados para as formulações avaliadas (Tabela 10), encontram-se todos, em conformidade com a faixa ideal para os fármacos e para aplicação tópica.

Com relação ao teor, as formulações contendo AHC, VBM e PPC, com exceção do genérico A de AHC, todas as outras formulações apresentaram-se dentro dos limites preconizados por suas monografias, 90 - 110% para AHC e VBM, e 90 - 115% para o PPC (USP 40, 2017).

Os dados da viscosidade aparente das formulações (Tabela 10), mostram que para as formulações de AHC, o genérico A foi o que apresentou viscosidade mais próxima ao referência, seguido do genérico B. Em relação as formulações de VBM, o genérico C foi o que apresentou a viscosidade mais próxima ao referência, seguido do genérico D. E no que diz respeito as formulações de PPC, o genérico E foi o que apresentou a viscosidade mais próxima ao referência, seguido do genérico F.

Fato comum e interessante de ressaltarmos entre as formulações, é que os genéricos que apresentaram viscosidade mais próxima ao seu referência, são os que possuem também composição qualitativa também mais próximas.

Os genéricos do AHC, VBM e PPC apresentaram diferença estatisticamente significativa na viscosidade aparente, quando comparados ao respectivo medicamento de referência.

Como mencionado anteriormente, esta diferença pode estar relacionada à presença do Carbômer, um agente incrementador de viscosidade presente apenas no medicamento de referência. Já formulações de VBM, a presença da Parafina líquida no referência, um agente emoliente, poderia justificar este resultado. Enquanto que nas formulações de PPC, podemos relacionar ao uso de diferentes emolientes e/ou agente emulsificante.

Visto que a farmacopeia não define faixa de aceitação para testes de viscosidade e densidade, apenas os resultados de pH e teor podem ser utilizados para definir a EF entre as formulações de PPC, já para as formulações de AHC e VBM, também não se tem faixa de aceitação para pH, restando apenas o teor para definição de EF.

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).

Desta forma, todas as formulações estudadas, com exceção do genérico A do AHC, atenderam as especificações da farmacopeia americana (USP 40, 2017) e são consideradas equivalentes ao produto referência de acordo com a legislação Brasileira vigente (BRASIL, 2010a).

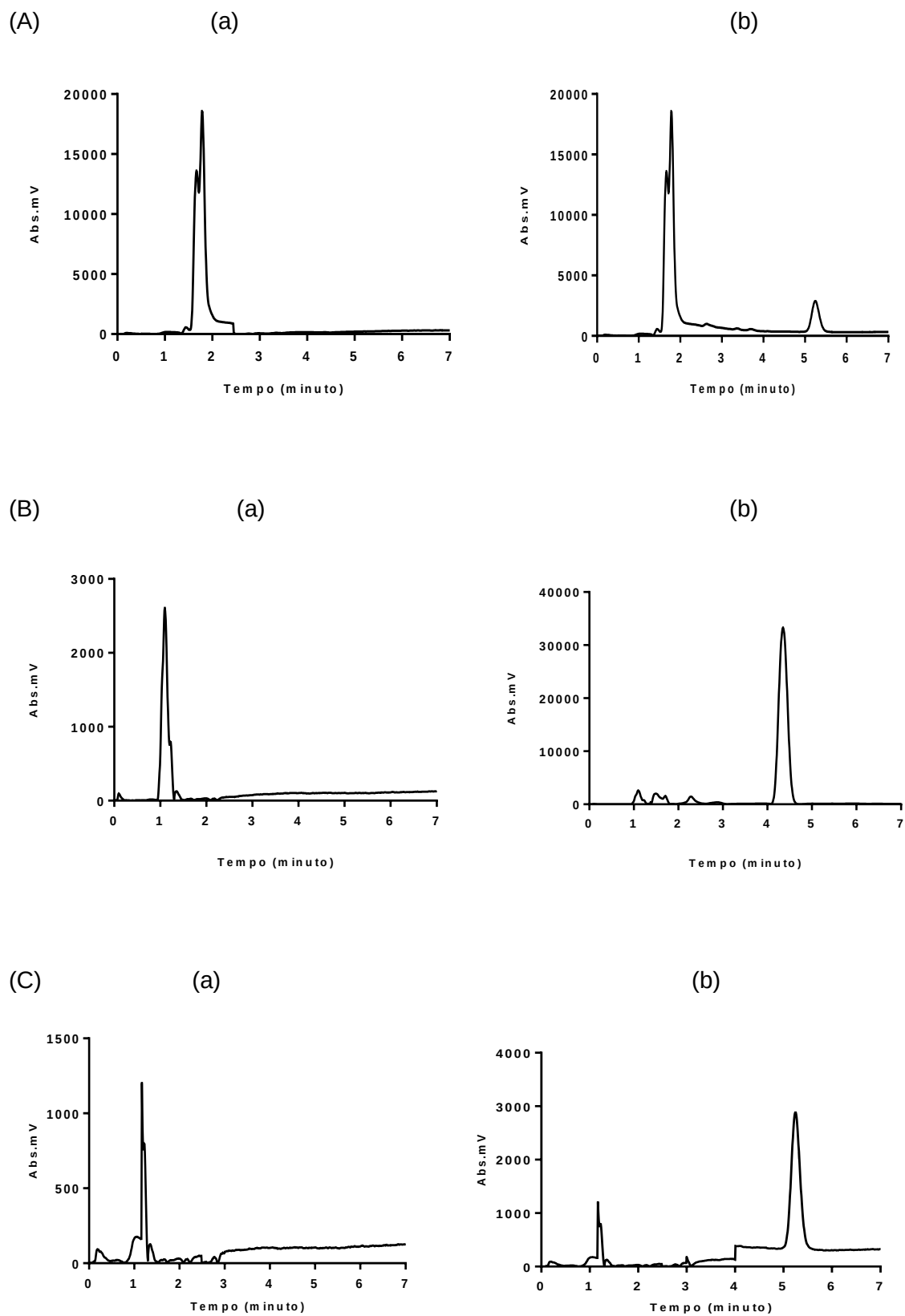
5.3 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO/BIOANALÍTICO

5.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de ultravioleta (CLAE–UV)

O método utilizado para quantificação do AHC, VBM e PPC, mostrou seletividade, especificidade, linearidade adequada. Os cromatogramas apresentados nas figuras 10a, 10b e 10c, mostram o tempo de retenção do AHC, VBM, e PPC, que foram de aproximadamente 5.0, 4.2 e 5.1 minutos, respectivamente.

A curva de calibração demonstrou que o método é linear no intervalo de 0,05 - 5µg/mL para AHC e PPC, e 0,02 - 0,7µg/mL para VBM. Para a AHC e PPC, a equação da reta obtida foi $y = 60754,2x + 856,03$ e $y = 56108,51x - 226,64$, e VBM foi $y = 30,2146x + 467,68$, com um coeficiente de determinação de $r^2 = 0,9999$, $r^2 = 0,9996$ e $r^2 = 0,9998$, respectivamente. Segundo a ANVISA (ANVISA, 2017), o coeficiente de determinação linear deve ser igual ou superior a 0,99. Sendo assim, o valor de r^2 obtido na análise da AHC e VBM pelo método desenvolvido de CLAE-UV cumpre aos limites estabelecidos (Figuras 11a, 11b e 11c).

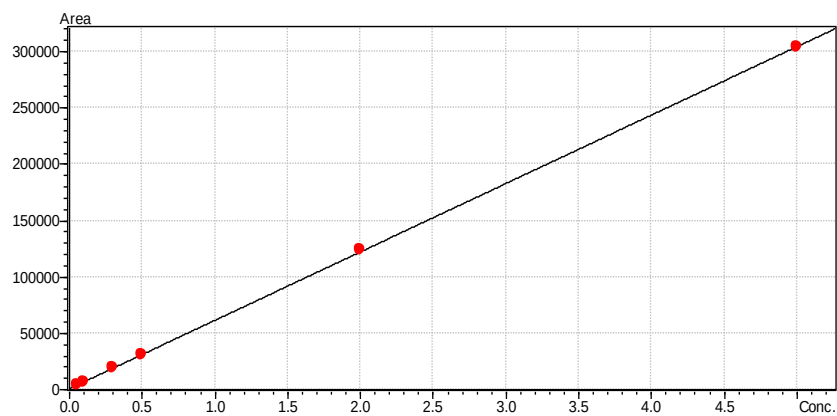
Figura 10 - Cromatograma indicativo da seletividade do método: (a) Placebo, (b) solução padrão de AHC (A), VBM (B), PPC (C).



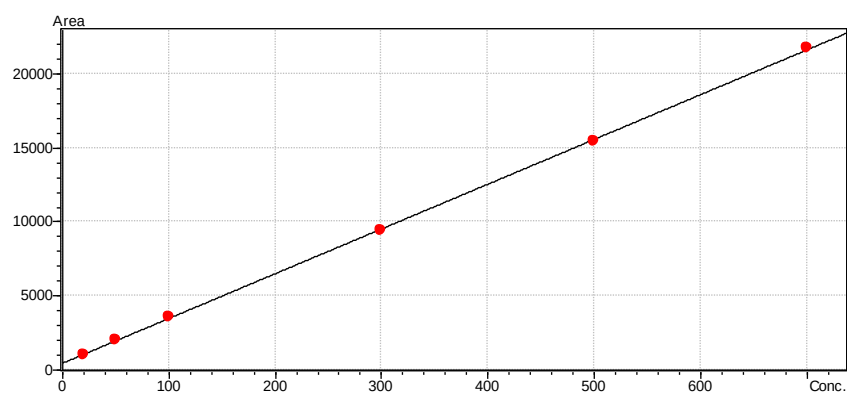
Fonte: A autora, 2019.

Figura 11 - Curva de Regressão Linear obtida da média de três curvas de calibração do AHC (A), VBM (B), PPC (C).

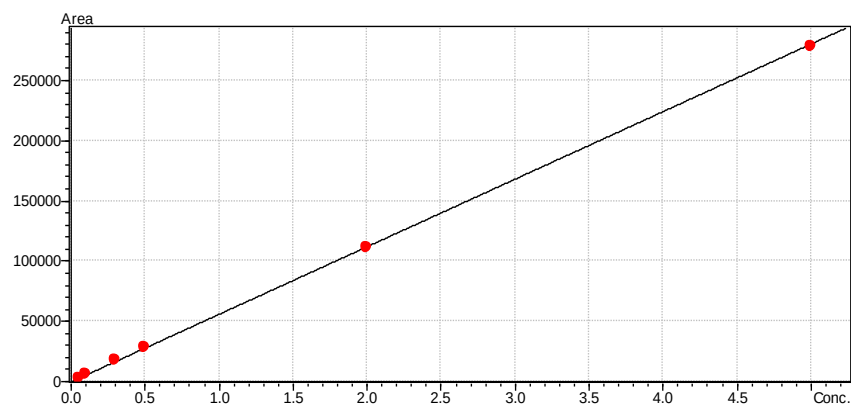
(A)



(B)



(C)



Fonte: A autora, 2019.

Assim, diante dos resultados, os métodos foram validados e apresentaram-se específicos, lineares, precisos, exatos e robustos, de acordo com a RE 166/17 da ANVISA.

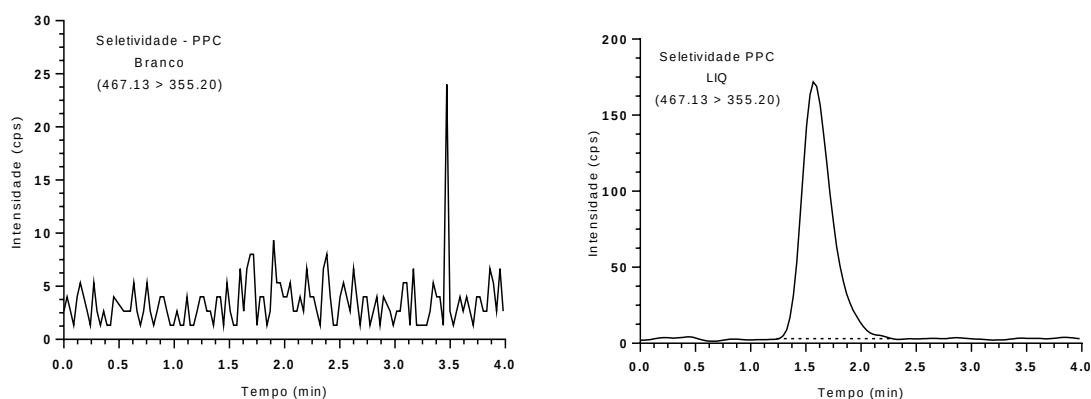
5.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de massas (LC-MS/MS)

O método demonstrou ser seletivo e específico sem interferentes nos tempos de retenção do PPC e do PI (Figura 12). A linearidade foi obtida a partir da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ponderada ($1/x^2$), na faixa de 10 a 500 ng/ mL, com equação da reta $y=0,00737x + 0,00683$, e coeficiente de correlação $r^2 = 0,99909$ ($n = 3$ corridas analíticas) (Figura 13). A precisão intra e interdia foi de 7,8 e 11,6 %, respectivamente e o erro relativo é de 10,4%. Os resultados obtidos mostraram-se dentro dos limites aceitáveis pela ANVISA (ANVISA, 2012).

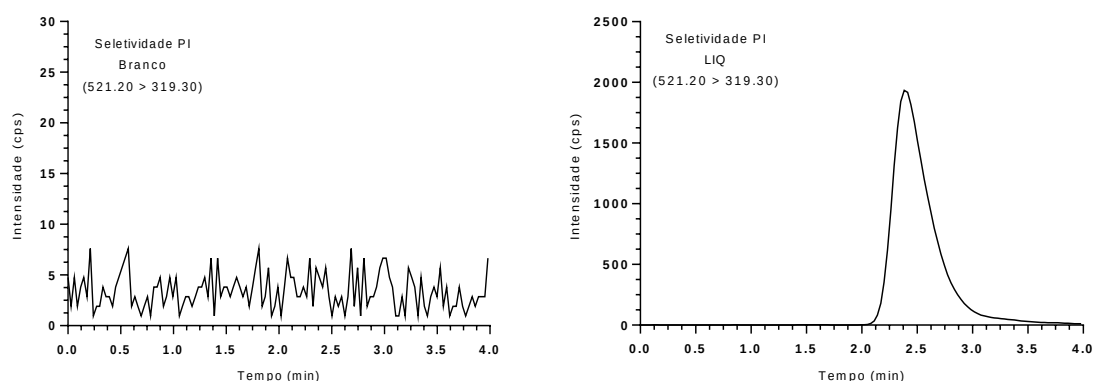
Os tempos de retenção para o PCC e PI foram 1,63 e 2,5 minutos, respectivamente, com tempo total de análise de 4 minutos.

Figura 12 - Cromatograma indicativo da seletividade do método PPC (A) e DB (B).

(A)

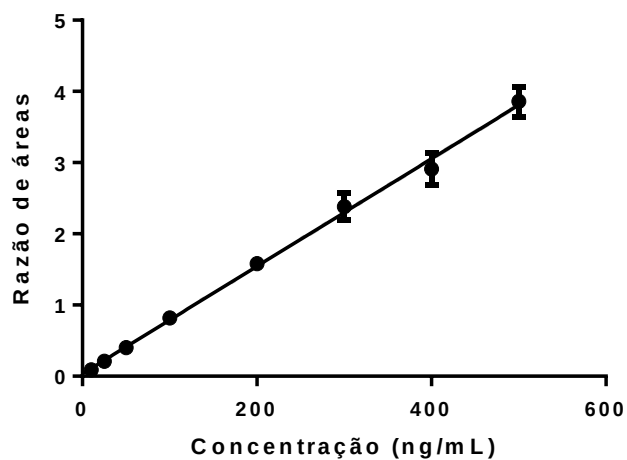


(B)



Fonte: A autora, 2019.

Figura 13 - Curva da Regressão Linear obtida da média de três curvas de calibração autênticas.



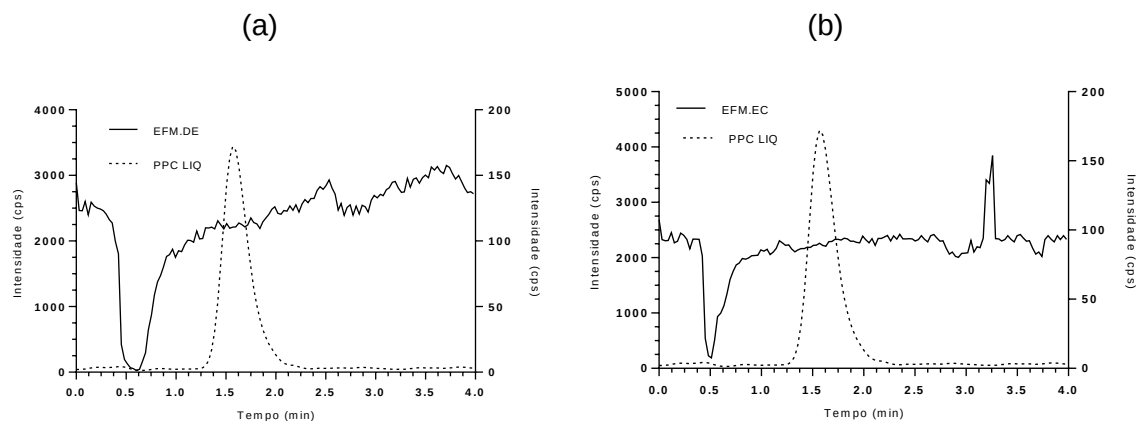
Fonte: A autora, 2019.

5.3.2.1 Efeito matriz

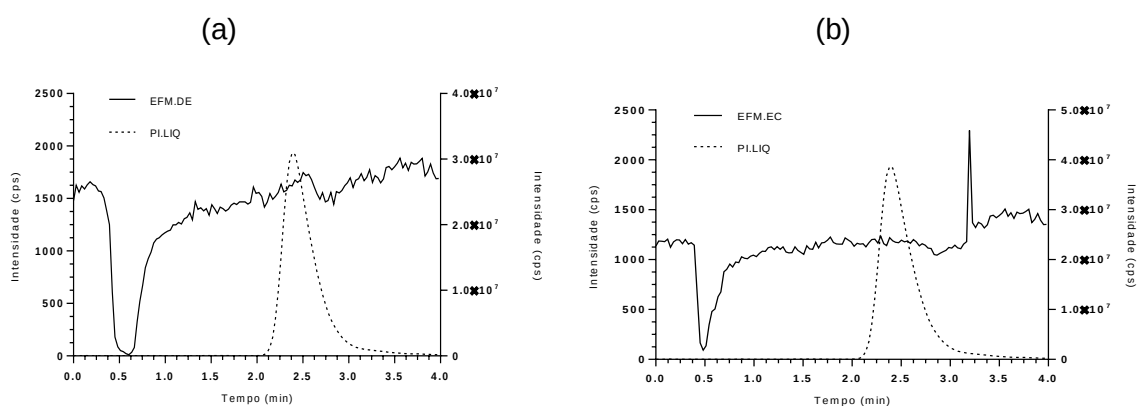
De acordo com a figura 14, o estudo do efeito matriz não mostrou nenhuma influência significativa, nas amostras de extração das fitas e pele, em relação a resposta analítica do PPC, visto que nos tempos de retenção dos picos do PPC e PI não houve alteração nos níveis de ionização.

Figura 14 - Cromatograma ilustrativo do efeito matriz: (a) epiderme/derme, (b) EC do (A) PPC e (B) PI.

(A)



(B)



Fonte: A autora, 2019.

5.3.2.2 Estabilidade das amostras

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 foi mantida durante todo o tempo, conforme

pode ser observado na tabela 11. Assim, todas as amostras foram analisadas apenas dentro do intervalo de tempo assegurado.

Tabela 11 - Estabilidade das amostras armazenadas antes e após o processo de extração.

Tempo (horas)	Antes da extração				Após a extração			
	CQB		CQA		CQB		CQA	
	Média ± DP (ng/mL)	CV	Média ± DP (ng/mL)	CV	Média ± DP (ng/mL)	CV	Média ± DP (ng/mL)	CV
24h	15,61 ± 0,91	5,87	240,80 ± 3,56	1,48	15,24 ± 0,65	4,31	241,27 ± 3,26	1,35
48h	15,39 ± 1,05	6,53	245,33 ± 4,23	1,72	16,01 ± 0,71	4,44	244,75 ± 4,78	1,95
72h	14,71 ± 0,77	5,27	242,46 ± 2,86	1,18	15,41 ± 0,62	4,04	242,10 ± 3,23	1,33

Fonte: Resultado da pesquisa

5.3.2.3 Recuperação

A tabela 12 apresenta os valores percentuais de recuperação no EC e pele de porco (epiderme e derme) (amostras contaminadas). Os resultados obtidos confirmam que o processo de extração é eficiente para a recuperação do PPC nas fitas e na pele de porco, uma vez que a substância pode ser recuperada em quantidade significativa.

Tabela 12 - Valores médios para a recuperação do PPC no EC e epiderme/derme.

Controles (n=3)	Estrato córneo			Epiderme e derme		
	Média ± DP (ng/mL)	CV (%)	Recuperação (%)	Média ± DP (ng/mL)	CV (%)	Recuperação (%)
15	14,71 ± 0,22	1,54	98,06	14,82 ± 0,10	0,70	98,80
100	98,95 ± 0,59	0,60	98,95	99,15 ± 0,27	0,28	99,15
240	236,60 ± 0,64	0,27	98,58	236,09 ± 1,09	0,46	98,37

Fonte: Resultado da pesquisa

5.4 ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DO AHC, VBM E PPC

5.4.1 Seleção do meio receptor

A seleção do meio receptor é realizada com a finalidade de garantir a “condição sink”, ou seja, a atividade termodinâmica do fármaco no fluido receptor não

deve exceder 10% da sua solubilidade de saturação para que assim, seja garantida uma liberação/permeação favorável do fármaco (WESTER, MAIBACH, 1989).

De acordo com os resultados da solubilidade do AHC, VBM e PPC em diferentes meios receptores que estão apresentados na tabela 13, foi selecionado como meio receptor o Tampão pH 7,4 + Brij 020® 0,5 %, para todos os fármacos.

Tabela 13 - Solubilidade do AHC, VBM e PPC à 32°C em três diferentes meios receptores. Média $\pm$ DP, n=3

Meios receptores	Solubilidade ($\mu\text{g/mL}$)		
	AHC	VBM	PPC
PBS	3,65 $\pm$ 0,35	2,5 $\pm$ 0,24	2,45 $\pm$ 0,23
H ₂ O/EtOH 5%	8,30 $\pm$ 0,16	6,84 $\pm$ 0,07	5,10 $\pm$ 0,12
PBS/Brij 020® 0,5%	222,78 $\pm$ 6,74	184,50 $\pm$ 7,24	29,54 $\pm$ 1,18

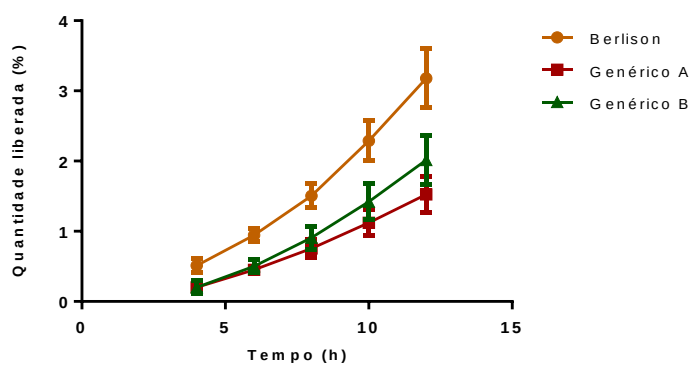
Fonte: Resultado da pesquisa

5.4.2 Cinética de liberação *in vitro*

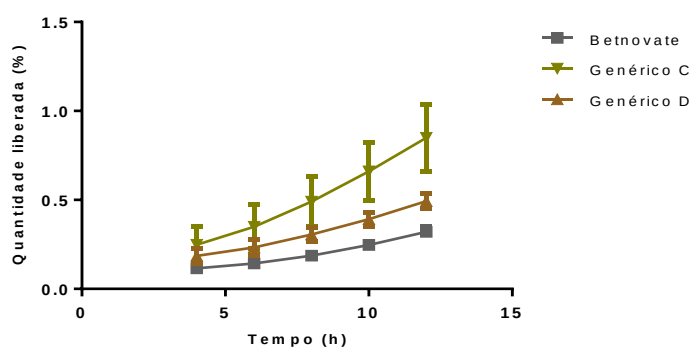
Os perfis de liberação das formulações de AHC, VBM e PPC, foram avaliados de forma comparativa entre as formulações genéricas e referência (Figura 15a, 15b e 15c), utilizando metodologia proposta pelo Guia SUPAC-SS 1724 e FDA (FDA, 1997; USP, 2014).

Figura 15 - Perfil de liberação das formulações contendo AHC (A), VBM (B) e PPC (C).

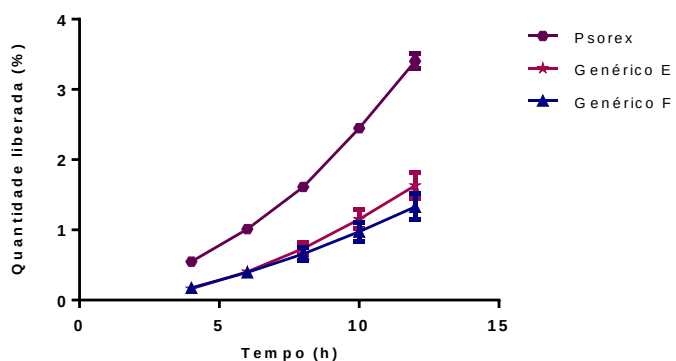
(A)



(B)



(C)



Fonte: A autora, 2019.

Após a avaliação estatística comparativa das taxas de liberação das formulações genéricas de AHC e PPC, todos os genéricos foram considerados não equivalentes a formulação de referência, mesmo após a avaliação de 18 replicatas (Tabela 14). Vale salientar que o genérico A do AHC, apresentou teor abaixo do preconizado e, por isso, já havia sido considerado não equivalente ao produto referência conforme a RDC 37/2011.

Com relação ao VBM, o genérico D foi considerado equivalente ao produto referência (Q3 semelhante). Já o genérico C foi considerado não equivalente ao Betnovate® mesmo após a realização de 18 replicatas (Tabela 14). Vale salientar que, embora o guia SUPAC-SS 1724, seja indicado para conduções de teste de desempenho *in vitro* visando a avaliação de mudanças pós-registro de uma formulação do mesmo fabricante, esse ensaio foi utilizado para comparar formulações de diferentes fabricantes.

Por si só o ensaio de liberação *in vitro*, "não é um substituto para os testes de BD/BE", podendo ser útil na demonstração da "semelhança" entre medicamentos, após realização de pequenas alterações. Dessa forma, pode-se prever a possibilidade de uma maior utilização para os ensaios de liberação *in vitro*, como parte de uma série de testes, que possam ser utilizados para estabelecer a BE de medicamentos de aplicação tópica (FDA, 1998).

Tabela 14 - Resultado estatístico comparativo entre as formulações referência e genéricas de AHC, VBM e PPC.

Fármaco	Comparação	Valores-limite com IC de 90%	Conclusão
AHC	Referência X Genérico A	37,44 - 54,31	Não semelhante
	Referência X Genérico B	51,74 - 87,18	Não semelhante
VBM	Referência X Genérico C	266,33 - 353,31	Não semelhante
	Referência X Genérico D	108,43 - 131,78	Semelhante
PPC	Referência X Genérico E	46,85 - 57,03	Não semelhante
	Referência X Genérico F	32,67 - 43,53	Não semelhante

Fonte: Resultado da pesquisa

A atividade termodinâmica e a viscosidade têm efeito determinante sobre a liberação do fármaco (DAVIS; KHANDERIA, 1972). Estudos relatam que de forma inversamente proporcional, a viscosidade de um produto pode, entre outros fatores, afetar a liberação da substância ativa (BREGNI *et al.*, 2008; CHORILLI *et al.*, 2007;

RAFIEE-TEHFANI; MEHRAMIZI, 2000; CHI, JUN, 1991). Contudo, não foi o que observamos para as formulações de AHC, VBM e PPC.

No caso das formulações contendo os três fármacos estudados, pode-se inferir que a viscosidade não apresentou uma influencia significativa na liberação dos fármacos a partir de sua formulação.

Uma vez que o Berlison® apresentou a maior viscosidade, foi o que apresentou a maior taxa de liberação, o genérico B que apresentou menor viscosidade entre as formulações de AHC, foi o que apresentou a taxa de liberação mais próxima a do seu medicamento de referência, e o genérico A que apresentava que apresentava viscosidade intermediária, apresentou a menor taxa de liberação (Tabela 14).

O Betnovate® apresentou menor viscosidade e a menor taxa de liberação, o genérico C que apresentava viscosidade intermediária, apresentou a maior taxa de liberação, e o genérico D apresentou a maior viscosidade, e a segunda maior taxa de liberação (Tabela 14).

O Psorex® apresentou a maior viscosidade, e maior taxa de liberação, o genérico E apresentou a segunda maior viscosidade, e a segunda maior taxa de liberação, e o genérico F apresentou a menor viscosidade, e a menor taxa de liberação.

A partir da análise das taxas de liberação apresentadas pelas formulações estudadas e aplicação do método de regressão linear dos mínimos quadrados, o modelo cinético de Higuchi demonstrou ser o mais adequado para todas as formulações avaliadas, e os valores do coeficiente de correlação pode ser observado na tabela 15. Portanto, os perfis de liberação das formulações de AHC e VBM, apresentam modelo cinético de pseudo primeira ordem, o que indica que o sistema é controlado por difusão (HIGUCHI, 1962).

Tabela 15 - Taxa de liberação e coeficiente de determinação das formulações contendo o fármaco AHC, VBM e PPC.

Fármaco	Formulações	Taxa de liberação ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{\text{h}}$)	Coeficiente de determinação (r^2)
AHC	Referência	$27,99 \pm 4,15$	$0,9831 \pm 0,001$
	Genérico A	$13,16 \pm 2,27$	$0,9863 \pm 0,002$
	Genérico B	$18,58 \pm 3,23$	$0,9820 \pm 0,002$
VBM	Referência	$2,31 \pm 0,41$	$0,9769 \pm 0,009$
	Genérico C	$6,13 \pm 0,89$	$0,9869 \pm 0,001$
	Genérico D	$3,19 \pm 0,32$	$0,9841 \pm 0,001$
PPC	Referência	$30,21 \pm 1,30$	$0,9906 \pm 0,001$
	Genérico E	$15,07 \pm 1,68$	$0,9859 \pm 0,001$
	Genérico F	$11,56 \pm 1,71$	$0,9874 \pm 0,002$

Fonte: Resultado da pesquisa

Estes resultados corroboram com os encontrados por Chagas, 2018, e Soares, 2017, onde a diferença de viscosidade das formulações de mupirocina pomada, e propionato de clobetasol pomada, respectivamente, não influenciaram suas taxas de liberação, pois determinadas formulações que apresentaram maior viscosidade, obtiveram maior taxa de liberação (SOARES, 2017; CHAGAS, 2018). Uma possível explicação para isso, é o fato de as formulações apresentarem outras variáveis, como diferenças qualitativas, que podem afetar a liberação do fármaco presente na formulação, para o meio receptor (SOARES, 2017).

Estudo realizado por Caron, 1990, com formulações de hidrocortisona creme, mostrou que o uso de um sistema de células de difusão, com membrana sintética, pode ser usado como um procedimento de controle de qualidade para garantir uniformidade e bioequivalência entre lotes, uma vez que a biodisponibilidade tenha sido avaliada anteriormente (CARON, 1990).

Considerando que o requisito mais comum para isenção de estudo de bioequivalência, é com base na formulação e na dosagem do medicamento, algumas agências podem conceder dispensa para uma formulação tópica na qual os excipientes dos medicamentos teste e referência são os mesmos, porém o Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) e os excipientes devem ser Q1 (qualitativamente) e Q2 (quantitativamente) os mesmos que o produto de referência, pois essas diferenças podem modificar a absorção do IFA ou afetar a segurança e/ou eficácia do medicamento (BRADDY *et al.*, 2014; TIFFNER *et al.*, 2018).

Em se tratando da legislação brasileira, pode-se prever a necessidade de utilização dos ensaios de liberação *in vitro* (de forma análoga ao perfil de dissolução para formas sólidas de uso oral), como parte de uma série de testes que possam ser utilizados para auxiliar no estabelecimento da equivalência farmacêutica de medicamentos de aplicação tópica (Leal *et al.*, 2017b).

5.5 ESTUDO DERMATOFARMACODINÂMICO

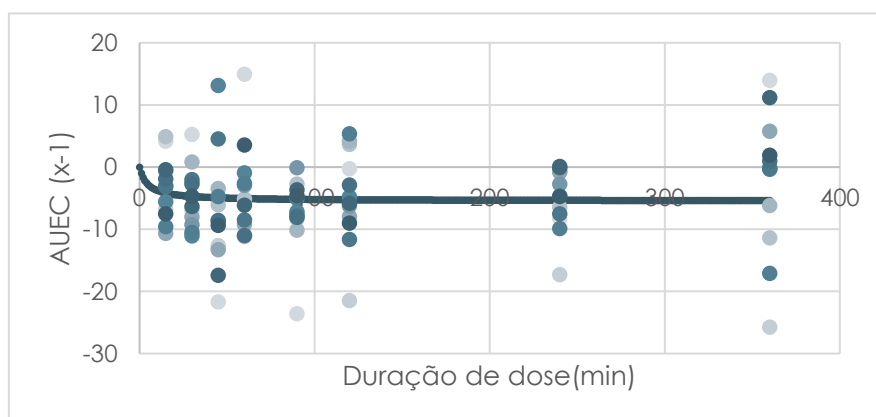
5.5.1 Estudo Piloto

Para cada um dos 3 diferentes medicamentos referência testados, após a realização do estudo proposto, foram realizados os ajustes necessários nos dados do branqueamento, conforme descrito no item 4.5.1.3. As curvas dose resposta (Figura 20) foram construídas considerando todos os pontos, de todos os 12 participantes, visto que apresentaram adequada resposta ao branqueamento.

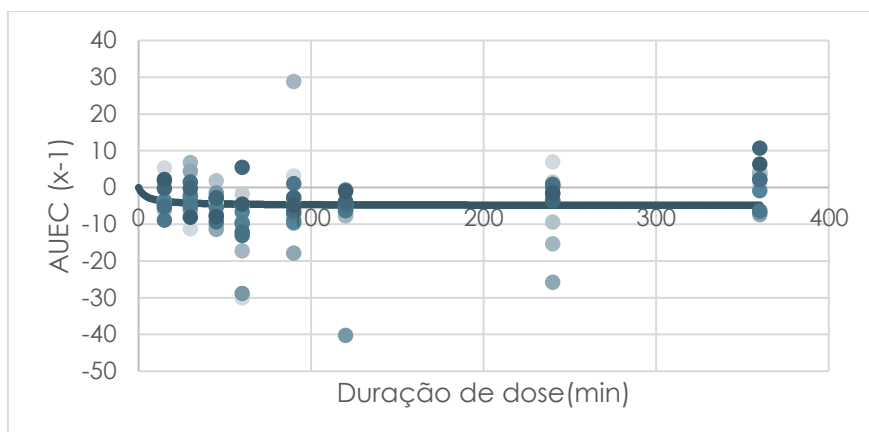
A figura 16 A, B e C, apresentam os valores individuais de ASC e o modelo $E_{\text{máx}}$ ajustado, para o Berlison®, Betnovate® e Psorex®, respectivamente.

Figura 16 - Área sob a curva em todos os tempos e o modelo $E_{\text{máx}}$ ajustado (linha sólida) do Berlison® (A), Betnovate® (B) e Psorex® (C), aos dados de duração dose-resposta do branqueamento dos 12 participantes de pesquisa do estudo piloto.

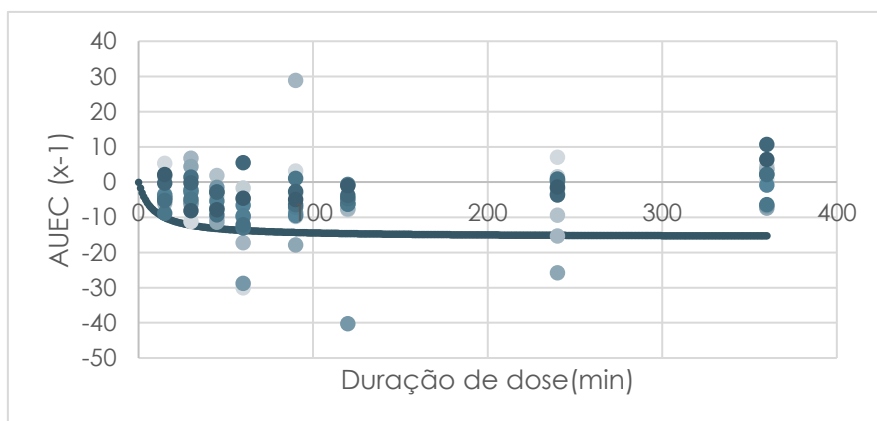
(A)



(B)



(C)



Fonte: A autora, 2019.

Os valores de $E_{\text{máx}}$ e ED_{50} encontrados foram: Berlison® -5,42 e 4,57h, Betnovate® -4,84 e 4,62 h, Psorex® -15,59 e 0,16h.

5.5.2 Estudo Principal

Os resultados obtidos no estudo piloto para o AHC e VBM, fármacos considerados de acordo com a Fundação Nacional de Psoríase dos EUA e Consenso Brasileiro de Psoríase, de baixa potência e potente, respectivamente, apresentaram um ED_{50} semelhante. Diante deste fato, o estudo principal foi conduzido apenas com formulações de PPC.

Estudos realizados por Wiedersberg 2009, utilizando formulações contendo o VBM mostraram que a resposta ao branqueamento em todas as formulações, aumentou após a sua remoção, atingindo pico máximo 4 a 6 h mais tarde. Este fato

foi atribuído a manifestação do fenômeno frequentemente referido na literatura como o “efeito do reservatório” (WIEDERSBERG *et al.*, 2009).

Efeito este, que corrobora com os resultados obtidos neste estudo, onde no maior tempo de absorção (10 minutos), não foi possível observar branqueamento (Figura 17). A partir de 8 horas após remoção das formulações, já foi possível observar branqueamento (inclusive visual), com efeito máximo do branqueamento atingido em torno de 19 horas (Figura 18).

Figura 17 - Branqueamento causado pelas formulações de PPC, após 10 minutos de contato das formulações.



Fonte: A autora, 2019.

Figura 18 - Branqueamento causado pelas formulações de PPC, cerca de 19 horas após a remoção das formulações.



Fonte: A autora, 2019.

As tabelas 16 e 17, trazem os dados de ASC apenas dos participantes “detectores”, que por sua vez, foram utilizados para o cálculo de bioequivalência.

Tabela 16 - Valores médios de ASC dos participantes de pesquisa que atenderam ao critério de resposta à duração de dose (Genérico E x Referência).

SUJ	ASC (0-24) GENÉRICO E	ASC (0-24) REFERÊNCIA
1	-26,06	-27,51
2	-19,63	-15,54
3	-13,72	-25,03
6	-13,85	-11,84
7	-35,47	-39,99
9	-40,67	-38,81
10	-13,55	-6,72
11	-8,50	-13,21
12	-51,12	-42,86
14	-20,34	-22,15
15	-14,38	-24,83
18	-29,76	-35,96

19	-19,60	-20,63
21	-33,17	-32,39
22	-11,84	-18,84
27	-17,50	-19,30
28	-10,33	-11,71
30	-12,16	-19,32
31	-23,03	-27,40
36	-13,38	-13,63
39	-7,82	-9,77
40	-34,86	-38,89

Fonte: Resultado da pesquisa

Tabela 17 - Valores médios de ASC dos participantes de pesquisa que atenderam ao critério de resposta à duração de dose (Genérico F x Referência).

SUJ	ASC (0-24) GENÉRICO F	ASC (0-24) REFERÊNCIA
3	3,35	6,27
4	-24,65	-36,14
5	-22,59	-37,88
6	-38,69	-33,27
7	-21,15	-26,05
8	-25,74	-24,85
9	-31,79	-31,04
12	-12,53	-19,16
13	-13,91	-14,46
14	-3,83	-21,23
15	-34,16	-29,94
18	-31,19	-32,19
21	-34,93	-18,14
24	-19,02	-18,86
28	-21,34	-16,40
29	-16,58	-11,33
30	-13,60	-14,65
32	-39,95	-21,59
34	-53,36	-36,33
35	-37,19	-40,77
38	-56,47	-44,44
39	-13,58	-6,69

Fonte: Resultado da pesquisa

Dentre os 80 participantes de pesquisa utilizados no estudo, 44 foram considerados “detectores” (22 para cada genérico avaliado), utilizando o critério de D₂

/ $D_1 \geq 1,25$. Logo, apenas os dados dos 22 “detectores”, foram usados para cálculo de BE.

A partir do método de Locke para determinação da BE, foi obtido o valor de G onde, $G < 1$ é requerido, para ter um intervalo de confiança adequado. Se $G \geq 1$, o estudo não atende aos requisitos de bioequivalência *in vivo*. A partir da determinação do valor de G, foi possível calcular o intervalo de confiança de 90% exato para os dados (FDA, 1997).

O genérico E obteve um $G = 0,0287$, e o intervalo de confiança de 90% foi de 83,10 - 98,90%. O genérico F obteve um $G = 0,0348$, e o intervalo de confiança de 90% foi de 91,90 - 121,90%. Sendo assim, os genéricos E e F, foram considerados BE ao seu medicamento de referência (Psorex®), corroborando com o resultado de bioequivalência através do tape stripping.

Mesmo não sendo ainda um método aceito no Brasil para avaliação de BE de produtos tópicos (esta metodologia está descrita no anexo III da consulta pública N°760, publicada em 27 de dezembro de 2019) é utilizado em diferentes países, por exemplo, África do Sul, Austrália, Canadá, EMA, EUA, Suíça, Japão.

Para tanto, existem diversos estudos publicados na literatura comparando produtos comercializados e/ou formulações desenvolvidas internacionalmente, de corticoides de diferentes potências, com resultados positivos e negativos do ponto de vista da aprovação da bioequivalência. Entre eles podemos citar formulações contendo hidrocortisona (GORNE, 2007); betametasona creme/ pomada 0,05% (PERSHING, 1992); valerato de betametasona creme/pomada 0,1%, fluocinolana acetonida creme 0,025%, e triancinolona acetonida creme/pomada 0,025, 0,05 e 0,1% (STOUGHTON, 1987, JACKSON, 1989; SHAH, 1989; OLSEN, 1991).

No entanto, não foi encontrado, na literatura pesquisada, a utilização desta metodologia (branqueamento) para avaliação de produtos corticoides comercializados no mercado nacional, demonstrando a importância do estudo descrito seja para comunidade científica, usuários e órgão regulador.

5.6 ESTUDO DERMATOFARMACOCINÉTICO (DPK) *IN VIVO*

5.6.1 Tolerabilidade

Um total de 6 participantes de pesquisa saudáveis, 4 mulheres e 2 homens, foram avaliados no estudo piloto após a assinatura do termo de consentimento. A média (faixa) da idade, do peso e da altura dos voluntários eram de 24 anos (21-27); 65 (52-82) kg; e 165 (156-175) cm, respectivamente. Cinco participantes apresentaram fototipo de pele II e III e um participante apresentou fototipo de pele IV.

Um total de 14 participantes de pesquisa saudáveis, 13 mulheres e 1 homem, foram incluídos no estudo principal após a assinatura do termo de consentimento. A média (faixa) da idade, do peso e da altura dos voluntários eram de 26 anos (21-34); 62 (50-78) kg; e 161 (153-170) cm, respectivamente. Dez participantes apresentaram fototipo de pele II e IV e quatro participantes tiveram fototipo de pele III e V. Ao final do estudo não foi observado vermelhidão, nem qualquer outro efeito indesejável descrito ou não, no protocolo de estudo, após o procedimento de *tape stripping*, diferente do relatado no estudo realizado por Araújo, 2018.

5.6.2 Estudo piloto

A concentração máxima de fármaco recuperada no EC ($C_{\max} \pm DP$) foi de 61,76 ($\pm 14,88$) ng /cm², e alcançada no T_{max} de 10 minutos, que corresponde ao tempo máximo de contato da formulação na pele. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre esta concentração e aquela observada por até 6hs após a retirada da formulação da pele, sugerindo um efeito reservatório do PPC no EC. Estudo de *tape stripping in vivo*, visando avaliar a bioequivalência de formulações de PPC realizado na África do Sul, não mostra um possível efeito reservatório (AU; SKINNER; KANFER, 2010). Vale salientar que o design do estudo foi diferente deste aqui realizado, e talvez por isso, não exista uma evidência positiva em relação a este fato.

Neste estudo, o T_{máx} foi selecionado visando estabelecer uma relação com o ED₅₀ determinado no estudo do branqueamento. A concentração de PPC no EC correspondente ao tempo D₁ (5min) e D₂ (20 min) do estudo de branqueamento foi de 47,75 ($\pm 17,21$) e 85,24 ($\pm 11,97$) ng /cm², respectivamente, correspondendo a diminuição e aumento na quantidade de fármaco no EC de 1,3 e 1,4 vezes,

respectivamente, tornando evidente a relação entre ambas as metodologias (DPK e branqueamento).

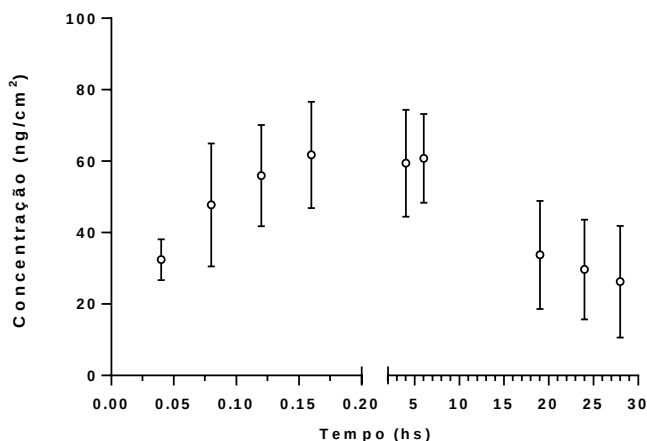
Assumindo uma eliminação de primeira ordem do PPC no EC após o tempo de absorção de 10 minutos, e coeficiente de regressão linear ($r^2=0,99$) da quantidade de fármaco log transformada versus tempo entre 6 e 28h produz o valor médio de k_e ($\pm$ DP) de $0,044$ ($\pm 0,024$) h^{-1} ; e meia-vida correspondente de $19,83$ ($\pm 10,31$) horas.

O *draft guideline on quality and equivalence of topical products*, publicado pela EMA (EMA, 2018), deixa claro que o tempo de eliminação deve ser longo o suficiente para permitir a transferência mensurável do fármaco do EC para a pele viável. No entanto, não deve exceder o tempo total de 48 horas, visando evitar efeito do tipo descamação da pele. De acordo com este mesmo guia, este tempo deve permitir uma diminuição de 25% na massa do fármaco recuperada, em relação ao tempo de absorção. Neste estudo, no tempo total, a massa diminuiu para $42,52$ ng $\pm 31,16\%$, estando assim em conformidade com o *draft* da EMA.

A média da ASC ($\pm$ DP) medida sob a quantidade de EC versus tempo (ASC_{0-28h}) foi $1302,46$ ($\pm 484,19$) (ng·h)/cm² e, usando a k_e calculada, $ASC_0 - \infty$ foi determinado como $1986,05$ ($\pm 1013,45$) (ng·h)/cm².

A figura 19 mostra o perfil cinético da quantidade de PPC no EC *in vivo* durante a fase de absorção ($t \leq 10$ min) e eliminação ($t \geq 6$ h). Estes dados representam a média dos 6 participantes do estudo.

Figura 19 - Perfil cinético da quantidade de PPC no EC *in vivo* durante a fase de absorção e eliminação (n=6).



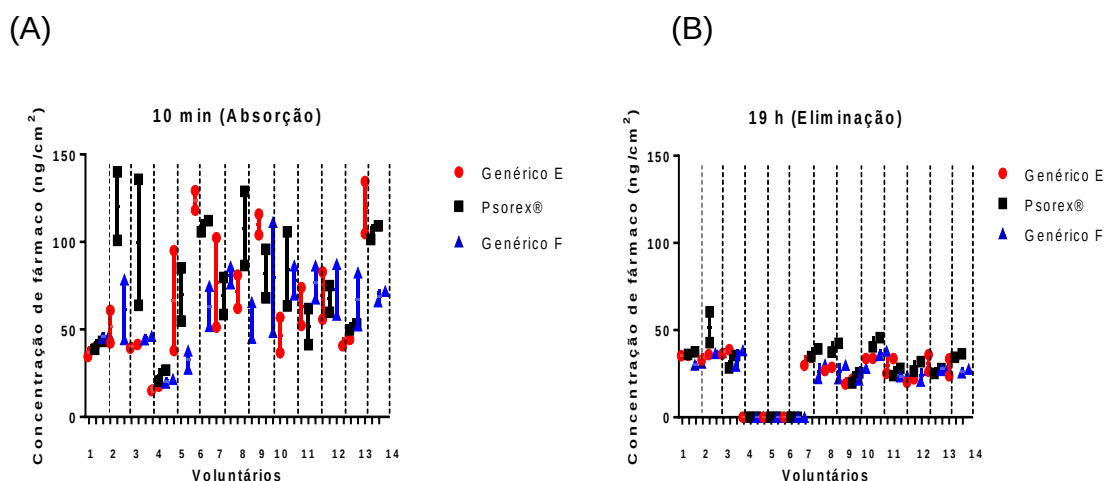
Fonte: A autora, 2019.

5.6.3 Estudo principal (Bioequivalência)

De acordo com o *draft guideline* (EMA, 2018) citado anteriormente, no estudo de bioequivalência utilizando o *tape stripping*, “é necessário que os produtos teste e referência sejam comparados em dois momentos (absorção e eliminação) para cada participante do estudo” e o tempo de absorção determinado no estudo piloto, deve ser suficientemente longo para que o fármaco atinja o estado de equilíbrio. Dito isto, baseado no estudo piloto, foram selecionados os tempos de absorção e eliminação de 10 min e 19 horas, respectivamente.

Seguindo o mesmo cálculo realizado por N'Dri Stempfer *et al.* 2008, a figura 20 mostra a variabilidade da quantidade total de fármaco (ng/cm^2) extraída dos dois sítios de aplicação para cada formulação, em cada um dos 14 participantes da pesquisa nos momentos de absorção e de eliminação. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o Psorex® e os genéricos E e F, utilizando o teste bicaudal de Mann Whitney para a absorção, eliminação e razão entre a absorção e eliminação (R).

Figura 20 - Quantidades de fármaco por unidade de área (ng/cm^2) das determinações em duplicata em cada voluntário para as três formulações de PPC avaliados após 10 minutos de absorção (A), e 19 horas de eliminação (B).



Fonte: A autora, 2019.

PPC foi facilmente detectável através da análise por tape stripping. No entanto, para um total de 3 participantes, foram observadas concentrações abaixo do limite de quantificação no tempo de eliminação (Figura 20B) para a duplicata de todas as formulações analisadas, ocasionando o aumento da variabilidade dos dados. Isto pode ter ocorrido em virtude de problemas na aplicação das formulações, entre outros. Uma maior variabilidade observada nos tempos de absorção (Figura 20A) poderia ser explicada pela necessidade das formulações aplicadas, levarem um tempo para entrar em equilíbrio com a pele. No entanto, a análise da quantidade de PPC recuperada excluindo as duas primeiras fitas apresentou resultados semelhantes. No estudo *in vivo* realizado por Araújo, 2018 e por Chagas, 2019 utilizando formulações contendo metronidazol e mupirocina, respectivamente, foram encontrados resultados semelhantes.

Com relação aos dados apresentados na tabela 18, não foi observado diferença estatisticamente significativa na quantidade recuperada de PPC no tempo de absorção para ambos os produtos. No entanto, no tempo de eliminação, foi observada uma diferença estatisticamente significativa (t student $p < 0,05$) entre a referência e o genérico F. Para os produtos, a massa de PPC na eliminação foi 45,10%, 44,68% e 47,57% menor, relativa para os produtos E, R e F, respectivamente após 19 horas. Resultados em torno de 33% foram observados para formulações contendo econazol e diclofenaco de sódio após tempo semelhante (N-DRI STEMPFER, 2009; CORDERY, 2017). Este último resultado, fica mais claramente evidenciado, quando da avaliação do fluxo no EC, que também não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os produtos teste e referência.

Tabela 18 - Concentração de PPC recuperado do EC após absorção e eliminação, fluxo deduzido do fármaco para o tecido viável durante o período de eliminação ($J_{in vivo}$) e a constante de taxa de primeira ordem (K) que descreve a eliminação do EC. Média aritmética $\pm$ intervalo de confiança de 90% (n = 14).

Formulação	Genérico E	Psorex®	Genérico F
Absorção ng/cm ²	66,82 $\pm$ 34,15	77,37 $\pm$ 32,46	60,68 $\pm$ 22,25
Eliminação ng/cm ²	30,14 $\pm$ 6,01	34,57 $\pm$ 9,01	28,87 $\pm$ 5,56
$J_{in vivo}$ ng.h ⁻¹ .cm ⁻²	2,27 $\pm$ 2,04	2,64 $\pm$ 1,67	2,0 $\pm$ 1,11
K (h ⁻¹)	0,013 $\pm$ 0,013	0,014 $\pm$ 0,010	0,014 $\pm$ 0,010

Fonte: Resultado da pesquisa

A BE foi avaliada após 10 minutos (absorção) e 19 horas (eliminação) de aplicação do medicamento de referência Psorex® e genéricos (E e F), usando a razão do log transformado da quantidade de fármaco (ng/cm^2) (média $\pm$ intervalo de confiança de 90%) (Tabela 19).

Tabela 19 - Avaliação de bioequivalência dos medicamentos contendo PPC (genéricos E e F) em comparação com medicamento de referência (Psorex®) determinada em 14 voluntários da concentração de PPC/área. Bioequivalência foi avaliada através da razão entre o log transformado da concentração de fármaco no EC (média $\pm$ 90% de intervalo de confiança) após 10 minutos de absorção, com ou sem eliminação de 19 horas.

Medida da BE	Genérico E			Genérico F		
	Média	IC inferior	IC superior	Média	IC inferior	IC superior
Absorção	1,03	0,87	1,22	1,03	0,87	1,24
Eliminação	0,94	0,85	1,04	0,94	0,86	1,03
Absorção e Eliminação	0,87	0,80	0,95	0,91	0,84	0,99

Fonte: Resultado da pesquisa

Neste estudo, não foi realizada a normalização dos dados através da quantidade de EC coletado. De acordo com o procedimento realizado por Araújo, 2018, utilizando formulações contendo metronidazol, o resultado foi semelhante, independente da referida normalização, já de acordo com Au, 2010, a normalização é obrigatória. Vale salientar que, neste último estudo, os parâmetro adotados no desenvolvimento da metodologia foram diferentes do realizado neste estudo.

De acordo com guia sobre requisitos de qualidade para o registro de produtos tópicos e transdérmicos (ANVISA, 2019), no desenvolvimento de produtos genéricos, o medicamento “cópia” não precisa, necessariamente, apresentar-se Q1 nem Q2 semelhantes, levando também a uma diferença em Q3. Isto, por certo, poderá prejudicar os resultados de bioequivalência destes produtos. Neste estudo com formulações de PPC adquiridas no mercado brasileiro, mesmo sendo Q1, Q2 e Q3 diferentes, apresentou um resultado positivo para bioequivalência por *tape stripping*. Resultados diferentes foram encontrados por Araújo, onde o aumento de 0,5% na concentração do agente espessante utilizado levou a uma diminuição de 3 vezes na espalhabilidade, resultando na bioinequivalencia (ARAÚJO, 2018).

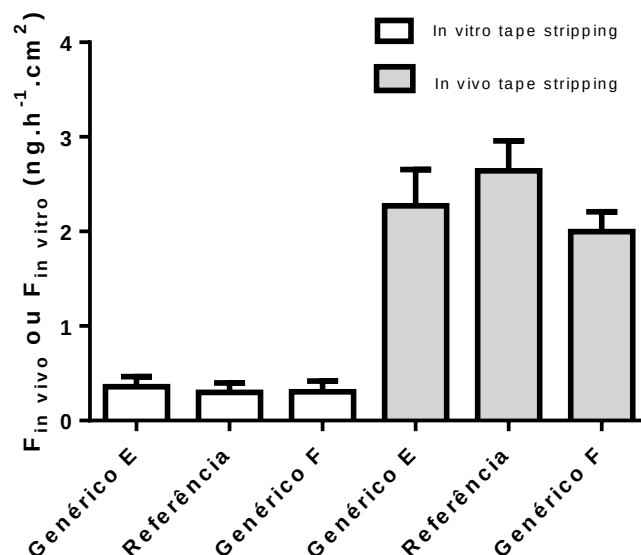
Outros estudos também têm demonstrado a capacidade da metodologia DPK *in vivo*, oferecer uma métrica confiável para quantificar o fármaco presente EC, podendo ser útil para determinações tópicas de biodisponibilidade e bioequivalência (FREITAS *et al.*, 2015; WIEDERSBERG *et al.*, 2008; HERKENNE *et al.*, 2006; PERSHING *et al.*, 2002). No entanto, mesmo após uma série de refinamentos realizados nesta técnica após a retirada do *draft* “*Topical dermatological drug product NDAs and ANDAs - In vivo bioavailability, bioequivalence, in vitro release, and associated studies*”, do FDA no ano de 2002, ainda não existe um consenso no que trata do procedimento mais adequado, seguro e sensível a ser utilizado na avaliação da bioequivalência de produtos tópicos. Neste sentido, provavelmente o primeiro guia a ser aprovado incluído este procedimento será o guia extensivo à união europeia (EMA, 2018), que teve sua consulta pública finalizada em 2019.

5.7 DERMATOFARMACOCINÉTICA x DERMATOFARMACODINÂMICA

Com base na literatura científica, ficou claro que os métodos aqui propostos para avaliação *in vivo* de formulações tópicas de corticoides, apresentam uma correlação. Isto significa que uma maior quantidade de fármaco avaliada no EC (tape stripping), corresponde também, a uma maior resposta farmacodinâmica (PERSHING, 1992; CARON, 1990). No entanto, o estabelecimento de uma métrica mais clara correlacionando ambos os estudos com fins de avaliação de bioequivalência são ainda insipientes, principalmente devido a difícil padronização da metodologia de dermatofarmacocinética.

Portanto neste trabalho, uma correlação *in vitro/in vivo* de DPK pode ser vislumbrada através da comparação entre os fluxos do PPC no EC calculados no período de absorção e eliminação (Figura 21). Os dados demonstram que os fluxos deduzidos dos dois diferentes procedimentos são consistentes, apesar da diferença no seu valor médio, demonstrando a dificuldade de eliminação de fármacos, principalmente aqueles, do EC para os tecidos subjacentes.

Figura 21 - Comparação do fluxo *in vivo* e fluxo *in vitro* deduzido na avaliação de PPC no EC em voluntários humano (n=14) e pele de porco (n=6).



Fonte: A autora, 2019.

5.8 ESTUDO DE PERMEAÇÃO *EX VIVO*, RETENÇÃO CUTÂNEA E *TAPE-STRIPPING* DO PPC EM PELE ANIMAL (SUÍNA)

Os modelos *ex vivo* são comumente utilizados para avaliar a absorção cutânea, sobretudo em decorrência de algumas dificuldades de se avaliar a permeabilidade da pele em relação a novas moléculas ou novas formulações, utilizando apenas experimentos *in vivo* (FARAHMAND; MAIBACH, 2009).

Ao final de ambos os experimentos, não foi detectado PPC na solução receptora (limite de quantificação do método 10ng/mL), quando da utilização de nenhuma das formulações testadas, seja no tempo de absorção e/ ou de eliminação. Fato esperado, considerando se tratar de um fármaco de ação tópica, com efeito a nível de epiderme/derme. Resultado semelhante foi observado quando da avaliação de formulações tópicas contendo mupirocina pomada (CHAGAS, 2018). A retenção (quantidade de PPC na epiderme e derme viável) está apresentada na tabela 20 e demonstrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre a quantidade

de PPC para as diferentes formulações (ANOVA seguido do teste de Bonferroni), seja no tempo de absorção e/ou de eliminação, tampouco analisando a soma do tempo de absorção e eliminação, mesmo utilizando apenas 6 animais diferentes. Os dados apresentaram um baixo coeficiente de variação, demonstrando a padronização do procedimento, incluindo o manuseio da membrana biológica.

Tabela 20 - Média da quantidade de PPC na epiderme/derme (ng/cm²), após um período de absorção e eliminação (n = 6).

Pele orelha de porco		Quantidade de fármaco na epiderme/derme (ng/cm ²)		
		Genérico E	Psorex®	Genérico F
Tempo de absorção	Média	106,52	107,65	100,04
	DP	11,04	22,12	18,79
	CV	10,36%	20,54%	18,79%
Tempo de eliminação	Média	87,84	111,30	99,05
	DP	10,87	15,97	13,63
	CV	12,38%	14,35%	13,78%
Tempo de absorção + eliminação	Média	194,36	218,95	199,09
	DP	20,12	36,14	18,53
	CV	10,35%	16,51%	9,31%

Fonte: Resultado da pesquisa

Com base na metodologia de N'Dri-Stempfer, 2008, foi calculada a quantidade total de fármaco (ng/cm²), extraído das fitas que foram utilizadas para a realização do procedimento de tape stripping, após a aplicação das formulações, em sextuplicata, nos tempos de absorção e eliminação (Tabela 21).

Tabela 21 - Média aritmética da quantidade de PPC no EC (ng/cm²), após um período de absorção e eliminação, incluindo o intervalo de confiança superior e inferior (n=6).

Formulação	Genérico E	Psorex®	Genérico F
Absorção ng/cm ²	70,76 ± 6,78	75,77 ± 4,95	69,58 ± 5,67
Eliminação ng/cm ²	60,00 ± 5,39	66,82 ± 6,88	60,44 ± 5,54
<i>J_{in vitro}</i> ng.h ⁻¹ .cm ⁻²	0,35 ± 0,10	0,29 ± 0,10	0,30 ± 0,11

Fonte: Resultado da pesquisa

A avaliação acima descrita, foi realizada analisando tanto todas as 15 fitas juntas, quanto excluindo as duas primeiras fitas. Após análise, concluímos que não houve diferença estatisticamente significativa entre o Psorex® e os genéricos E e F (ANOVA e teste T pareado) independentemente da inclusão ou não das duas

primeiras fitas, o que demonstra que o procedimento de limpeza realizado foi eficiente para remoção do resíduo de formulações na pele, conforme descrito por Wiedersberg, 2009, para formulações contendo o valerato de betametasona e confirmado por Araújo, 2016; Leal, 2017 e Chagas, 2018 em avaliações realizadas com formulações contendo metronidazol, valerato de betametasona e mupirocina, respectivamente (ARAÚJO, 2016; LEAL, 2017a; CHAGAS, 2018).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre o Psorex® e os genéricos E e F (ANOVA e teste T pareado) nos fluxos do PPC no EC.

Vale também ressaltar que não houve diferença estatisticamente significativa (Test T) na quantidade de fármaco retida no EC no tempo de absorção em relação ao tempo de eliminação, como também reportado quando da avaliação de formulações comerciais contendo o econazol (LEAL, 2017a)

Diferentemente dos resultados ora apresentados, estudo realizado por Soares, 2017, utilizando formulações cremosas contendo propionato de clobetasol 0,05% obtidas no mercado brasileiro, todas as 6 formulações genéricas avaliadas tiveram permeação *in vitro* semelhante à referência (Psorex®), considerando a análise da quantidade de fármaco presente no EC. Porém, considerando a análise na EP + D, e pele total (EC+EP+D), nenhum creme demonstrou semelhança com o referência. Com isso, o estudo, como um todo, demonstrou que as formulações genéricas estudadas, apresentam-se diferentes em relação ao seu medicamento de referência.

A utilização de modelos *in vitro* com pele de porco (normalmente aceita para mimetizar a pele humana em virtude de suas similaridades), pode ser útil para predição de um modelo *in vivo*, sendo considerado uma alternativa no desenvolvimento e otimização de formulações tópicas (LEAL *et al.*, 2017a; CORDERY *et al.*, 2017).

6 CONCLUSÃO

- ✓ Todos os medicamentos genéricos de AHC, VBM e PPC analisados neste estudo, apresentaram diferenças qualitativas (Q1) e possivelmente quantitativas (Q2) de excipientes, levando também a diferença em sua microestrutura (Q3) que foi avaliada através do estudo de liberação *in vitro*;
- ✓ Conforme os testes de equivalência farmacêutica descritos na RDC nº 31/2010, com exceção do genérico A, todos os genéricos foram considerados equivalentes aos respectivos medicamentos de referência;
- ✓ Se considerarmos o guia SUPAC-SS 1724 (FDA,1997; USP, 2014) que utiliza o estudo de liberação *in vitro* como critério de admissão de equivalência entre o medicamento candidato a genérico e o seu referência, seria considerado equivalente apenas o genérico D;
- ✓ A avaliação qualitativa (Q1) e quantitativa (Q2) associadas ao estudo de liberação *in vitro* (microestrutura Q3), proposto pelo FDA através de diferentes *drafts*, foram úteis para avaliar a bioequivalência das formulações contendo AHC, VBM e PPC. Ao analisarmos os resultados obtidos do ponto de vista de Q1, Q2 e Q3 e utilizarmos o SCFT proposto por Shah, 2015, o Genérico D seria considerado classe 3 e logo, bioisento. Os demais como classe 4, sendo necessário realização de estudo de BE;
- ✓ O resultado de permeação *ex vivo*, retenção cutânea e *tape-stripping* do PPC em pele animal (suína), demonstrou que os genéricos E e F, são bioequivalentes ao Psorex®
- ✓ O resultado dermatofarmacodinâmico demonstrou que os genéricos E e F são estatisticamente semelhantes ao Psorex®, corroborando com o resultado da EF, porém, indo de encontro com os resultados do estudo de liberação *in vitro*.
- ✓ Os resultados de DPK *in vivo* demonstraram que os genéricos E e F são estatisticamente semelhantes ao Psorex®, corroborando com o resultado da

EF e dermatofarmacodinamico, porém, indo de encontro com os resultados do estudo de liberação *in vitro*.

- ✓ As formulações de PPC genéricas avaliadas neste trabalho, comercializadas no mercado brasileiro, foram consideradas bioequivalentes com o medicamento referência através da avaliação dermatofarmacodinâmica e dermatofarmacocinética.
- ✓ Diante disso, concluímos que se faz necessário a elaboração de um guia pela agência reguladora brasileira (ANVISA), para avaliação de medicamentos tópicos de ação local, determinando a obrigatoriedade na realização de testes de bioequivalência para garantir a intercambialidade entre medicamento referência e genéricos.

REFERÊNCIAS

ACOFARMA, 2000. Disponível em: <
http://www.acofarma.com/admin/uploads/descarga/2347db46ea26298dc6b9d21ed0c120fdd3567532b3/main/files/Betametasona%20valerato_pt.pdf >. Acesso em: 06 de março de 2018.

ACOFARMA, 2000. Disponível em: <
http://www.acofarma.com/admin/uploads/descarga/2628-0256fe83f6094c96d6e0db97d5f237c8a7edb497/main/files/Hidrocortisona%20acetato_pt.pdf >. Acesso em: 06 de março de 2018.

ADCOCK, I. M.; BARNES, P. J. Corticosteroid effects on cell signalling. **European Respiratory Journal**, v. 27, p. 413 - 426, 2006.

ADEYEYE, M. C et al. Viscoelastic evaluation of topical creams containing microcrystalline cellulose/sodium carboxymethyl cellulose as stabilizer. **American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech**, v. 3, p. 16 - 25, 2002.

ANDERSEN, F. M.; BUNDGAARD, H. The influence of cyclodextrin complexation on stability of betamethasone-17-valerate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 20, p.155 - 162, 1984.

ANDERSON, R. L.; CASSIDY, J. M. Variations in physical dimensions and chemical composition of human stratum corneum. **Journal of Investigative Dermatology**. v. 61, p. 30 - 32, 1973.

ANDERSON, B. D.; TAPHOUSE, V. Initial rate studies of hydrolysis and acyl migration in methylprednisolone 21- hemisuccinate and 17- hemisuccinate. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 70, p.181 - 186, 1981.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. Volume II. 5. ed. São Paulo: Atheneu; 2010a. Disponível em <http://farmacopeia.org.br/>.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 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**, 2010b.

ANVISA. 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.

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

ANVISA. 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.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 166, 24 de julho de 2017. Dispõe a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 2017.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Lei n. 9787, de 10 de fevereiro de 1999b**. Altera a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências. Disponível em: < <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/legis/leis/9787.htm> >. Acesso em: 09 de janeiro de 2018.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia nº 20/2019 versão 1, Sobre requisitos de qualidade para o registro de produtos tópicos e transdérmicos. Brasil, **Diário Oficial da União**, 2019a.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta pública nº 758, de 19 de Dezembro de 2019. Brasil, **Diário Oficial da União**, 2019b.

ARAÚJO, T. P. **Bioequivalência tópica de produtos contendo metronidazol através da dermatofarmacocinética (DPK)**. 2016. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

ARAÚJO, T.P. *et al.* Topical bio(in)equivalence of metronidazole formulations *in vivo*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 541, p. 167 - 172, 2018.

AU, W. L.; SKINNER, M.; KANFER, I. Bioequivalence assessment of topical clobetasol propionato products using visual and Chromametric assessment of skin blanching. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 1, p. 160 - 166, 2008.

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. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 1, p. 11 - 20, 2010.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas. In: Dissolução e solubilidade**. 2 ed. Porto alegre: Artmed, 2005. 677p.

BARONI, A. et al. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clinics in Dermatology**., 30, 257 - 262, 2012.

BAXTER, J. D. Minimizing the side effects of glucocorticoid therapy. **Advances in internal medicine**. v. 35, p. 173 - 194, 1990.

BECELLI, L.M.; CURBAN, G.V. **Compêndio de Dermatologia**. São Paulo. Atheneu Editora, Lepra, v. 30, n. 3, p. 132-163, 1988.

BOARDMAN, C.; CHACHI, L.; GAVRILA, A.; KEENAN, C.R.; PERRY, M.M.; XIA, Y.C.; MEURS, H.; SHARMA, P. Mechanisms of glucocorticoid action and insensitivity in airways disease. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**. v. 29, p. 129 -143, 2014.

BOIX-MONTANES, A. Relevance of equivalence assessment of topical products based on the dermatopharmacokinetics approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 3, 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). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 2, p. 193 - 197, 2010.

BORGHETTI, G. S.; KNORST, M. T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 4, p. 532 - 537, 2006.

BRADDY, A. C.; Davit, B. M.; Stier, E. M.; Conner, D. P. Survey of International Regulatory Bioequivalence Recommendations for Approval of Generic Topical Dermatological Drug Products. **Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**. v. 17, n. 1, p. 121 - 133, 2014.

BREGNI, C.; CHIAPPETTA, D.; FAIDEN, N.; CARLUCCI, A.; GARCIA, R.; PASQUALI, R. Estudo de liberação de diclofenaco a partir de novos géis carbómeros. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, n. 1, p. 12 - 16, 2008.

BUNDGAARD, H.; HANSEN, J. Studies on the stability of corticosteroids. VI. Kinetics of the arrangement of betamethasone-17-valerate to the 21-valerate ester in aqueous solution. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 7, p.197 - 203, 1981.

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

CASPERS, P. J.; LUCASSEN, G. W.; CARTER, E. A.; BRUINING, H. A.; PUPPELS, G. J. *In vivo* confocal Raman microspectroscopy of the skin: noninvasive determination of molecular concentration profiles. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 116, p. 434 - 442, 2001.

CHABASSOL, A.; GREEN, P. Topical Corticosteroid Therapy: What You Need to Know. **The Canadian Journal of Diagnosis**, v. 2, n. 2, p. 61 - 63, 2012.

CHAGAS, S. C. C. **Bioequivalência de medicamentos para administração tópica: mupirocina pomada**. 2018. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

CHAGAS, S.C.C. *et al.* Mupirocin ointments: *In vitro* x *In vivo* bioequivalence evaluation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. 2020. No prelo.

CHAN, S. Y.; PO, A. L. W. Quantitative assessment of non-steroidal anti-inflammatory topical products in nicotinate-induced erythema using tristimulus colour analysis. **The International Journal of Pharmaceutics**, v. 83, p. 73 - 86, 1992.

CHANG, R. K.; RAW, A.; LIONBERGER, R.; YU, L. Generic Development of Topical Dermatologic Products: Formulation Development, Process Development, and Testing of Topical Dermatologic Products. **Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 15, n. 1, p. 41 - 52, 2012.

CHEONG, L.W.; HENG, P. W.; WONG, L. F. Relationship between polymer viscosity and drug release from a matrix system. **Pharmaceutical Research**, v. 9, p. 1510 - 1514, 1992.

CHI, S. C.; JUN, H. W. Release rates of ketoprofen from poloxamer gels in a membrane less diffusion cell. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 80, n. 3, p. 280 - 283, 1991.

CHIEN, Y.W. **Novel drug delivery systems**. 2 ed. New York: Marcel Dekker, v.50. 1992.

CHORILLI, M.; ZAGUE, V.; SCARPA, M. V.; LEONARDI, G. R. Influência da viscosidade do veículo na liberação *in vitro* da cafeína. **Revista Brasileira Farmácia**, v. 4, n. 1, p. 52 - 60, 2007.

CHRISTIANSEN J. V.; FOGED E.; HOLM, P. The treatment of psoriasis with 0.1% domoprednate (a D-homocorticosteroid) and 0,1% betamethasone valerate ointment. A doubleblind, randomized trial. **Dermatologica**, v. 170, p. 195 - 198, 1985.

CILURZO, F., MINGHETTI, P. & AND SINICO, C.. Newborn Pig Skin as Model Membrane in *In Vitro* Drug Permeation Studies: A Technical Note. **American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech**, v. 8, n. 4, 2007.

CORDERY, S. F. *et al.* Topical bioavailability of diclofenac from locally-acting, dermatological formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 529, n. 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. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 117, p. 101 - 112, 1995.

CORRÊA, N. M.; CAMARGO JÚNIOR, F. B.; IGNÁCIO, R. F.; LEONARDI, G. R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 73 - 78, 2005.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.13, p.123 - 133, 2001.

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

DAVIS, S. S.; KHANDERIA, M. Viscoelastic properties of pharmaceutical semi-solids: characterization of the Plastibases for bioavailability studies. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 176, p.177, 1972.

DUARTE, M. L. **Bioequivalência tópica após dose múltipla de produtos contendo metronidazol através da dermatofarmacocinética (DPK)**. 2017. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

FREITAS, Z. M. F. *et al.* Development and characterization of ketoconazole cream to treat superficial mycoses: *in vitro* permeation and *in vivo* retention studies. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 34, n. 7, p. 1304 - 10, 2015.

DI MAMBRO, V. M.; FONSECA, M. J. V. Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, n. 2, p. 287 - 95, 2005.

EMA. **European Medicine Agency**. Draft guideline on quality and equivalence of topical products. 2018.

FANG, J. *et al.* Evaluation of topical application of clobetasol 17-propionate from various cream bases. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, p. 7-14, 1999.

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

FDA. **Pharmacopeia and National Formulary USP40-NF35**. Rockville: United States Pharmacopeia Convention; 2017.

FDA. Guidance for industry. **Topical dermatologic corticosteroids: *In vivo* bioequivalence**. Rockville: Food and drug administration. Center for drug evaluation and research (CDER), 1995. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatory%20Information/Guidances/ucm070234.pdf>. Acesso em: 05 de outubro de 2017.

FDA. Guidance for industry. **Nonsterile semisolid dosage forms, scale-up and postapproval changes: Chemistry, manufacturing, and controls; *in vitro* release testing and *in vivo* bioequivalence documentation**. Rockville: Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 1997.

FDA. **Draft guidance for industry on topical dermatological drug product NDAs and ANDAs - *In vivo* bioavailability, bioequivalence, *in vitro* release, and**

associated studies. Rockville: Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 1998.

FDA. Draft guidance for industry on topical dermatological drug product ndas and andas-*in vivo* bioavailability, bioequivalence, *in vitro* release and associated studies; withdrawal. Rockville: Food and Drug Administration. Center of Drug Evaluation and Research (CDER), 2002.

FDA. Draft guidance on acyclovir ointment, 2012. Rockville: Food and Drug Administration. Center of Drug Evaluation and Research (CDER). Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm296733.pdf>. Acesso em: 05 de outubro de 2017.

FDA. Draft guidance on acyclovir cream, 2016a. Rockville: Food and Drug Administration. Center of Drug Evaluation and Research (CDER). Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM428195.pdf>. Acesso em: 05 de outubro de 2017.

FDA. Draft guidance on cyclosporine ophthalmic emulsion, 2013. Rockville: Food and Drug Administration. Center of Drug Evaluation and Research (CDER). Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm358114.pdf>. Acesso em: 05 de outubro de 2017.

FDA. Draft Guidance on difluprednate ophthalmic emulsion, 2016b. Rockville: Food and Drug Administration. Center of Drug Evaluation and Research (CDER). Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm481813.pdf>. Acesso em: 05 de outubro de 2017.

FDA. Draft guidance on docosanol cream topical, 2017. Rockville: Food and Drug Administration. Center of Drug Evaluation and Research (CDER). Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM572999.pdf>. Acesso em: 05 de outubro de 2017b.

FERNÁNDEZ-CAMPOS, F.; OBACH, M.; MORENO, M. C.; GARCÍA, A.; GONZÁLEZ, J. Pharmaceutical development of a generic corticoid semisolid formulation. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. v. 42, p. 227 - 236, 2017.

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

FINAMOR, L. P.; FINAMOR JR, F.; MUCCIOLI, C. Corticosteroid therapy and uveitis. *Arquivos brasileiros de oftalmologia*, v. 65, n. 4, 2002.

FISHER, A. C. Advancing pharmaceutical quality: An overview of science and research in the U.S. FDA's Office of Pharmaceutical Quality. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 515, n. 1, p. 390 - 402, 2016.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. Farmacologia clínica: **Fundamentos da Terapêutica Racional**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 194 - 201, 1998.

GARDI, R. VITALI, R. ERCOLI, A. Derivati di condensazione nelle catena laterale di corticosteroidi. Nota 111. Preparazione e reazioni dei 17-monoesteri. **Gazzetta Chimica Italiana**, v. 93, p. 431- 450, 1963.

GERSTEIN, M.B., KUNDAJE, A., HARIHARAN, M., LANDT, S.G., YAN, K.K., CHENG, C., MU, X.J., KHURANA, E., ROZOWSKY, J., ALEXANDER, R. Architecture of the human regulatory network derived from ENCODE data. **Nature**. v. 489, p. 91 - 100, 2012.

GODIN, B., TOUITOU, E.. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models. **Advanced Drug Delivery Reviews** 59 1152 - 1161, 2007.

GOODMAN; GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10 ed. Rio de Janeiro, 2005.

GORNE, R. C. *et al.* Assessment of Topical Corticosteroid Activity Using the Vasoconstriction Assay in Healthy Volunteers. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 20, p. 133 - 140, 2007.

HAIGH, J. M.; KANFER, I. Assessment of topical corticosteroid preparations: the human skin blanching assay. **The International Journal of Pharmaceutics**, v. 19, p. 245 - 262, 1984.

HÁJKOVÁ, R.; SOLICH, P.; DVORÁK, J.; SÍCHA, J. Simultaneous determination of methylparaben, propylparaben, hydrocortisone acetate and its degradation products in a topical cream by RP-HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, p. 921 - 927, 2003.

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.

HIGUCHI, T. Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointments. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 11, p. 85 - 97, 1960.

HOLMGAARD, R.; BENFELDT, E.; NIELSEN, J. B.; GATSCHELHOFFER, C.; SORENSEN, J.A.; HOFFERER, C.; BODENLENZ, M.; PIEBER, T.R.; SINNER, F. Comparison of open-flow microperfusion and microdialysis methodologies when sampling topically applied fentanyl and benzoic acid in human dermis *ex vivo*. **Pharmaceutical Research**, v. 29, p. 1808 - 1820, 2012.

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. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 528, n. 1-2, p. 253 - 267, 2017.

JACKSON, D.B.; THOMPSON, C.; MCCOMARCK, J.R.; GUIN, J.D. Bioequivalence (bioavailability) of generic topical corticosteroids. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 20, n. 5, p. 791 - 796, 1989.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, F. **Histologia Básica**. 9ª edição. Guanabara Koogan S.A. 1999.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Pele e anexos. **Histologia Básica**. V. 9, p. 303 - 309, 2004.

KADMIEL, M.; CIDLOWSKI, J. A. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, p. 518 - 530, 2013.

KANFER, I. Strategies for the Bioequivalence Assessment of Topical Dermatological Dosage Forms. **Journal Bioequivalence Available**, V. 2, p.102 - 110, 2010.

KHATTAK, S. U. R.; SHEIKH, D.; AHMAD, I.; USMANGHANI, K. Kinetics of Thermal Degradation of Betamethasone Valerate and Betamethasone Dipropionate in Different Media. **The Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 74, n. 2, p.133 - 140, 2012.

KNORST, M. T. **Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato concentrado de *Achyrocline satureioides* Lam. DC. *Compositae*. (Marcela). 1991. 228f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 1991.**

KOUNTZ, D. S.; CLARK, C. L. Safely withdrawing patients from chronic glucocorticoid therapy. **American Family Physician Journal**, v. 55, p. 521 - 525, 1997.

LAHOUD, M. H.; CAMPOS, R. Aspectos teóricos relacionados à reologia farmacêutica. **Visão Acadêmica**, v.11, n.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. **Pharmaceutical Research**. v. 34, n. 4, p. 730 - 737, 2017a.

LEAL, L. B. *et al.* Registro de medicamentos genéricos tópicos dermatológicos: cenário brasileiro e estudos para demonstração de bioequivalência. **Vigilância sanitária debate**, v. 5, n. 2, p. 3 -12, 2017b.

LEONARDI, G. R.; PRESTES, P. S.; RIGON, R. B.; CORRÊA, N. M. N.; Avaliação da estabilidade físico-química de emulsão acrescida de uréia dispersada, ou não, em propilenoglicol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 1, p. 47 - 53, 2009.

LISPECTOR, C. **O tempo**. 1 ed. Rio de Janeiro: Rocco, 2014.

LU, M.; XING, H.; CHEN, X.; XIAN, L.; JIANG, J.; YANG, T.; DING, P. Advance in bioequivalence assessment of topical dermatological products. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 6, p. 700 - 707, 2016.

MARÍN-QUINTERO, D et al. Formulation design and optimization for the improvement of nystatin-loaded lipid intravenous emulsion. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 102, p. 4015 - 4023, 2013.

MARKS, R.; BARLOW, J.W.; FUNDER, J.W. Steroid-induced vasoconstriction: glucocorticoid antagonist studies. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v. 54, p. 1075 - 1077, 1982.

MATHUR, V.; SATRAWALA, Y.; RAJPUT, M.S. Physical and chemical penetration enhancers in transdermal drug delivery system. **Asian Journal of Pharmaceutics**, v.4, n.3, p.173 - 183, 2010.

MCKENZIE, A. W.; STOUGHTON, R. B. Method of comparing percutaneous absorption of steroids. *Archives of Dermatology*, v. 86, p. 608 - 10, 1962.

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**, v.7, p. 39 - 52, 1978.

MIOLO, G.; GALLOCCHIO, F.; LEVORATO, L.; DALZOPPO, D.; GERARD M.J. BEYERSBERGEN VAN HENEGOUWEN, CAFFIERI, S. UVB photolysis of betamethasone and its esters: Characterization of photoproducts in solution, in pig skin and in drug formulations. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 96, p. 75 - 81, 2009.

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.

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: 12 de janeiro de 2018.

MYERS, W. A.; GOTTLIED, A. B.; MEASE, P. Psoriasis and psoriatic arthritis: clinical features and disease mechanisms. **Clinic in Dermatology**, n. 24, p. 438 - 447, 2006.

NALLAGUNDLA, S.; PATNALA, S.; KANFER, I. application of an optimized tape stripping method for the bioequivalence assessment of topical acyclovir creams. **The American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech**, v. 14, n. 4, p. 1567 - 1573, 2018.

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

N'DRI-STEMPFER, B; NAVIDI, W. C.; GUY, R. H.; BUNGE, A. L. Improved bioequivalence assessment of topical dermatological drug products using dermatopharmacokinetics. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 2, p. 316 - 328, 2009.

OH, KYU-SEON.; PATEL, H.; GOTTSCHALK, R. A.; LEE, W. S.; BAEK, S.; FRASER, L. D.C.; HAGER, G. L.; SUNG, MYONG-HEE. Anti-Inflammatory Chromatinscape Suggests Alternative Mechanisms of Glucocorticoid Receptor Action. **Immunity**, v. 47, n. 2, p. 298 - 309, 2017.

OLSEN, E.A. A double-blind controlled comparison of generic and trade-name topical steroids using the vasoconstriction assay. **Archives of Dermatology**, v. 127, n. 2, p. 197 - 201, 1991.

PARFITT, N. M; SKINNER, M. B. C; KANFER, I. Bioequivalence of topical clotrimazole formulations: na improved tape stripping method. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 3, p. 347 - 357, 2011.

PARKER, J.; PARKER, P. **Betamethasone – A Medical Dictionary**, Bibliography and Annotated Research Guide to Internet References, ICON Health Publications, San Diego, 2004.

PERRENO, B.; WIDMANN, G. Polymorphism by differential scanning calorimetry, **Thermochimica Acta**, v. 234, p. 31 - 39, 1994.

PERSHING, L. K. *et al.* Feasibility of measuring the bioavailability of topical betamethasone dipropionate in commercial formulations using drug content in skin and a skin blanching bioassay. **Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 1, p. 45 - 51, 1992.

PERSHING, L. K. *et al.* Comparison of skin stripping, *in vitro* release, and skin blanching response methods to measure dose response and similarity of triamcinolone acetonide cream strengths from two manufactured sources. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, p. 1312 - 1323, 2002.

PERSHING, L. K. *et al.* Assessment of dermatopharmacokinetic approach in the bioequivalence determination of topical tretinoin gel products. **The Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 48, n. 5, p. 740 - 751, 2003.

POELMAN, M. C.; PIOT B, GUYON F. Assessment of topical non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 41, p. 720 - 722, 1989.

PONEC, M.; POLANO, M.K. Penetration of various corticosteroids through epidermis *in vitro*. **Archives of Dermatological Research**. v. 265, p. 101-104, 1979.

PONEC, M.; KEMPENAAR, J.A.; DE KLOET, E.R. Corticoids and cultured human epidermal keratinocytes: specific intracellular binding and clinical efficacy. **Journal of Investigative Dermatology**. v. 76, p. 211 - 214, 1981.

PONEC, M. Glucocorticoid receptors, in: H.C. Korting, H.I. Maibach (Eds.), *Topical Glucocorticoids with Increased Benefit/Risk Ratio*, Karger, Basel, p. 20 - 28, 1993.

PUBCHEM, 2020. Disponível em:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16533#section=NLM-Curated-PubMed-Citations>. Acesso em: 12 de dezembro de 2019.

PUBCHEM, 2020. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5744>. Acesso em: 12 de dezembro de 2019.

PUBCHEM, 2020. Disponível em:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/32798>. Acesso em: 12 de dezembro de 2019.

RAFIEE-TEHFANI, M.; MEHRAMIZI, A. *In vitro* release studies of piroxicam from oil-in-water creams and hydroalcoholic gel topical formulations. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, n. 4, p. 409 - 414, 2000.

RAGHAVAN, S. L. KIEPFER, B. DAVIS, A. F. KAZARIAN, S. G. HADGRAFT, J. Membrane transport of hydrocortisone acetate from supersaturated solutions; the role of polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, p. 95 - 105, 2001.

RAGHAVAN, S.L.; TRIVIDIC, A.; DAVIS, A. F.; HADGRAFT, J. Effect of cellulose polymers on supersaturation and *in vitro* membrane transport of hydrocortisone acetate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 193, p. 231 - 237, 2000.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. AND FLOWER, R. J. (2007) *Farmacologia*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

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.

SCHNETZ, E.; FARTASCH, M. Microdialysis for the evaluation of penetration through the human skin barrier - a promising tool for future research? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, p. 165 - 174, 2001.

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

SHAH, V. P.; PECK, C. C.; SKELLY, J. P. Vasoconstriction - skin blanching - assay for glucocorticoids - a critique. **Archives of Dermatology**, v. 125, p. 1558 - 1561, 1989.

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

SHAH, V. P. *et al.* A science based approach to topical drug classification system (SCPT). **The International Journal of Pharmaceutics**, v. 491, n.1, p. 21 - 25, 2015.

SHAH, V. P. *et al.* Bioequivalence of topical dermatological dosage forms-methods of evaluation of bioequivalence. **Skin Pharmacology and Physiology**, v.11, n. 2, p. 117 - 24, 1998.

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.

SHERIDAN, R.L.; TOMPKINS, R.G. Skin substitutes in burns. **Burns**, v. 25, n. 2, p. 97-103, 1999.

SINGH, G. J. P.; ADAMS, W. P.; LESKO, L. J. Development of *in vivo* bioequivalence methodology for dermatologic corticosteroids based on pharmacodynamics modeling. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 66, p. 346 - 57, 1999.

SMITH, E. W.; HAIGH, J. M.; KANFER, I. A stability-indicating HPLC assay with on-line clean-up for betamethasone 17-valerate in topical dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 27, p.185 - 192, 1985.

SMITH, E. W.; HAIGHB, J. M.; SURBERC, C. Quantification of Corticosteroid-Induced Skin Vasoconstriction: Visual Ranking, Chromameter Measurement or Digital Imaging Analysis. **Dermatology**, v. 205, p. 3 - 10, 2002.

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

SOARES, K. C. C.; MORAES, M. V.; GELFUSO, G. M.; GRATINIERI, T. Bioequivalence of dermatological topical medicines: the brazilian scenario and the challenges for health surveillance. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 20, n. 11, p. 3599 - 360, 2015.

SOLON, L. G. S.; LIMA, I. P. B.; NOGUEIRA, F. H. A.; ARAÚJO, J. P.; VIVACQUA, C. A.; ARAGÃO, C. F. S. Development and validation of an UHPLC method for the determination of betamethasone valerate in cream, gel, ointment and lotion. **Steroids**, v. 106, p. 70 - 77, 2016.

SPARIDANS, R. W.; VAN VELSEN, S. G. A.; DE ROOS, M. P.; SCHELLENS, J. H. M.; BRUIJNZEEL-KOOMEN, C. A. F. M.; BEIJNEN, J. H. Liquid chromatography–tandem mass spectrometric assay for clobetasol propionate in human serum from patients with atopic dermatitis. *Journal of Chromatography B*, v. 878, n. 23, p. 2150 - 2154, 2010.

STOUGHTON, R.B. Are generic formulations equivalent to trade name topical glucocorticoids? **Archives of Dermatology**, v. 123, n. 10, p. 1312, 1987.

SVENSSON, A.; REIDHAV, I.; GISSLÉN, H.; NORDIN, P.; GIOS, I. A comparative study of mometasone furoate ointment and betamethasone valerate ointment in patients with psoriasis vulgaris. **Current therapeutic research**, v. 52, n. 3, 1992.

TEMPARK, T.; PHATARAKIJNIRUND, V.; CHATPROEDPRAI, S.; WATCHARASINDHU, S.; SUPORNILCHAI, V.; WANANUKUL, S. Exogenous Cushing's syndrome due to topical corticosteroid application: case report and review literature. **Endocrine**, v. 38, n. 3, p. 328 - 34, 2010.

THOMPSON, J. E.; DAVIDOW, L. W. **A prática farmacêutica na manipulação de medicamentos**. 3ed. Porto Alegre: Artmed; 2016. 752p.

TIFFNER, K. I. *et al.* A Comprehensive Approach to Qualify and Validate the Essential Parameters of an *In Vitro* Release Test (IVRT) Method for Acyclovir Cream, 5%. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 535, n. 1 - 2, p. 217 - 227, 2018.

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

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, p. 305 - 333, 2006.

VITTALI, R. GARDI, R. Hydrolysis of corticosteroid 17.21-alkylorthoesters in buffered medium. An improved synthesis of 17-monoesters. *II Farmaco. Ed. Sci*, v. 27 p. 818 - 828, 1972.

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.

WESTER, R. C. MAIBACH, H. I. *In vitro* testing of topical pharmaceutical formulations. In: BRONAUGH, R. L., MAIBACH, H. I. **Percutaneous absorption**

(Mechanisms, Methodology, Drug Delivery), New York: Marcel Dekker, p.653 - 659, 1989.

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

WIEDERSBERG, S.; LEOPOLD C. S, GUY, R. H. Bioavailability and bioequivalence of topical glucocorticoids. **European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 3, p. 453 - 466, 2008.

WIEDERSBERG, S.; LEOPOLD C.S.; GUY, R.H. Dermatopharmacokinetics of betamethasone 17-valerate: influence of formulation viscosity and skin surface cleaning procedure. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 2, p. 362 - 366, 2009.

WICKETT, R. R.; VISSCHER, M. O. Structure and function of the epidermal barrier. **American Journal of Infection Control**, v. 34, n. 10, p. 98 - 110, 2015.

WILLIAMS, H. C. **Atopic Dermatitis**. The New England Journal of Medicine. v. 352, n. 22, p. 2314 - 2324, 2005.

YACOBI, A. et al. Current challenges in bioequivalence, quality, and novel assessment technologies for topical products. **Pharmaceutical Research**, v. 31, p. 837- 846, 2014.

YANO, T.; NODA, K. Skin permeability of various nonsteroidal anti-inflammatory drugs in man. **Life Sciences**, v. 39, p. 1043 - 1050, 1986.

YIP, Y. W.; LI WAN PO, A.; IRWIN, W. J. Kinetics of decomposition and formulation of hydrocortisone butyrate in semiaqueous and gel systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 72, p. 776 - 781, 1983.

YIP, Y.W. LI WAN PO, A. The stability of betamethasone-17-valerate in semi-solid bases. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 31, p. 400 - 402, 1979.

APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO NO LATIN AMERICAN JOURNAL OF PHARMACY



Latin American Journal of Pharmacy
(formerly Acta Farmacéutica Bonaerense)
Lat. Am. J. Pharm. **38** (6): 1122-9 (2019)

Received: February 17, 2018
Revised version: March 25, 2019

Accepted: March 27, 2019

Topical Bioequivalence: Evaluation of Hydrocortisone Acetate, Betamethasone Valerate and Mupirocin Marketed Brazilian Products

Isabelle M.F.S.D. CAVALCANTI *, Stephanye C.C. CHAGAS,
Giovana D. SOUSA, Irla C.F. BARBOSA, Davi P. SANTANA & Leila B. LEAL

Federal University of Pernambuco, Department of Pharmaceutical Sciences,
CEP: 50740-521, Recife-PE, Brazil.

SUMMARY. The therapeutic equivalence of a topical drug product compared to the reference can be promoted through several strategies including the qualitative (Q1) and quantitative similarity (Q2) of excipients as well as the similarity of the formulation's microstructure (Q3). If Q1 and Q2 are the same, the only concerns are potential Q3 differences due to the manufacturing process. *In vitro* release tests (IVRT) are the best method for evaluating manufacturing quality, and *in vivo* testing could likely be waived based on the *in vitro* results. Considering this information, and regarding the Topical Drug Classification System (TCS), in this work, topical Brazilian formulations containing hydrocortisone acetate (HDA), betamethasone valerate (BMV), and mupirocin (MPC) were evaluated through pharmaceutical equivalence tests (PE) described in Brazilian RDC nº 31/2010 or following the TCS and Scale-Up and Post Approval Change Semisolids (SUPAC-SS) 1724 guide for the IVRT methodology. The results demonstrated that when following the PE or IVRT, among seven tested products each, only five brand name items and three generics were considered pharmaceutically equivalent. Considering these results, and based on draft topical formulations, we conclude that depending on the TCS classification, PE and IVRT are not enough to establish the bioequivalence, and therefore, *in vivo* dermatopharmacokinetic and blanching assays should be conducted to corroborate these results.

RESUMEN. La equivalencia terapéutica de un producto farmacológico tópico en comparación con la referencia se puede promover mediante varias estrategias que incluyen la similitud cualitativa (Q1) y cuantitativa (Q2) de los excipientes, así como la similitud de la microestructura de la formulación (Q3). Si Q1 y Q2 son iguales, las únicas preocupaciones son las posibles diferencias de Q3 debido al proceso de fabricación. Las pruebas de liberación *in vitro* (IVRT, por sus siglas en inglés) son el mejor método para evaluar la calidad de fabricación, y es probable que las pruebas *in vivo* se suspendan según los resultados *in vitro*. Teniendo en cuenta esta información, y con respecto al Sistema de Clasificación de Medicamentos Tópicos (TCS), en este trabajo, las formulaciones tópicas brasileñas que contienen acetato de hidrocortisona (HDA), valerato de betametasona (BMV) y mupirocina (MPC) se evaluaron mediante pruebas de equivalencia farmacéutica (PE) descritas en RDC brasileño nº 31/2010 o siguiendo la guía 1724 de TCS y Semisólidos de cambio de escala y post aprobación (SUPAC-SS) para la metodología IVRT. Los resultados demostraron que al seguir el PE o IVRT, entre siete productos probados cada uno, sólo cinco artículos de marca y tres genéricos se consideraron farmacéuticamente equivalentes. Teniendo en cuenta estos resultados, y basados en proyectos de formulaciones tópicos, llegamos a la conclusión de que, dependiendo de la clasificación de TCS, PE y IVRT no son suficientes para establecer la bioequivalencia y, por lo tanto, se deben realizar ensayos *in vivo* de dermatofarmacocinética y blanqueamiento para corroborar estos resultados.

INTRODUCTION

Drugs can be delivered topically from new or conventional pharmaceutical forms, such as creams and ointments; however, their excipients, manufacturing process, and critical quality

attributes (CQAs) can individually and collectively significantly influence the drug release and, consequently, the therapeutic effect. As such, using reverse-engineering to copy the reference listed drug (RLD) during the develop-

KEY WORDS: blanching assays, dermatopharmacokinetic, *in vitro* release test, topical bioequivalence, topical drug classification system.

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: isabelle.fittipaldi@hotmail.com

ment of generic products is imperative. This strategy guarantees the qualitative (Q1) and quantitative (Q2) formulation similarity, as well as similarity in formulation microstructure (Q3)^{1,2}. Thus, according to the proposed topical TSC, the formulations can be classified in class 1 (Q1, Q2 same and Q3 same), class 2 (Q1, Q2 same and Q3 different), class 3 (Q1, Q2 different, and Q3 same) and class 4 (Q1, Q2 different, and Q3 different)³.

Internationally, the traditional expensive and time-consuming clinical studies of efficacy are the only accepted method to demonstrate the bioequivalence of products for topical application and local action, except for corticosteroids, whose pharmacodynamic evaluation (skin blanching assay) is recommended and accepted⁴⁻⁷. Even so, the scientific communities are working hard to change this requirement. As a consequence, some different draft guides to evaluate topical formulations containing acyclovir ointments, acyclovir cream, cyclosporine emulsion, and docosanol cream, for example, have been published, describing the use of IVRT associated with physicochemical characterization as an alternative method to avoid the clinical studies⁸⁻¹¹.

In Brazil, according to the Resolution RDC N° 37/2011 (a guide for exemption and substitution of studies of relative bioavailability/bioequivalence), the bioequivalence assessment of the topical product is permitted to be replaced by pharmaceutical equivalence tests (described in the Resolution RDC N° 31/2010), provided that the test product exhibits the same concentration of drug relative to the reference product and excipients of the same function, in comparable concentrations^{12,13}. These tests involve the physical-chemical and microbiological characterization of the formulation and provide important information regarding the quality attributes of the tested medicines¹⁴. Microbiological tests are not useful in the comparison of these products, and Brazil is the only country in the world to require them for this purpose.

Additionally, the Resolution RDC N° 73/2016 (post-registration changes, cancellation of registration of medicines with synthetic and semi-synthetic drug), requires comparative *in vitro* performance testing only between the currently approved formulation and the proposed one according to the General Chapter of the American Pharmacopoeia (General Chapters 1724: Semisolid Drug Products Performance tests-SU-

PAC-SS 1724)¹⁵. It is important to note that these candidate generic and similar products weren't compared with the reference product using performance tests at the moment of their registration.

Based on the issues described above, the main experimental goal of this work was to compare different generic and/or similar hydrocortisone acetate (HDA), betamethasone valerate (BMV) and mupirocin (MPC) Brazilian market products to their RLD by the proposed Brazilian RDC N° 37/2011 (except microbiological), RDC N° 73/2016, and SUPAC-SS 1724 tests as well as to discuss the other tests published recently and the TSC proposal^{13,15,16}.

MATERIALS AND METHODS

Instruments

The following equipment were used to perform this work: Hanna® pH21 pH meter; pycnometer with a capacity of at least 5 mL; glasses plate with calibrated weight values; Rheology International Digital Viscometer; HPLC-UV (Nexera X2, Shimadzu, Japan); Franz cells (Microette®).

All solvents were analytical grade. The standards for HDA and BMV were purchased from Sigma-Aldrich (hydrocortisone acetate, lot n° 14518/2015, drug content 99,6 % and betamethasone valerate, lot n° BV151203, drug content 99,6 %). MPC (lot n° 13508/2015, drug content 99,6%) was donated by Cristália Pharmaceutical Chemicals Ltd.

Formulations

Topical dermatological formulations were purchased in the Brazilian market and are described in Tables 1-3; excipient function was taken from the Handbook Excipients of Pharmaceutical¹⁷.

Physicochemical tests

The appearance, odor, and color of each product were evaluated¹⁸. The pH of six replicates of formulations was analyzed by Hanna® pH21 pH meter, previously calibrated with buffer solutions pH 7.0 and pH 4.0, at ambient temperature¹⁹.

The density was determined with a pycnometer with a capacity of at least 5 mL¹⁹.

The spreadability was evaluated in six replicates using the method adapted from Borghetti & Knorst²⁰, where 0.5 g from each formulation was applied to a glass plate placed on graph

CAVALCANTI I.M.F.S.D., CHAGAS S.C.C., SOUSA G.D., BARBOSA I.C.F., SANTANA D.P. & LEAL L.B.

Function	Berlison®	Generic A	Generic B
Emulsifying agent	Stearyl alcohol Polyoxyl 40 Stearate	Non-ionic emulsifying wax -----	Emulsifying wax Stearic acid
Emollient	Liquid petrolatum White petrolatum	Liquid petrolatum Isopropyl myristate	Isopropyl myristate Dimethicone
Humectant	-----	Propylene glycol	Propylene glycol
Surfactant	-----	Polysorbate 80	-----
Stabilizing agent	Carbomer	-----	-----
Alkalinizing agent	Sodium hydroxide	Sodium hydroxide	-----
Chelating agent	Edetate sodium	Edetate sodium	Edetate disodium dihydrate
Preservative	Methylparaben Propylparaben	Methylparaben Propylparaben	Methylparaben Propylparaben
Antioxidant	-----	Butylhydroxytoluene	Butylhydroxytoluene
Buffer agent	-----	-----	Dibasic sodium phosphate
Acidifying agent	-----	-----	Citric acid
Vehicle	Purified water	Reverse osmosis water	Purified water

Table 1. Components of HDA formulations. Berlison® - Cream 10 mg/g Lot: YY0115N Maker: Bayer AG; Generic A - Cream 10 mg/g Lot: 3293028; Generic B - Cream 10 mg/g Lot: L1534176.

Function	Betnovate®	Generic A	Generic B
Emulsifying agent	Cetostearyl alcohol Cetomacrogol	Cetostearyl alcohol	Polawax
Emollient	Liquid paraffin White vaseline	White petrolatum	White petrolatum
Humectant	-----	Caprylic-Capric acid triglyceride	Propylene glycol
Surfactant	-----	Polysorbate 60 Sorbitan stearate	-----
Alkalinizing agent	Sodium hydroxide	-----	-----
Chelating agent	-----	-----	Edetate disodium
Preservative	Chlorocresol	Benzilic alcohol	Methylparaben Propylparaben
Buffer agent	Monosodium phosphate	Sodium phosphate monobasic monohydrate	Sodium metabisulphite
Acidifying agent	Phosphoric acid	-----	-----
Vehicle	Purified water	Purified water	Purified water

Table 2. Components of BMV formulations. Betnovate® - Cream 1 mg/g Lot: UM0078V Maker: GSK, Glaxo-SmithKline; Generic C - Cream 1 mg/g Lot: L16020784; Generic D - Cream 1 mg/g Lot: LB16E0242.

Function	Bactroban®	Generic E	Generic F	Similar
Ointment base	Polyethylene glycol	Macrogol 400	Macrogol 400	Macrogol (polyethylene glycol)

Table 3. Components of MPC formulations. Note: Bactroban®- Ointment 20 mg/g Lot: VJ0271V Maker: GSK, GlaxoSmithKline. Generic E - Ointment 20 mg/g Lot:16075180. Generic F - Ointment 20 mg/g Lot: 16C99P. Similar - Ointment 20 mg/g Lot: 00117863.

paper, and a glass plate of known weight was placed on the sample. After one minute of spreading, the diameter was measured in opposite directions and the mean diameter was calculated. Subsequently, the same procedure was repeated up to a total of 5 plates. The results were expressed as spreadability of the sample as a function of the applied weight ^{20,21}.

The viscosity and rheological properties of the formulations were determined at ambient temperature using the Rheology International Digital Viscometer. The apparent viscosity was determined using spindle 6 with rotation of 30 rpm for the formulations containing HDA and BMV and using spindle 7 with the same rotation speed for formulations containing MPC.

In the Brazilian Pharmacopoeia 5th edition (Brazilian Pharmacopoeia, 2010) ¹⁹ there are no monographs for HDA, BMV and MUP, so the assay methodology used for the HDA and BMV were based on the American Pharmacopoeia (USP, 2007), and the British Pharmacopoeia methodology (British Pharmacopoeia, 2008) was used for MPC ^{22,23}.

In vitro release test (IVRT)

IVRT were performed using automated Franz cells (Microette®). Diffusion area was 1.77 cm²; 200 ± 1 mg of each preparation was applied. Cellulose acetate (Millipore®) membranes with porosity of 0.45 m (lot: R5PA87384) were used and were hydrated for 12 hours in receptor medium (phosphate buffer pH 7.4 + Brij 20 0.5% for HDA and BMV, and phosphate buffer pH 7.4 for MPC) before use. The receptor compartment had a capacity of 6 ± 0.2 mL and the receptor medium was maintained at 32 ± 1 °C under constant stirring. 1 mL of receptor solution was withdrawn, and the same volume was replaced with the fresh solution at the following times: 4, 6, 8, 10, and 12 h for HDA and BMV, and 10, 20, 30, 40, 50, and 60 min for MPC.

The *in vitro* release rates among the formulations were compared according to the SUPAC-SS 1724 guide; for the test product to be equivalent to the reference the confidence interval must be 75-133.33% ^{4,15}.

HDA, BMV, and MPC were analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC-UV), using the methods described by Hájková *et al.* ²⁴, Wiedersberg *et al.* ²⁵ and Echevarría *et al.* ²⁶, respectively.

Statistical analysis

The results were expressed as means ± SD of at least three values. Data were analyzed by one-way analysis of variance. Statistical significance was fixed at $p < 0.05$.

RESULTS

Formulations

Based on Tables 1-3, it is interesting to note that only the MPC formulations could be considered Q1 and possibly Q2 with the reference product, confirming that for the Brazilian industry it is not mandatory to maintain the similarity of excipients with generic products.

Physicochemical tests

All generic and similar formulations of the three drugs studied had the color and odor of their corresponding reference product.

The pH, drug content, apparent viscosity, and density results of each tested product are shown in Table 4. The density and pH differences between reference and generic/similar formulations were not statistically significant ($P < 0.05$). In relation to the content of the drugs, as expected, the formulations were within the limits recommended by their respective monographs, except for HDA generic A and the similar product containing MPC ^{22,23}, probably due to problems in storage and/or product transportation.

Additional information on spreadability and rheological behavior of the formulations is shown in Figs. 1- 3.

In vitro release Test (IVRT)

The comparative statistical evaluation of the release rates demonstrated that all HDA gener-

CAVALCANTI I.M.F.S.D., CHAGAS S.C.C., SOUSA G.D., BARBOSA I.C.F., SANTANA D.P. & LEAL L.B.

Drug	Formulations	pH	Drug Content (%)	Apparent Viscosity (Pa.S)	Density (g/cm ³)
HDA	Berlison®	5.65 ± 0.03	95 ± 0.01	37.32 ± 0.42	0.99 ± 0.01
	Generic A	5.57 ± 0.03	84 ± 0.07	16.05 ± 0.48	1.02 ± 0.003
	Generic B	4.18 ± 0.01	94 ± 0.01	7.12 ± 0.09	0.99 ± 0.003
BMV	Betnovate®	4.78 ± 0.01	107 ± 0.01	14.56 ± 0.18	0.99 ± 0.003
	Generic C	3.77 ± 0.01	106 ± 0.01	16.48 ± 0.33	1.00 ± 0.003
	Generic D	4.42 ± 0.02	107 ± 0.01	15.10 ± 0.42	1.01 ± 0.003
MPC	Bactroban®	7.46 ± 0.06	114 ± 0.56	61.32 ± 4.24	1.18 ± 0.01
	Generic E	6.39 ± 0.06	107 ± 0.09	123.12 ± 2.38	1.17 ± 0.01
	Generic F	7.81 ± 0.06	91 ± 0.27	45.94 ± 4.17	1.17 ± 0.01
	Similar	7.76 ± 0.04	84 ± 0.45	95.95 ± 0.90	1.17 ± 0.01

Table 4. Physicochemical test results of HDA, BMV and MPC.

Drug	Comparison	Limit Values of the 90% CI	Conclusion
HDA	Berlison® x Generic A	37.44 - 54.31	Not similar
	Berlison® x Generic B	51.74 - 87.18	Not similar
BMV	Betnovate® x Generic C	266.33 - 353.31	Not similar
	Betnovate® x Generic D	108.43 - 131.78	Similar
MPC	Bactroban® x Generic E	87.69 - 129.22	Similar
	Bactroban® x Generic F	75.47 - 110.10	Similar
	Bactroban® x Similar	63.00 - 84.52	Not similar

Table 5. Comparative statistical result between *in vitro* release rates for reference and test formulations.

ics, BMV generic C, and the MPC similar product were not considered equivalent to the reference product (18 replicates evaluation). However, BMV generic D and all MPC generics were considered equivalent to their reference products using only 6 replicates (Table 5).

DISCUSSION

Physicochemical tests

The organoleptic characteristics enable immediate analysis of the state of the samples in the study, allowing the primary recognition of the product and evaluation of possible alterations such as phase separation, precipitation and turbidity¹⁸.

Regarding pH, several authors have considered this parameter as an attribute of critical quality when comparing test products with their reference. The pH of the vehicle can influence the ionization state of the active ingredient, the solubility, the distribution of the drug within the microstructure (Q3), and consequently its stability and safety^{2,27,28}. The pH of the formulations evaluated were within the biological tolerance

range for cutaneous products (3.0-9.0) as well as being compatible with the stability of the active components of the products²⁹⁻³¹.

Density is a critical parameter of a semisolid formulation. Trapping air in the cream during subsequent withdrawals from the package, for example, may cause various treatments to fail. The density of the sample would influence the dose withdrawn and applied by the patient, since if the density is lower, the patient will obtain a lower dose than a high density formulation³².

Considering the rheological parameters of the formulations, it was possible to verify the flow behavior and viscosity when submitted to different shear rates. Through the analysis of the rheograms obtained, presented in Figs. 1B, 2B, and 3B, all the formulations presented a typical behavior of non-Newtonian fluids of the pseudoplastic type with thixotropy, as their viscosities gradually decreased as the shear stress increased^{33,34}.

The HDA generics creams presented a statistically significant difference in apparent viscosity

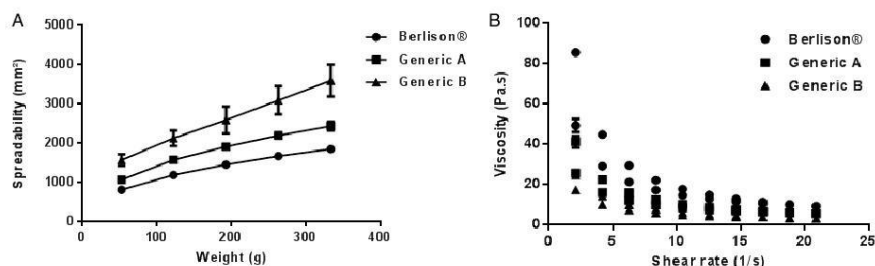


Figure 1. Spreadability (A) and rheological behavior (B) of HDA formulations.

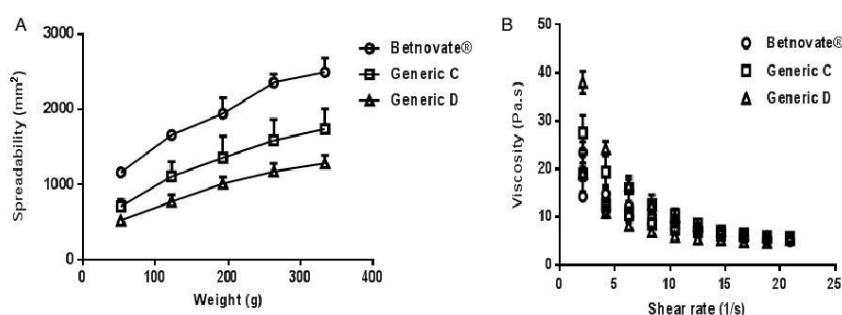


Figure 2. Spreadability (A) and rheological behavior (B) of BMV formulations.

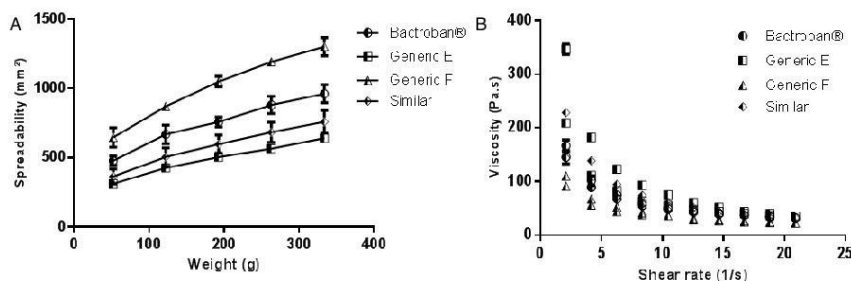


Figure 3. Spreadability (A) and rheological behavior (B) of MPC formulations.

and spreadability when compared to the RLD. This difference may be related to the presence of carbomer (a viscosity-enhancing agent) present only in the reference formulation.

The BMV generics also had a statistically significant difference in apparent viscosity and spreadability relative to their reference product. Observing the composition of the BMV formulations (Table 2), the absence of a gelling agent

and the presence of a humectant and surfactant agents in the generic formulations may account for this result.

Regarding MPC, although all the formulations presented pseudoplastic behavior and the same qualitative composition (excipients of the same function: one type or the mixture of two types of polyethylene glycols) (Table 3), they showed a statistically significant difference in

apparent viscosity and spreadability in relation to the reference product. This observation was likely because of the quantitative difference in the excipients (Q2) and/or because of different manufacturing techniques.

The viscosity results corroborate with those obtained in the spreadability where the formulations that presented greater viscosity were those that had less spreadability.

Thus, according to the pharmaceutical equivalence tests described in Brazilian legislation¹², generic A and the similar product would not be considered equivalent to their respective reference products.

In vitro release test (IVRT)

In order to verify the impact of the factors addressed in the physico-chemical tests with respect to the drug release rate of their formulation, the release profiles of the formulations were compared between the tests and reference products (Table 5, Fig. 4)^{4,14}.

Considering that HDA formulations are different Q1, Q2, and Q3 compared to Berlison®, they were included as class 4 in the TCS classification (3). Thus, the IVRT rate (as an estimator of microstructural similarity-Q3) has been useful to indicate that biowaiver should not be applied to these products. Taking these results into account, according to the FDA, clinical trials are recommended as was established for difluprednate emulsion, and the ivermectin cream draft guide for example^{35,36}.

Regarding BMV results, the comparative release rates demonstrated that the generic C and D (Q1 and Q2 different) were considered non-equivalent and equivalent compared to Betnovate®, being classified as class 4 and 3, respectively.

In relation to MPC formulations (single phase ointment), the similar product, as previously described, had a content below established values and therefore had already been considered not equivalent to the reference product. However,

generic E and F, regardless of their different viscosities compared to Bactroban®, were considered bioequivalent by using Q1, Q2, and Q3 similarity. In other words, they are class 1, thereby avoiding a clinical study according to the acyclovir ointment draft guide^{3,8}.

Concerning the results obtained, it is possible to verify that according to the performed pharmaceutical equivalence tests, generic B, C, D, E, and F were considered bioequivalent to their generic products. According to Shah *et al.*³ "The difference resides on the extended applicability of IVRT beyond the current role of supportive, not surrogate methodology in the assessment of bioequivalence." As such, if the TCS classification and the SUPAC-SS 1724 methodology to calculate IVRT rate^{4,14} were considered as the bioequivalence admission criteria, only generics D, E, and F would be accepted.

Regarding the Brazilian legislation, it may be necessary to use *in vitro* release assays (similarly to the dissolution profile for solid forms for oral use) as part of other tests that can be used to assist in the establishment of therapeutic equivalence for topically applied medicines³⁷.

CONCLUSION

Considering these results, we conclude that the Q1, Q2, and Q3 definitions are of great relevance in the development and evaluation of topical generic products. Specifically, for tested MPC formulations, physical-chemical data associated with the IVRT rate were enough to guarantee the bioequivalence. However, for HDA and BMV products, *in vivo* dermatopharmacokinetics and/or blanching assays should be conducted to confirm results. Thus, it is evident that the tests described in the Brazilian legislation (RDC 37/2011) are not enough to ensure the bioequivalence between topical drug products.

Acknowledgments. The authors thank CNPq, CAPES, FACEPE, FECDA and NUDFAC for financial support.

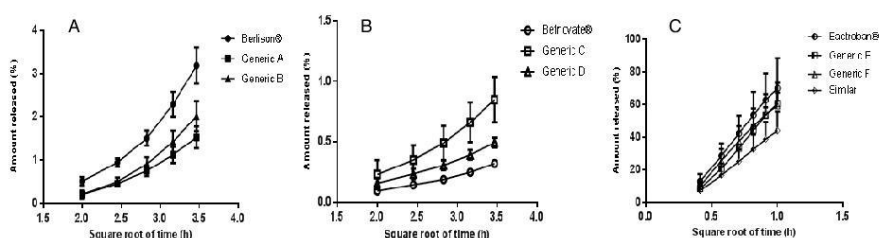


Figure 4. Release profile of the formulations containing HDA (A), BMV (B) and MPC (C).

REFERENCES

- Chang, R.K., A. Raw, R. Lionberger & L. Yu (2013) *AAPS J.* **15**: 41-52.
- Ilić, T, I. Pantelić, D. Lunter, S. Đorđević, B. Marković, D. Ranković, *et al.* (2017) *Int. J. Pharm.* **528**: 253-67.
- Shah, V.P., A. Yacobi, S.F. Radulescu, D.S. Miron & M.E. Lane (2015) *Int. J. Pharm.* **491**: 21-5.
- FDA (1997) *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*. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research.
- Shah, V.P., G.L. Flynn, A. Yacobi, H.I. Maibach, C. Bon, N.M. Fleischer, *et al.* (1998) *Pharm Res.* **15**: 167-71.
- Braddy, A.C, B.M. Davit, E.M. Stier & D.P. Conner (2015) *AAPS J.* **17**: 121-33.
- Lu, M., H. Xing, X. Chen, L. Xian, J. Jiang, T. Yang, *et al.* (2016) *Asian J. Pharmacol.* **11**: 700-7.
- US-FDA (2012) *Draft guidance on acyclovir ointment*. Food and Drug Administration, Office of Generic Drugs.
- US-FDA (2012) *Draft guidance on acyclovir cream*. Food and Drug Administration, Office of Generic Drugs.
- US-FDA (2013) *Draft guidance on cyclosporine ophthalmic emulsion*. Food and Drug Administration, Office of Generic Drugs.
- US-FDA (2017) *Draft guidance on docosanol cream topical*. Food and Drug Administration, Office of Generic Drugs.
- Brazil. Ministry of Health, National Sanitary Surveillance Agency (2010) *Resolution RDC nº 31, of August 11, 2010. Provides on the accomplishment of the Pharmaceutical Equivalence and Comparative Dissolution Profile Studies*. Brasília (DF): Ministry of Health, August 12. p 36-8.
- Brazil Ministry of Health, National Sanitary Surveillance Agency (2011) *Resolution RDC nº 37, August 03, 2011. Provides on the Guide for exemption and substitution of studies of relative bioavailability / bioequivalence and gives other measures*. Brasília (DF): Ministry of Health, August 03 2011. 13 p.
- Fisher, A.C. (2016) *Int. J. Pharm.* **515**: 390-2.
- The United States Pharmacopeia and National Formulary USP 37–NF 32 (2014) General Chapter <1724> Semisolid Drug Products - Performance Tests, pp. 1273-84.
- Brazil Ministry of Health, National Sanitary Surveillance Agency (2016) *RDC Resolution No. 73, of April 7, 2016. Provides for post-registration changes, cancellation of registration of drugs with synthetic and semi-synthetic active principles and other measures*. Brasília (DF): Ministry of Health, April 08 2016. 58 p.
- Handbook Excipients of Pharmaceutical. 6ª edição (2009) Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association.
- Brasil. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2008) *Guia para Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos*. 2 ed. Brasília (DF).
- Farmacopéia Brasileira (2010) Parte I. 5 ed. São Paulo: Atheneu.
- Borghetti, G. S. & M.T. Knorst (2006) *Braz. J. Pharm. Sci.* **42**: 532-7.
- Knorst, M.T. (1991) Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato concentrado de *Achyrocline satureioides* Lam. DC. Compositae. (Marcela). Master's dissertation. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- US Pharmacopeia and National Formulary USP30-NF25 (2007) United States Pharmacopeial Convention. Rockville.
- British Pharmacopoeia (2008) Stationery Office, London.
- Hájková, R., P. Solich, J. Dvořák & J. Šícha(2003) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **32**: 921-7.
- Wiedersberg, S., A. Naik, C.S. Leopold & R.H. Guy (2009) *Br. J. Dermatol.* **160**: 676-86.
- Echevarría, L., M.J. Blanco-Príeto, M.A. Campanero, S. Santoyo & P. Ygartua (2003) *J. Chromatogr. B* **796**: 233-41.
- Murthy, R., S. Rangappa, M.A. Repka, K. Vanaja, H.N. Shivakumar & S.N. Murthy (2017) *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **39**: 296-9.
- Shanley, A. (2016) *PharmTech*. **40**: 26-9.
- Aulton, M.E. (2005) *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed.
- Khattak, S.U.R., D. Sheikh, I. Ahmad & K. Us-manghani (2012) *Indian J. Pharm. Sci.* **74**: 133-40.
- Thompson, J.E. & L.W. Davidow (2016) *A prática farmacêutica na manipulação de medicamentos*. 3ed. Porto Alegre: Artmed.
- Corrêa, N.M., F.B. Camargo Júnior, R.F. Ignácio & G.R. Leonardi (2005) *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **41**: 73-8.
- Lahoud, M.H. & R. Campos (2010) *Visão Acadêmica* **11**: 66-73.
- Figueira, T.G. (2012) *Aplicação de pomada de ácido hialurônico extraído da crista do frango para reparo tecidual de feridas cutâneas em ratos*. Master's dissertation. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.
- US-FDA (2016) *Draft Guidance on Diflupred-nate ophthalmic emulsion*. Food and Drug Administration, Office of Generic Drugs.
- US-FDA (2017) *Draft guidance on ivermectin cream topical*. Office of Generic Drugs.
- Leal, L.B., T.P. Araújo, S.C.C. Chagas, A.R.B. Andrade, D.C.G. Bedor & D.P. Santana (2017) *Vigil. Sanit.* **5**: 3-12.

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.^a Dr.^a 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) Sr.(a) não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa que está lhe entrevistando para que o(a) Sr.(a) esteja bem esclarecido(a) sobre sua participação na pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, caso aceite em fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o(a) Sr.(a) não será penalizado(a) de forma alguma. Também garantimos que o(a) Sr.(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 na pele do seu antebraço. Em seguida, após 10 minutos e 19 horas, o(a) Sr.(a) 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 o(a) Sr(a) 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) Sr.(a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas 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, o(a) Sr.(a) 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.**

Prof.^a Dr.^a Leila Bastos Leal
Pesquisadora principal

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO(A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo **“Bioequivalência de medicamentos para administração tópica: desenvolvimento de correlações *in vitro* - *in vivo*”**, como voluntário(a). Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) pelo(a) pesquisador(a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento).

Recife, ____ de _____ de 20__.

Assinatura do participante: _____

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

Nome:

Nome:

Assinatura:

Assinatura:

ANEXO B - 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: **“Avaliação farmacodinâmica de glicocorticoides tópicos: desenvolvimento de correlações *in vitro* - *in vivo*”**, que está sob a responsabilidade da pesquisadora **Prof.^a Dr.^a Leila Bastos Leal**, Rua Arthur de Sá, S/N, Recife - PE, CEP: 50740-520, telefone: (81) 99451-6044, e-mail: leila.leal@nudfac.com.br. Também participam também desta pesquisa: Prof. Dr. Davi Pereira de Santana, telefone: (81) 99975-6222 e Maria Alice Maciel Tabosa, telefone: (81) 99977-4774.

Este Termo de Consentimento pode conter informações que o(a) Sr.(a) não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa que está lhe entrevistando para que o(a) Sr.(a) esteja bem esclarecido(a) sobre sua participação na pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, caso aceite fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está impresso 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) Sr.(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 dermatofarmacodinâmicos em humanos com o propósito de demonstrar que experimentos relacionados à atuação de corticoides tópicos são correlacionáveis com resultados *in vivo* através de análises de DPK (dermatofarmacocinética) e microdiálise cutânea, visando avaliar a biodisponibilidade relativa e a bioequivalência destes produtos. Quanto mais clara ficar a região estudo, mais efetivo será o medicamento. O estudo será realizado utilizando abordagens experimentais simples, mas que podem ser confiáveis e reprodutíveis. Dessa forma, poderão ser utilizadas para o estabelecimento da (in)equivalência entre formulações que contêm o mesmo Ingrediente Farmacêutico Ativo (IFA) para aplicação na pele.

Isto significa dizer que, após a aplicação do medicamento em determinados locais do seu antebraço, será avaliado o branqueamento temporário da região, com o uso de um equipamento chamado cromometro que apenas entrará em contato com sua pele. Este branqueamento é uma reação normal após a aplicação de qualquer corticosteroide tópico como a betametasona. Quanto maior a intensidade do branqueamento, significa dizer que houve uma ação maior eficácia deste

medicamento. Após isto, serão realizadas comparações entre diferentes medicamentos através do nível de branqueamento temporário da pele.

As formulações serão aplicadas na pele do seu antebraço. Em seguida (2 e 6 horas após), o(a) Sr.(a) 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 a remoção da formulação residual de todos os locais de tratamento.

Após a remoção, em tempos subseqüentes de 2, 4, 6hs serão realizadas as medidas de branqueamento do estrato córneo utilizando o cromometro. O(a) Sr.(a) poderá ir para casa e retornar no outro dia para novas medidas 19 e 24hs após a remoção do produto. Este procedimento não é invasivo e é completamente indolor.

Esta pesquisa pode trazer alguns riscos, visto que as formulações podem causar irritação (leve inflamação), hipopigmentação temporária local (branqueamento), 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 o(a) Sr.(a) tenha algum problema na pele.

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.

Serão excluídos do estudo os voluntários que apresentarem qualquer um dos seguintes critérios abaixo discriminados:

- ◆ Histórico, conforme relatado pelo participante da pesquisa ou evidente para o investigador, de patologia infecciosa ou infecção cutânea ou de patologia crônica da pele (por exemplo, psoríase, dermatite atópica);
- ◆ Doenças de pele hereditária ou quaisquer condições inflamatórias da pele, conforme relatado pelo participante da pesquisa ou evidente para o investigador;
- ◆ Pigmentação excessiva, cabelo, manchas, defeitos da pele, queimaduras solares, manchas ou tatuagens, que possam interferir durante a avaliação do fármaco;
- ◆ Gravidez e/ou amamentação, conforme relatado pela participante da pesquisa;
- ◆ Obesidade, $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$;
- ◆ Voluntário que tenha fumado e/ou consumido bebida alcoólica nas 24 horas anteriores ao estudo, com base em informações fornecidas pelo voluntário;

- ◆ A participação em qualquer outro ensaio clínico ou estudo de cosméticos;
- ◆ O uso concomitante de quaisquer medicamentos de uso tópico na área do local de teste;
- ◆ Exercício extenuante durante o período de estudo: corrida, aeróbica, natação, ciclismo, etc.
- ◆ Planos para expor os antebraços à luz solar/UV na semana seguinte participação;
- ◆ Incapacidade para atender todos os momentos de coleta de dados;
- ◆ Estar usando medicamento(s), sob prescrição médica, durante um período superior a 30 dias antes de iniciar o estudo (com exceção de contraceptivos nas voluntárias do sexo feminino);
- ◆ Incapacidade de se comunicar ou cooperar com os investigadores;
- ◆ Qualquer condição que, na opinião do investigador, irá colocar o voluntário em um risco inaceitável de dano/lesão durante o estudo ou tornar o voluntário incapaz de satisfazer as exigências do protocolo.

Os critérios para descontinuidade do estudo são:

Se o participante da pesquisa desenvolver quaisquer reações adversas cutâneas, o estudo será interrompido imediatamente e vamos remover todas as fitas que cobrem locais de aplicação da formulação e a pele do participante será lavada. As reações adversas da pele seriam indicadas por uma erupção cutânea ou inflamação, vermelhidão, prurido, ardor. Além disso, vamos interromper o estudo a qualquer momento a pedido do participante da pesquisa, por qualquer motivo.

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 **“Avaliação farmacodinâmica de glicocorticoides tópicos: 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) Sr.(a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores. Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, o(a) Sr(a) 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.**

Prof.^a Dr.^a 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 **“Avaliação farmacodinâmica de glicocorticoides tópicos: desenvolvimento de correlações *in vitro* - *in vivo*”**, como voluntário(a). Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) pelo(a) pesquisador(a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento).

Recife, ____ de _____ de 20__.

Assinatura do participante: _____

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

Nome:

Nome:

Assinatura:

Assinatura: