



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

KELEN CARINE COSTA SOARES

O REGISTRO DE MEDICAMENTOS TÓPICOS NO BRASIL

BRASÍLIA – DF
2017

KELEN CARINE COSTA SOARES

O REGISTRO DE MEDICAMENTOS TÓPICOS NO BRASIL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tais Gratieri

Co-orientador: Prof. Dr. Guilherme Gelfuso

BRASÍLIA – DF
2017

Sr Soares, Kelen
O Registro de medicamentos tópicos no Brasil /
Kelen Soares; orientador Tais Gratieri; co
orientador Guilherme Gelfuso. -- Brasília, 2017.
120 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências
Farmacêuticas) -- Universidade de Brasília, 2017.

1. Bioequivalência. 2. Formulações tópicas. 3.
Registro de medicamentos. 4. Anvisa. I. Gratieri,
Tais, orient. II. Gelfuso, Guilherme, co-orient.
III. Título.

O REGISTRO DE MEDICAMENTOS TÓPICOS NO BRASIL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 27 de junho de 2017.

Banca examinadora

Prof^a. Dr^a. Tais Gratieri

Dr. Leonardo de Souza Texeira

Dr^a. Patricia Kott Tomazett

Prof^a. Dr^a. Maria de Fatima Borin

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Libbs Farmacêutica Ltda pela condução dos estudos de equivalência farmacêutica, conforme os requerimentos da ANVISA, e ao Instituto de Ciências Farmacêuticas (ICF), pelas análises das amostras no equipamento de LC-MSMS e pela ajuda na condução dos testes de liberação.

RESUMO

O estudo comparativo, exigido no Brasil, para registro das formulações tópicas genéricas é o estudo de equivalência farmacêutica. Este estudo avalia apenas os parâmetros físico-químicos e microbiológicos dos medicamentos, o que não garante aos medicamentos genéricos o mesmo grau de eficácia e segurança que o medicamento referência. A primeira parte deste trabalho apresenta um levantamento dos produtos tópicos dermatológicos registrados no Brasil até 2013 e avalia os estudos realizados para o seu registro, em comparação com o que é previsto na literatura e legislações internacionais. O levantamento das formulações dermatológicas de uso tópico, registradas no Brasil, foi realizado através da base de dados i-Helps e do sistema DATAVISA. Foi verificado o registro de 1573 formulações de uso tópico contendo um único fármaco e 647 formulações contendo fármacos em associação. Das 1573 formulações simples, 900 são de uso dermatológico. Dessas 900 formulações, 708 são registradas como genéricas ou similares, sendo os glicocorticóides a classe farmacêutica mais expressiva. Na segunda parte do trabalho, as formulações em creme e pomada de um glicocorticóide (propionato de clobetasol) foram avaliadas por meio dos estudos de equivalência farmacêutica, estudos de liberação e permeação *in vitro*. O estudo de equivalência realizado, conforme preconizado na legislação Brasileira vigente, demonstrou que todas as formulações genéricas estudadas, com exceção de um creme, são equivalentes ao medicamento referência. Porém, os estudos de liberação e permeação *in vitro* demonstram que há uma grande diferença entre as formulações. A grande quantidade de formulações tópicas registradas como genéricas e similares, a quantidade de estudos encontrados na literatura demonstrando bioinequivalência de medicamentos tópicos, bem como os estudos realizados neste trabalho, evidenciam a grande importância de uma rediscussão da legislação e a inclusão de um maior número de testes para determinação da bioequivalência entre produtos tópicos dermatológicos.

Palavras chave: Bioequivalência, Formulações tópicas, Registro.

ABSTRACT

The comparative study, required in Brazil, for registration of generic topical formulations is the pharmaceutical equivalence study. This study evaluates only the physical chemical parameters and microbiological aspects of the formulations, which does not guarantee to generic product the same efficacy and safety as the reference medicine. The first part of this work presents a data collection of topical dermatological products registered in Brazil up to 2013 and evaluates the studies performed for its registration, in comparison with what is predicted in the literature and international legislation. The data collection was done using two different programs, i-Helps and DATAVISA. It was observed that there are 1573 medicines with only one drug and 647 medicines with drugs in association. From single medicines, 900 are for dermatological use and 708 are registered as generic or similar, with glucocorticoids being the most expressive pharmaceutical class. At the second part of the work, the cream and ointment formulations of a glucocorticoid (clobetasol propionate) were evaluated through pharmaceutical equivalence studies, in vitro release and in vitro permeation studies. The equivalence study, as recommended by current legislation Brazilian showed that all generic formulations studied, with the exception of a cream, are equivalent to the reference product. However, in vitro release and permeation studies demonstrate that there is a large difference between the formulations. The large number of topical formulations registered as generic and similar, the number of studies found in the literature demonstrating bioinequivalence of topical drugs, and the studies carried out in this study, evidence the importance of a re-discussion of the legislation and the inclusion of different tests for determination of bioequivalence among topical dermatological products.

Keyword: Bioequivalence, Topical formulations, Registration

SUMÁRIO

1-	INTRODUÇÃO:	1
2	- REVISÃO DA LITERATURA:	4
2.1	– Pele	4
2.2	- Glicocorticóides Tópicos	6
2.2.1	- Absorção percutânea e mecanismos de ação.....	8
2.2.2	- Efeitos adversos	10
2.2.3	- Propionato de Clobetasol	10
2.3	- Biodisponibilidade/Bioequivalência de formulações tópicas	11
2.3.1	- Estudos <i>in vitro</i>	12
2.3.2	- Estudo de branqueamento	15
2.3.3	- Estudo dermatofarmacocinético	18
2.3.4	– Microdiálise.....	26
2.3.5	- Outras metodologias	29
3-	OBJETIVOS:	30
3.1-	Objetivo geral:	30
3.2-	Objetivos específicos:.....	30
4	- MATERIAIS E MÉTODOS:.....	31
4.1	– Levantamento teórico	31
4.2	– Produtos	32
4.3	– Equivalência Farmacêutica.....	32
4.3.1	- Teor	32
4.3.1.1	- Condições cromatográficas:.....	32
4.3.1.2	- Preparo da solução tampão e fase móvel.....	33
4.3.1.3-	Preparo da solução de padrão interno – dipropionato de beclometasona 0,20mg/mL.....	33
4.3.1.4-	Preparo da solução padrão de propionato de clobetasol.....	33
4.3.1.5	- Preparo da solução de System suitability	34

4.3.1.6 - Preparo da amostra.....	34
4.3.1.7 - Verificação do sistema cromatográfico.....	34
4.3.1.8 – Cálculo	35
4.3.2 – Densidade.....	36
4.3.3 – Viscosidade.....	36
4.3.4 – pH.....	37
4.4 – Liberação <i>In Vitro</i>	37
4.4.1– Testes de Solubilidade	37
4.4.2 – Teste de Liberação <i>in vitro</i>	37
4.4.3 - Preparo da amostra para quantificação.....	38
4.4.4 - Cálculo da velocidade de liberação <i>in vitro</i>	39
4.4.5 - Comparação das velocidades de liberação <i>in vitro</i>	39
4.5 – Permeação <i>in vitro</i>	39
4.5.1 – Obtenção e preparo da pele.....	39
4.5.2 – Teste de permeação.....	40
4.5.3 – Determinação do tempo de ensaio	42
4.5.4 – Procedimento de extração do clobetasol nas fitas e pele	43
4.5.5 – Análise dos dados.....	43
4.6 – Desenvolvimento do Método de Quantificação	43
4.6.1 - Preparo das soluções	44
4.6.1.1 - Preparo da solução primária de propionato de clobetasol 250 µg/mL	44
4.6.1.2 - Preparo da solução primária de padrão interno – dipropionato de beclometasona 500 µg/mL.....	44
4.6.1.3 - Preparo das Soluções padrão de calibração.....	44
4.6.1.4 - Condições cromatográficas.....	45
4.6.1.5 - Condições do espectrômetro de massas	45
4.7 – Validação do método.....	48

4.7.1 – Seletividade	48
4.7.2 – Linearidade	48
4.7.3 – Precisão e Exatidão	48
4.7.4 – Validação do tempo de extração do clobetasol da pele	49
4.7.5 - Avaliação da recuperação do procedimento de extração	49
4.7.5.1 – Amostras contaminadas e extraídas (amostras A)	49
4.7.5.2 – Amostras extraídas e contaminadas (amostras B)	50
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO:	51
5.1 – Levantamento teórico	51
5.2 – Medicamentos avaliados	61
5.3 - Estudos de equivalência farmacêutica	65
5.4 – Validação do método	66
5.4.1 – Seletividade	66
5.4.2 – Linearidade	67
5.4.3 - Precisão e exatidão	69
5.4.4 – Tempo de extração do clobetasol da pele	69
5.4.5 - Recuperação do procedimento de extração	70
5.5 - Liberação <i>In Vitro</i>	71
5.5.1 – Teste de solubilidade do propionato de clobetasol	71
5.5.2 – Estudo de liberação	72
5.6 – Permeação <i>In Vitro</i>	77
5.6.1 – Determinação do tempo de ensaio	77
5.6.2 – Teste de Permeação	78
5.6.3 – Avaliação das duas metodologias de permeação	84
6 – RESUMO DOS RESULTADOS	89
6.1 – Levantamento teórico	89
6.2 – Comparação entre os medicamentos genéricos e o referência	89
6.3 – Comparação entre as metodologia de permeação	90

7- CONCLUSÃO	91
8- ARTIGOS E TRABALHOS ORIGINADOS DA TESE.....	92
8.1- Bioequivalência de Medicamentos Tópicos Dermatológicos: O Cenário Brasileiro e os Desafios Para a Vigilância Sanitária. <i>Ciência & Saúde Coletiva</i> , 2015a, 20(11):3599-360.....	92
8.2 - An Update of the Brazilian Regulatory Bioequivalence Recommendations for Approval of Generic Topical Dermatological Drug Products. <i>The AAPS Journal</i> , 2015b, 17(6): 1517-1518.	93
8.3 – Are Topical Generics Reliable? Posted by AAPS blog in AAPS publications, May 2016. Disponível em: https://aapsblog.aaps.org/2016/05/24/are-topical-generics-reliable/	94
8.4 - Simplified in Vitro Bioequivalence Methodology for Topical Drug Products: Comparison of Clobetasol Generics. Submetido para <i>Pharmaceutical Research</i>	95
9 - REFERÊNCIAS	96

Lista de Figuras

Figura 1-	As três camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme -----	04
Figura 2-	Estrutura da hidrocortisona -----	06
Figura 3-	Estrutura do clobetasol -----	07
Figura 4-	Exemplo de curva dose-resposta para duas formulações diferentes de um mesmo esteróide -----	08
Figura 5-	Representação esquemática do mecanismo de ação dos glicocorticóides tópicos -----	10
Figura 6-	Métodos para avaliar a bioequivalência de glicocorticóides tópicos -----	11
Figura 7-	Célula de difusão de Franz -----	13
Figura 8-	Resposta típica de branqueamento provocado por corticosteroides -----	16
Figura 9-	Remoção de uma camada do estrato córneo com fita adesiva -----	19
Figura 10-	Ilustração da análise dermatofarmacocinética de um fármaco no estrato córneo pela metodologia de <i>tape stripping</i> recomendada pelo FDA -----	19
Figura 11-	Ilustração da área de aplicação do fármaco e <i>tape stripping</i> -	24
Figura 12-	Representação esquemática do princípio da técnica de microdiálise -----	27
Figura 13-	Equipamento de difusão tipo Franz Microette Plus Auto Sampler® - Hanson Research -----	38
Figura 14-	Preparo da pele para utilização no teste de permeação-----	40
Figura 15-	Célula de difusão de Franz modificada utilizada no ensaio de permeação in vitro -----	41
Figura 16-	Divisão da pele para análise do estrato córneo (EC), derme e epiderme (DEP) e pele total (PT) -----	42
Figura 17-	Espectro de massas do analito (propionato de clobetasol) e do padrão interno (dipropionato de beclometasona) -----	46
Figura 18 -	Espectro de massas da fragmentação do composto propionato de clobetasol -----	47

Figura 19-	Espectro de massas da fragmentação do composto dipropionato de beclometasona (padrão interno) -----	47
Figura 20-	Medicamentos tópicos registrados no Brasil -----	51
Figura 21-	Número de medicamentos tópicos registrados no Brasil conforme sua forma farmacêutica -----	52
Figura 22-	Comparação do número de medicamentos tópicos registrados no Brasil e no FDA conforme sua classe terapêutica -----	59
Figura 23-	Curva de calibração representativa (modelo linear, ponderada, $1/x^2$) -----	68
Figura 24-	Perfil de liberação do propionato de clobetasol das formulações em creme -----	74
Figura 25-	Perfil de liberação do propionato de clobetasol das formulações em pomada -----	75
Figura 26-	Permeação do propionato de clobetasol no estrato córneo e na pele remanescente (derme e epiderme)-----	77
Figura 27-	Quantidade de propionato de clobetasol permeada no EC (A) quantidade permeada das formulações em creme (B) quantidade permeada das formulações em pomada -----	79
Figura 28-	Quantidade de propionato de clobetasol permeada na DEP (A) quantidade permeada das formulações em creme (B) quantidade permeada das formulações em pomada -----	79
Figura 29-	Quantidade de propionato de clobetasol permeada na PT (A) quantidade permeada das formulações em creme (B) quantidade permeada das formulações em pomada -----	80
Figura 30-	Quantidade de propionato de clobetasol permeada no EC + DEP em comparação com a quantidade permeada na PT para as formulações em creme -----	84
Figura 31-	Quantidade de propionato de clobetasol permeada no EC + DEP em comparação com a quantidade permeada na PT para as formulações em pomada -----	85

Lista de Tabelas

Tabela 1-	Modo de preparo das soluções de trabalho (curva de calibração e controles de qualidade) -----	45
Tabela 2-	Íons monitorados na quantificação do estudo de liberação e permeação -----	46
Tabela 3-	Medicamentos dermatológicos semissólidos de uso tópico, que possuem registros de medicamentos genéricos e similares -----	53
Tabela 4-	Comparação das exigências requeridas para registro de medicamentos tópicos genéricos pelas agências reguladoras do Brasil, EUA, Canadá, Europa e Austrália -----	60
Tabela 5-	Composição qualitativa dos cremes de propionato de clobetasol 0,5mg/g, utilizados no estudo -----	62
Tabela 6-	Composição qualitativa das pomadas de propionato de clobetasol 0,5mg/g, utilizados no estudo -----	63
Tabela 7-	Resultados do estudo de equivalência farmacêutica das formulações em creme -----	65
Tabela 8-	Resultados do estudo de equivalência farmacêutica das formulações em pomada -----	65
Tabela 9-	Valores de área e percentual de interferência obtidos no teste de seletividade -----	67
Tabela 10-	Resultados obtidos no teste de linearidade -----	68
Tabela 11-	Resultado do teste de precisão e exatidão obtido no teste intracorrída -----	69
Tabela 12-	Resultado do teste de precisão e exatidão obtido no teste intracorrída -----	69
Tabela 13-	Determinação do tempo de extração do clobetasol nas amostras do teste de permeação -----	70
Tabela 14-	Resultado do teste de recuperação -----	70
Tabela 15-	Solubilidade do propionato de clobetasol em diferentes meios -----	71
Tabela 16-	Liberação <i>in vitro</i> do propionato de clobetasol das formulações em creme -----	

		72
Tabela 17-	Liberação <i>in vitro</i> do propionato de clobetasol das formulações em pomada -----	73
Tabela 18-	Comparação das diferentes formulações em creme com o produto referência pelo estudo de liberação <i>in vitro</i> -----	76
Tabela 19-	Comparação das diferentes formulações em pomada com o produto referência pelo estudo de liberação <i>in vitro</i> -----	76
Tabela 20-	Quantidade de propionato de clobetasol, das formulações em creme (ng/cm ²), permeada nas diferentes frações de pele após 3 horas -----	78
Tabela 21-	Quantidade de propionato de clobetasol, das formulações em pomada (ng/cm ²), permeada nas diferentes frações de pele após 3 horas-----	78
Tabele 22-	Comparação da quantidade de propionato de clobetasol permeada das formulações em creme pelo teste t de Student	82
Tabela 23-	Comparação da quantidade de propionato de clobetasol permeada das formulações em pomada pelo teste t de Student -----	83
Tabela 24-	Comparação entre a quantidade de propionato de clobetasol permeada nas duas metodologias realizadas com as formulações em creme, pelo teste t de Student. -----	85
Tabela 25-	Comparação entre a quantidade de propionato de clobetasol permeada nas duas metodologias realizadas com as formulações em pomada, pelo teste t de Student -----	86
Tabela 26-	Massa de cada uma das metades de pele submetidas ao teste de permeação -----	87
Tabela 27-	Resumo dos resultados obtidos -----	90

1- INTRODUÇÃO:

Medicamentos genéricos ou similares são medicamentos equivalentes a um produto inovador, geralmente produzidos após a expiração da proteção patentária ou de outros direitos de exclusividade (ANVISA, 2014).

O registro dos medicamentos genéricos e similares deve seguir o estabelecido pela RDC nº 60/2014. A comprovação da eficácia e segurança desses produtos é dada por meio dos estudos de equivalência farmacêutica e bioequivalência (ANVISA, 2014).

Os estudos de equivalência farmacêutica são compostos por um conjunto de ensaios físico-químicos e, quando aplicáveis, microbiológicos e biológicos. Já a bioequivalência trata de estudo *in vivo*, podendo ser demonstrada pelo estudo farmacocinético (comparando as concentrações plasmáticas do fármaco de duas formulações diferentes), estudo farmacodinâmico (com *end points* clínicos) ou estudos clínicos comparativos. (ANVISA, 2014)

Os medicamentos de aplicação tópica, não destinados a efeitos sistêmicos, que contenham o mesmo fármaco, na mesma concentração, além de excipientes de mesma função, em relação ao medicamento referência, são bioisentos pela RDC nº 37/2011, ou seja, medicamentos de uso tópico não precisam comprovar sua eficácia e segurança por meio dos estudos de bioequivalência (ANVISA, 2011). Sendo assim, no Brasil, o estudo de equivalência farmacêutica é o único estudo comparativo exigido no momento do registro das formulações tópicas genéricas. Os testes realizados são os estabelecidos em farmacopeias, preferencialmente a brasileira, e se resumem a: aspecto, teor, identificação, peso médio, pH, viscosidade e densidade (ANVISA, 2010a), não sendo a liberação do fármaco a partir da formulação, nem a permeabilidade cutânea, avaliadas no momento do registro.

Uma vez que no Brasil os excipientes presentes nos medicamentos cópias podem ser diferentes do medicamento referência, existem no mercado produtos registrados como genéricos e similares qualitativamente diferentes do medicamento referência. Apesar dos excipientes serem considerados farmacologicamente inativos, eles podem exercer um efeito direto ou indireto,

aumentando ou inibindo, a penetração do fármaco na pele (SHAH,1998). Assim sendo, estas diferenças podem causar alterações tanto na liberação do fármaco a partir da formulação, quanto na permeabilidade cutânea, parâmetros não avaliados no estudo de equivalência farmacêutica exigido atualmente.

Como consequência do efeito das diferentes formulações existentes contendo um mesmo fármaco, na mesma concentração, diferenças na biodisponibilidade de medicamentos tópicos, vem sendo observadas há muitos anos (LIPPOLD, 1984).

Estudos realizados há duas décadas no desenvolvimento do medicamento Zovirax® (medicamento referência contendo o fármaco aciclovir), já demonstraram que diferentes quantidades do excipiente propilenoglicol podem levar a uma maior ou menor absorção cutânea do fármaco (SPRUANCE, 1984). Apesar da maior penetração do aciclovir na pele ser observada na presença de 30 – 40% de propilenoglicol na formulação, grande parte das formulações genéricas avaliadas apresentam menos de 20% desse componente (TROTET, 2005).

Um estudo demonstrou que a quantidade de dexametasona liberada, por duas pomadas genéricas, foi de duas a quatro vezes menores do que para o medicamento inovador, indicando menor afinidade do fármaco pela formulação base do medicamento referência do que para as bases dos medicamentos genéricos (SUZUKI, 2011). Essa menor taxa de liberação, apresentada pelos genéricos de dexametasona, pode resultar em um perfil de permeação cutânea do fármaco alterado, com consequente alteração na eficácia dos medicamentos genéricos (SUZUKI, 2011).

De maneira semelhante, a comparação de sete diferentes cremes de imiquimode 5%, demonstrou a inequivalência entre medicamentos tópicos genéricos e o medicamento referência (HARRISON, 2009). Para seis das sete formulações testadas foram observadas quantidades significativas de material cristalino e liberação *in vitro* significativamente menor que o produto inovador livre de cristais (HARRISON, 2009). Curiosamente, durante o desenvolvimento do produto inovador, uma formulação foi abandonada devido à formação de cristais, derivados da interação fármaco-excipiente ao longo do tempo. Com relação às formulações testes que apresentaram cristais, existe a possibilidade dos fabricantes não terem analisado a presença de cristais das formulações

como parte da especificação do produto (HARRISON, 2009). No Brasil, tal teste não é exigido nos estudos de equivalência farmacêutica e atualmente existem registrados três medicamentos genéricos e seis similares contendo este fármaco.

Estes achados de diferenças na biodisponibilidade levanta o questionamento sobre a equivalência terapêutica das formulações de ação tópica, principalmente as semissólidas onde o fármaco deve ser liberado da formulação para penetrar no estrato córneo.

Assim, este trabalho buscou fazer um levantamento das formulações tópicas disponíveis no mercado brasileiro e uma avaliação dos estudos realizados para o seu registro em comparação com o que é previsto na literatura e legislações internacionais. Em uma segunda etapa, diferentes formulações contendo propionato de clobetasol foram avaliadas por meio de testes físico-químicos, estudos de liberação e permeação *in vitro*. O estudo de permeação foi realizado por duas metodologias diferentes, buscando, desta forma, além de demonstrar o quanto a legislação brasileira precisa ser revista com relação aos estudos exigidos para registro das formulações tópicas, propor uma metodologia simples para avaliação dessas formulações.

2 - REVISÃO DA LITERATURA:

2.1 – Pele

A função essencial da pele é a proteção do organismo frente a diversidades do meio externo como: agentes físicos, químicos e biológicos. A pele humana intacta apresenta-se como uma eficiente barreira contra a penetração e permeação de substâncias exógenas. O que representa uma proteção ao ser humano se torna um fator limitante na ação das substâncias de atividade terapêutica e cosmética aplicadas topicamente (BABY, 2008).

A pele consiste essencialmente de três camadas funcionais: epiderme, derme e hipoderme, da mais externa para a mais profunda, respectivamente (figura 1) (AZULAY, 1999; DANGEL, 2005).

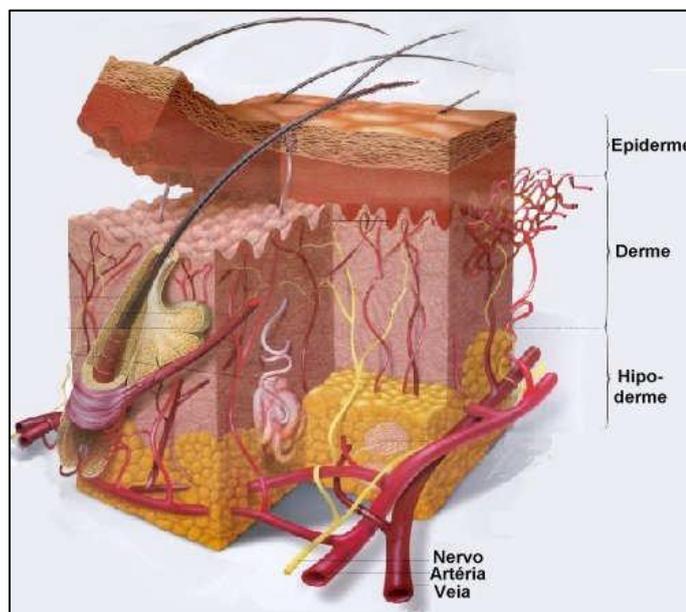


Figura 1 As três camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme.

Fonte: <http://www.saudeparavoce.com.br/pintanapele/anatomia.htm>

A hipoderme é um tecido subcutâneo que atua como isolante térmico e estoque de energia, consistindo de gordura e músculo. A derme tem uma espessura de dois mm e contém colágeno, fibra elástica, vasos sanguíneos, nervos, folículos capilares e glândulas sebáceas e sudoríparas. As principais células presentes na derme são os fibroblastos, os quais estão envolvidos com

o sistema imune e com a resposta inflamatória, sendo o local onde estão presentes os receptores dos glicocorticóides. A derme é a origem de nutrientes da epiderme, a qual possui uma estrutura multilamelar que reflete diferentes estágios de diferenciação das células da pele (os queratinócitos). A diferenciação vai desde um estado proliferativo até células funcionalmente mortas, totalmente queratinizadas (corneócitos). Os corneócitos são embebidos em uma matriz lipídica e formam a camada mais externa da epiderme com 10 - 20 µm, conhecida como estrato córneo, que oferece resistência mecânica à pele (WIEDERSBERG,2008). O estrato córneo (EC) atua como um eficiente umectante, sendo composto por uma mistura de aminoácidos, fator natural de hidratação (NMF – *natural moisturizing factor*), ácido láctico, uréia, citrato e açúcar. Os corneócitos são unidos por proteínas de junção, denominadas corneodossomas, que asseguram a coesividade desta camada. A natureza especializada do EC o torna uma eficiente barreira para substâncias estranhas, incluindo moléculas de fármacos.

Produtos farmacêuticos aplicados na pele podem ser subdivididos em duas categorias: (i) sistemas transdérmicos, que atravessam todas as camadas da pele e têm como objetivo a absorção dos fármacos pela circulação sanguínea, para tratamento de doenças sistêmicas e (ii) formulações tópicas, para o tratamento local de doenças na pele. Apesar de possuírem características e objetivos distintos, a eficácia de ambos dependerá da liberação do fármaco da formulação que o contém, e de sua penetração/difusão pelas camadas da pele (SHAH, 1991).

A absorção cutânea é um processo complexo e lento, sendo a penetração no EC a etapa limitante do processo. A velocidade e a extensão da penetração de um fármaco no EC dependem, entre outros fatores, das propriedades físico-químicas do fármaco, tipo de associação estabelecida entre o fármaco e a formulação, do tipo de formulação e da presença de excipientes que acelerem ou retardem a penetração do fármaco no EC. Desta forma, a eficácia clínica de um produto tópico dermatológico depende amplamente dos componentes da formulação, sendo de grande importância a comprovação da bioequivalência de duas formulações distintas que pretendem ser intercambiáveis (PARFITT, 2011).

2.2 - Glicocorticóides Tópicos

Corticosteróides tópicos são os medicamentos mais prescritos entre todos os produtos tópicos (TSAI, 2002; SOARES 2015a).

Em humanos, o corticosteróide de origem natural é o cortisol, ou hidrocortisona, que é produzido primariamente na glândula adrenal. A maioria dos glicocorticóides tópicos utilizados terapeuticamente são derivados sintéticos da hidrocortisona.

A hidrocortisona apresenta quatro anéis, apresentando uma potência relativamente baixa e um curto tempo de duração. A hidroxila livre no carbono 11 é essencial para a atividade tópica (figura 2).

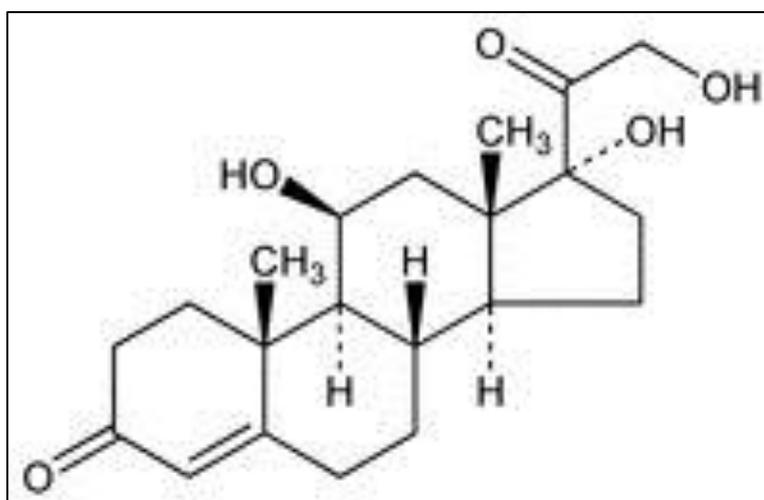


Figura 2: Estrutura da hidrocortisona (Wiedersberg, 2008)

Para diminuir a atividade mineralocorticóide e aumentar a atividade glicocorticóide (aumento da afinidade pelos receptores de glicocorticóides) é introduzida uma ligação dupla no carbono 1 e uma substituição no carbono 16. A lipofilicidade e a duração de ação são aumentadas pela presença do flúor no anel B na posição C9 ou C6. O clobetasol é atualmente um dos glicocorticóides disponíveis de maior potência (figura 3).

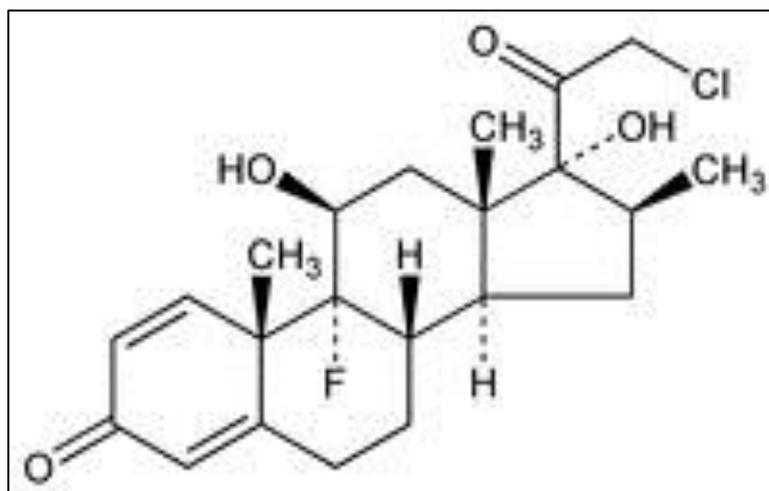


Figura 3: Estrutura do clobetasol (Wiedersberg, 2008)

A eficácia de um glicocorticóide está relacionada à sua absorção pelas células alvo e sua potência, sendo uma função complexa das propriedades físico-químicas do fármaco e do seu veículo (STOUGHTON, 1987).

Na classificação Americana, a potência de um produto é definida pela concentração do fármaco e forma farmacêutica, sendo definidos sete grupos. Corticosteróides classificados em um mesmo grupo apresentam o mesmo grau de eficácia e potencial de provocar efeitos colaterais. Quanto maior a potência, maior o efeito tanto terapêutico quanto adverso. Formulações menos potentes podem ser utilizadas por um tempo maior que as mais potentes, as quais devem ser reservadas para uso em locais como as palmas das mãos e dos pés, onde as formulações menos potentes são ineficazes (WIEDERSBERG, 2008).

A relação entre a resposta farmacológica e a concentração de um fármaco é classicamente ilustrada pela curva dose-resposta, cujo perfil é caracterizado por uma concentração limiar (S), correspondente à concentração mínima necessária para induzir uma resposta; uma faixa onde a resposta aumenta linearmente com a dose; a concentração que corresponde a metade do efeito máximo (ED_{50}) e a fase de platô, onde o aumento na concentração não provoca mais aumento da resposta farmacológica (E_{max}) (WIEDERSBERG, 2008). A quantidade de fármaco necessário para gerar uma mesma resposta farmacológica, difere de acordo com a solubilidade do esteróide no veículo. Sendo assim, diferentes formulações de um mesmo esteróide podem alterar a posição da curva dose-resposta como consequência da aceleração ou

retardamento da penetração do fármaco na pele (figura 4) (WIEDERSBERG, 2008).

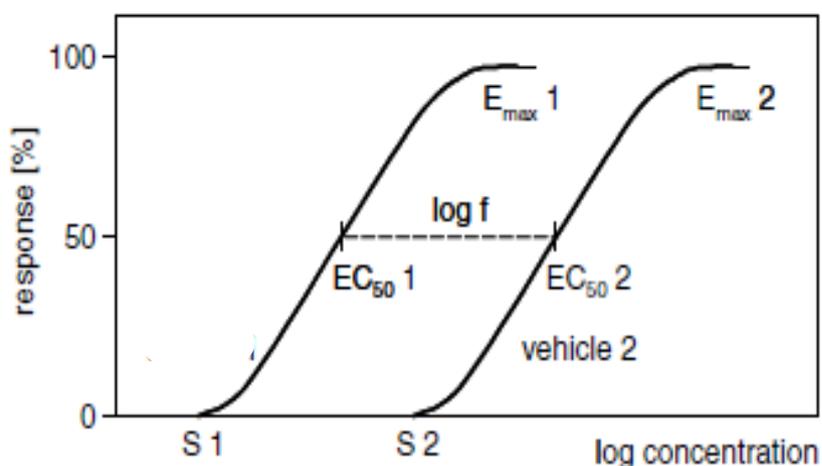


Figura 4: Exemplo de curva dose-resposta para duas formulações diferentes de um mesmo esteróide (WIEDERSBERG, 2008)

As formulações tópicas de glicocorticóides são formuladas em uma variedade de veículos, incluindo pomadas, cremes, loções, géis e espumas. As formulações em pomada são geralmente mais potentes que as em creme contendo o mesmo fármaco, o que se deve ao efeito oclusivo das pomadas que aumenta a hidratação do EC e aumenta o transporte do fármaco (PERSHING,1992). A atividade de uma formulação tópica de glicocorticóide pode ser aumentada ainda pela adição de potencializadores de penetração, que podem levar a um aumento da liberação do fármaco no EC (WIEDERSBERG, 2008).

2.2.1 - Absorção percutânea e mecanismos de ação

A absorção percutânea de um fármaco aplicado topicamente é um processo complexo e pode ser significativamente afetada por características físico-químicas, tanto do fármaco como do veículo, bem como por condições fisiológicas da pele. A absorção percutânea de uma formulação tópica contendo glicocorticóide envolve as seguintes etapas: 1) Liberação do fármaco da formulação; 2) Penetração e difusão no EC; 3) Partição do EC para a

epiderme e derme; 4) difusão na epiderme e derme para alcançar o receptor de glicocorticóide e se ligar (WIEDERSBERG, 2008).

O citoplasma de queratinócitos (presentes na epiderme) e fibroblastos (presentes na derme), cultivados em cultura de células humana de pele, apresentam macromoléculas que se ligam a glicocorticóides com alta afinidade, sugerindo que o sítio de ação dos glicocorticóides tópicos envolve tanto a derme quanto a epiderme. Para alcançar as células alvos, os glicocorticóides devem permear através do EC, que atua como a principal barreira para a absorção percutânea, sendo esta considerada a etapa limitante do processo de absorção (WIEDERSBERG, 2008).

Uma vez atingido o local de ação, a absorção celular, o tempo de residência e a afinidade do receptor, irão determinar o efeito clínico. Estudos com fibroblastos e queratinócitos em cultura, tem demonstrado que o processo de absorção celular ocorre por difusão passiva e envolve duas etapas: associação à membrana celular que ocorre de forma rápida e não específica, seguida de um processo lento que leva a uma forte ligação do glicocorticóide dentro da célula (PONEC, 1983).

As atividades anti-inflamatória e imunossupressora dos glicocorticóides parecem ser mediadas pela regulação de genes responsivos a glicocorticóides. Dentro do citoplasma, o fármaco se liga ao receptor formando um complexo que é rapidamente transportado para o núcleo. Dentro do núcleo, este complexo se liga a uma região do DNA responsiva a glicocorticóide (GRE – *glucocorticoid responsive element*) estimulando ou inibindo a transcrição do gene, regulando desta forma o processo inflamatório (figura 5) (NORRIS 2005). Além disso, os glicocorticóides também agem indiretamente bloqueando o efeito de outros fatores de transcrição, como o fator nuclear $\kappa\beta$, e exercendo um efeito vasoconstrictor, que pode contribuir com a atividade anti-inflamatória diminuindo o eritema na área lesionada, entretanto o exato mecanismo da vasoconstrição não está totalmente claro (WIEDERSBERG, 2008).

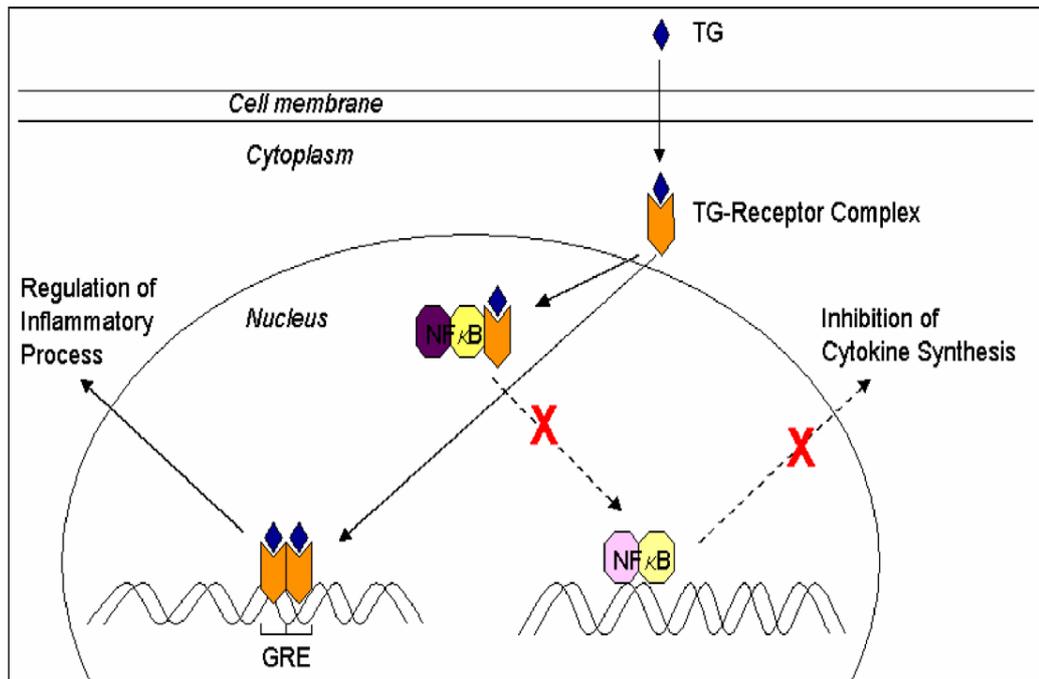


Figura 5: Representação esquemática do mecanismo de ação dos glicocorticóides tópicos (WIEDERSBERG, 2008)

2.2.2 - Efeitos adversos

Os glicocorticóides tópicos estão associados com alguns efeitos colaterais que podem limitar seu uso. Um deles é o afinamento ou atrofia da epiderme e da derme que pode iniciar após o terceiro dia de tratamento, embora alterações visíveis não possam ser observadas. Efeitos colaterais sistêmicos, como a supressão do eixo pituitário adrenal, são raros, mas devem ser considerados no tratamento de crianças devido ao seu potencial de retardar o crescimento (WIEDERSBERG, 2008).

2.2.3 - Propionato de Clobetasol

O propionato de clobetasol é o glicocorticóide de uso tópico mais potente, cerca de 1000 vezes mais potente que a hidrocortisona (TSAI, 2002). O propionato de clobetasol é indicado para o tratamento de doenças inflamatórias da pele, como psoríase (exceto quando as lesões estão muito espalhadas pelo corpo), eczemas recalcitrantes (difíceis de tratar), líquen plano, lúpus eritematoso discóide e outras doenças da pele que não

melhoram satisfatoriamente com o uso de medicamentos esteróides menos potentes.

2.3 - Biodisponibilidade/Bioequivalência de formulações tópicas

Biodisponibilidade é definida como a velocidade e extensão na qual um fármaco é absorvido da formulação e é disponibilizado no sítio de ação. Bioequivalência, por sua vez, é definida como a ausência de diferença significativa na biodisponibilidade entre produtos, quando estudados sob um mesmo desenho experimental (ANVISA, 2014). Diferentes métodos *in vitro* e *in vivo* vem sendo empregados para analisar a bioequivalência de formulações tópicas contendo glicocorticóides (WIEDERSBERG, 2008).

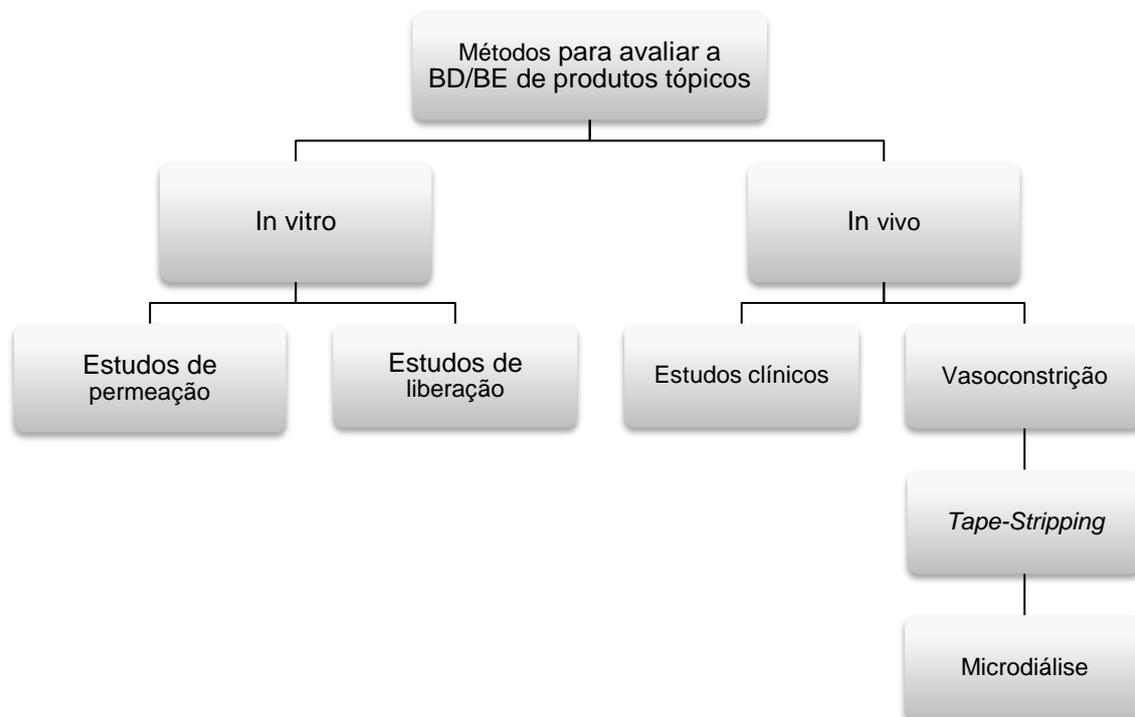


Figura 6: Métodos para avaliar a bioequivalência de glicocorticóides tópicos.
(WIEDERSBERG, 2008)

Atualmente Canadá, União Européia, Japão e EUA possuem guias específicos para produtos tópicos. Neles são requeridos estudos clínicos para a maioria dos produtos e estudos farmacodinâmicos *in vivo* para os corticosteróides. Japão, África do Sul, EUA e OMS também abrem espaço para aceitar algumas alternativas, como o estudo dermatofarmacocinético e estudos *in vitro* (BRADDY, 2014).

Apesar dos estudos clínicos serem considerados padrão ouro, eles costumam requerer um grande número de voluntários, são pouco sensíveis, de alto custo e demorados (SHAH, 1998), impossibilitando, na maioria das vezes, a sua realização, principalmente em países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil (LEAL, 2017). Já os estudos farmacodinâmicos são relativamente fáceis de serem conduzidos, a quantidade de fármaco que os voluntários são expostos é menor, os estudos são reproduzíveis e requerem uma quantidade menor de voluntários (WIEDERSBERG, 2008).

2.3.1 - Estudos *in vitro*

O uso do teste de dissolução *in vitro*, para determinar a liberação de fármacos de sólidos orais, está descrito nas farmacopeias e é utilizado rotineiramente no controle de qualidade desses produtos, principalmente para determinação da uniformidade de lotes e na avaliação da equivalência farmacêutica (USP 28, 2005, SIEWERT, 2003). Para formulações não orais, como as dermatológicas, o termo “liberação *in vitro*” é preferido. O teste de liberação *in vitro* pode ser realizado com os aparatos 5, 6 e 7 da farmacopeia Americana (USP 28, 2005).

Uma grande quantidade de artigos, assim como o guia de pós registro do FDA, preconizam o uso de células de difusão, como a célula de Franz, equipada com membrana sintética, para determinar a liberação *in vitro* de formulações tópicas e transdérmicas (figura 7) (SHAH, 1989; FDA, 1997; SHAH, 1999).

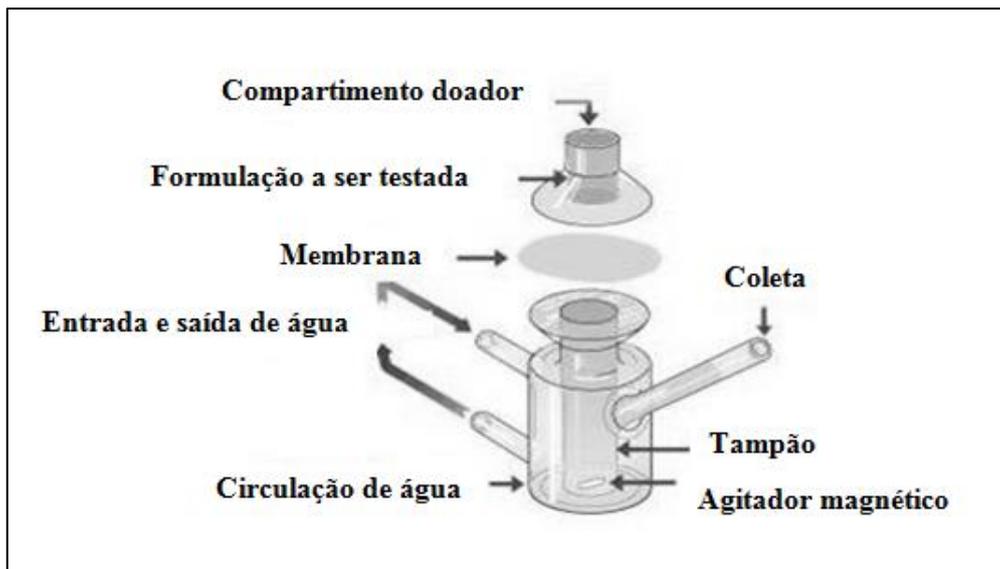


Figura 7: Célula de difusão de Franz (Particle Sciences, 2009).

A utilização das células de difusão de Franz, com membranas sintéticas, é aceita pelo FDA para determinar a liberação *in vitro* de formulações tópicas e demonstrar a equivalência de produtos, após algumas alterações pós-registro de nível 2 (alterações que podem ter um impacto significativo na qualidade e performance da formulação). Entretanto, com exceção de alguns casos pontuais, o teste *in vitro* não é aceito como substituto dos estudos de biodisponibilidade *in vivo* ou bioequivalência (FDA, 1997). Isso porque, uma maior quantidade de fármaco liberado pela formulação nos experimentos *in vitro* não é garantia de maior disponibilidade de fármaco no local de ação, visto que a penetração cutânea de fármacos possui muitas peculiaridades. As características de penetração de cada formulação (por exemplo, presença de promotores de absorção) é que irão ditar a quantidade de fármaco presente em cada camada de pele (BEMVINDO, 2006).

A quantidade de fármaco que permeia a pele e chega ao local de ação, pode ser determinada com a célula de difusão de Franz, se for utilizado neste caso pele ao invés de membrana sintética, determinando assim não só a liberação do fármaco da formulação, mas também a permeação cutânea do fármaco.

O tecido humano seria a membrana mais apropriada para utilização em estudos de penetração e permeação cutânea. No entanto, esta membrana

apresenta problemas como baixa disponibilidade, questões éticas e legais, variações quanto ao sexo, idade e região anatômica (HAIGH, 1994).

Uma ampla variedade de modelos de pele animal é sugerida como substitutos à pele humana, e estes têm sido utilizados para avaliar a permeação de diferentes fármacos (LANKE, 2009; LEOPOLD, 2003; BARBERO, 2008). Tais modelos incluem roedores, primatas e suínos (HAIGH, 1994). Com relação a pele suína, ela tem demonstrado ser a mais semelhante em relação a pele humana, com espessura do estrato córneo e parâmetros biofísicos (difusividade e coeficiente de permeabilidade de água) correlacionáveis com aqueles da pele humana *in vivo* (SEKKAT, 2002).

Acredita-se que a permeação cutânea observada *in vitro*, utilizando pele de porco, reflita os aspectos determinantes do processo *in vivo* na maioria dos casos, e possa ser utilizada para determinar a disponibilidade relativa de produtos dermatológicos (SKELLY, 1987).

A importância da avaliação de fármacos na pele, para controle e desenvolvimento de formulações tópicas e transdérmicas, é cada vez mais reconhecida. É notado um interesse da comunidade científica para estabelecimento de metodologias validadas e confiáveis, que permitam melhor entendimento do comportamento dos fármacos na pele, otimização dessa via de administração (que oferece algumas vantagens em relação a outras vias) e para comparação do desempenho biofarmacêutico de produtos tópicos dermatológicos.

Na literatura, o estudo de permeação *in vitro* tem demonstrado ser valioso instrumento no desenvolvimento de formulações, havendo situações onde este estudo poderia ser considerado adequado para comparar diferentes formulações (WIEDERSBERG, 2008). Um estudo realizado, utilizando pele humana, foi capaz de diferenciar duas formulações contendo metronidazol. Um dos produtos contendo 0,75% de metronidazol (Metrocream® - Galderma Laboratories) foi capaz de atravessar a barreira da pele 1,5 vezes mais que outra formulação contendo 1% de metronidazol (Noritate cream® - Dermik Laboratories), demonstrando não só que o veículo utilizado pode ser mais importante que a concentração de ativo na liberação do metronidazol na pele, mas também que o estudo *in vitro* de permeação pode ser capaz de diferenciar as duas formulações (ELEWSKI, 2007).

2.3.2 - Estudo de branqueamento

Para determinar a bioequivalência tópica de corticosteróides, o FDA e outros órgãos reguladores de vários países (Canadá, Austrália, Japão, África do Sul, China, Nova Zelândia, União Européia e OMS), têm adotado o ensaio de branqueamento da pele (*Human Skin Blanching Assay* – HSBA), também conhecido como ensaio de vasoconstrição. Este ensaio foi introduzido por McKenzie e Stoughton (McKenzie, 1962) e é baseado na capacidade destes produtos em induzir uma resposta de branqueamento da pele, resposta associada com a indução da vasoconstrição da microvasculatura da pele, pelo fármaco. O ensaio envolve a aplicação do produto na pele de voluntários sadios e a avaliação do grau de branqueamento da pele após um determinado período de tempo, o que pode ser feito visualmente ou instrumentalmente utilizando-se um colorímetro. Uma vez que o branqueamento está relacionado com a quantidade de corticosteróide que penetra na pele, uma comparação do grau de branqueamento, provocado por diferentes formulações, pode ser utilizado para definir se duas formulações possuem o mesmo potencial farmacêutico (PERSHING, 1992).

O colorímetro tem sido adotado pelas agências reguladoras como o padrão de medida da resposta de branqueamento. O colorímetro quantifica a refletância do pulso de luz de uma lâmpada de xenônio em três medidas: uma escala L (*light-dark*), uma escala a (vermelho-verde) e uma escala b (amarelo-azul). Estes três valores podem ser utilizados para definir um ponto em um espaço tridimensional que caracteriza uma cor em termos absolutos. O guia do FDA sugere o uso apenas da escala a na quantificação do grau de branqueamento da pele.

O ensaio de branqueamento é obviamente aplicável apenas àqueles corticosteróides tópicos que provocam um branqueamento da pele após sua aplicação (AU, 2010). Uma resposta típica de branqueamento provocada por corticosteróides é apresentada na figura 8.

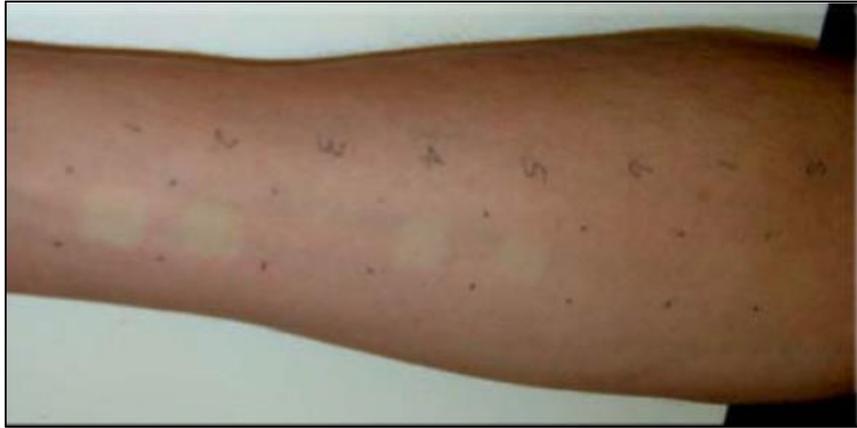


Figura 8: Resposta típica de branqueamento provocado por corticosteroides (AU,2008)

A metodologia envolve um estudo piloto para determinar o tempo de exposição apropriado do produto na pele, uma vez que o tempo para se obter uma resposta após a aplicação pode variar conforme o fármaco e as condições do estudo, seguido pelo estudo de bioequivalência replicado comparando os produtos teste e referência (FDA, 1995).

Diversos estudos comparativos envolvendo ensaio de branqueamento indicam que os medicamentos genéricos não apresentam a mesma eficácia que os medicamentos inovadores (STOUGHTON, 1987; JACKSON, 1989; OLSEN, 1991; SEQUIRA, 1990; PUAVILAI, 2002; CARON, 1990; TSAI, 2004).

Um estudo comparando medicamentos genéricos contendo triancinolona acetonida, fluocinolona acetonida e valerato de betametasona, foi conduzido com trinta voluntários sadios utilizando o ensaio de vasoconstrição (STOUGHTON 1987). As formulações foram mantidas nos antebraços dos voluntários por 16 horas, seguindo de lavagem e leitura após duas horas, quantificando a vasoconstrição como 0, quando não foi observada vasoconstrição; 1, quando foi observada uma vasoconstrição leve; 2, quando a vasoconstrição foi moderada; 3 nos casos de intensa vasoconstrição (STOUGHTON, 1987). O medicamento referência Kenalog® (E.R. Squibb & Sons, Princeton, NJ) utilizado para as formulações de triancinolona acetonida creme 0,1%, demonstrou uma potência significativamente maior que todos os 5 medicamentos genéricos testados. O mesmo foi observado para a formulação da triancinolona em pomada, onde o medicamento referência Aristocort A® (Ledele Laboratories, Pearl River, NY) demonstrou maior potência que as duas formulações genéricas testadas. Para as formulações de betametasona foi

observado que a formulação em creme 0,1% do medicamento referência, Valisone® creme (Schering Corp, Kenilworth, NJ), foi mais potente que todos os cinco cremes genéricos testados, porém para a formulação em pomada 0,1%, não foi observada diferença entre o medicamento referência Valisone® pomada e os dois medicamentos genéricos testados. Com relação à fluocinolona 0,025% creme, foi observado que o medicamento referência Synalar® (Syntex Laboratories, Palo Alto, Calif) foi mais potente que um dos medicamentos genéricos, porém equivalente aos outros três medicamentos genéricos testados (STOUGHTON, 1987). Este estudo demonstrou que os medicamentos genéricos de formulações tópicas contendo glicocorticóides, variam entre si com relação à atividade e são diferentes com relação ao medicamento referência, mesmo que contendo o mesmo fármaco no mesmo tipo de formulação, seja creme ou pomada (STOUGHTON, 1987).

Outros dois estudos com formulações de triancinolona acetona 0,1% creme, valerato de betametasona 0,1% creme e fluocinolona acetona 0,01% e 0,025% creme, confirmaram os achados anteriormente descritos, questionando a intercambialidade entre medicamentos que contém concentrações idênticas de um fármaco, mas que não necessariamente apresentam a mesma potência (JACKSON, 1989).

Quatro formulações (Diprolene® - medicamento referência produzido pela Schering Corp e Topilene® - medicamento genérico produzido pela Technilab, em creme e pomada) contendo dipropionato de betametasona 0,05%, foram avaliadas com relação a sua intercambialidade. Testes físico-químicos demonstraram não haver diferenças entre as duas formulações em pomada, porém uma grande variação na composição dos dois cremes foi observada. O conteúdo de água no creme genérico variou entre 69% - 71%, comparado com 28% no creme referência. O conteúdo de propilenoglicol foi 10 vezes maior no Diprolene® do que no Topilene®. Além disso, o Topilene® apresenta clorocresol e outros excipientes que não estão presentes no Diprolene®. O teste de vasoconstrição, realizado com 24 voluntários sadios, demonstrou semelhança entre as pomadas, mas não entre os cremes. O Diprolene creme se mostrou mais eficaz, o que está relacionado ao seu processo de produção que difere do Topilene®, por conter menos excipientes. O fármaco no medicamento referência encontra-se dissolvido, diferentemente

do que ocorre no medicamento genérico, o que resulta em uma menor atividade vasoconstrictora do medicamento genérico e ausência de intercambialidade entre as formulações em creme (SEQUIRA, 1990).

Para comparar formulações pertencentes a outras classes farmacêuticas, diferentes de corticosteróides que causam a resposta de branqueamento da pele, a maioria dos órgãos reguladores (FDA, EMA, OMS, Canada, Japão, Austrália, África do Sul) exigem atualmente a apresentação de estudos clínicos comparativos. Por causa dos problemas já relatado com relação a esses estudos, vem-se buscando metodologias que possam substituir os estudos clínicos (BHASKAR, 2004).

2.3.3 - Estudo dermatofarmacocinético

Em 1998 o FDA publicou um guia, descrevendo o método dermatofarmacocinético (DPK) como uma possível ferramenta a ser utilizada para avaliar a bioequivalência de medicamentos tópicos (SHAH, 1998). O racional desta técnica é que fármacos aplicados topicamente precisam ser liberados da formulação e então passarem através da primeira barreira da pele (EC) para estarem disponíveis nos tecidos subjacentes (SHAH, 1998). Desta forma, se a concentração do fármaco no EC é avaliada por um período de tempo, o perfil concentração *versus* tempo obtido de dois medicamentos diferentes, pode ser comparado para determinar se os produtos são bioequivalentes (NARKAR, 2010).

Como descrito no guia, para avaliar a absorção e eliminação do fármaco, uma área específica do EC deve permanecer em contato com o fármaco por um determinado período de tempo. O produto é então removido da pele e o EC é coletado por sucessivas aplicações e remoções de 12 fitas adesivas (figura 9).

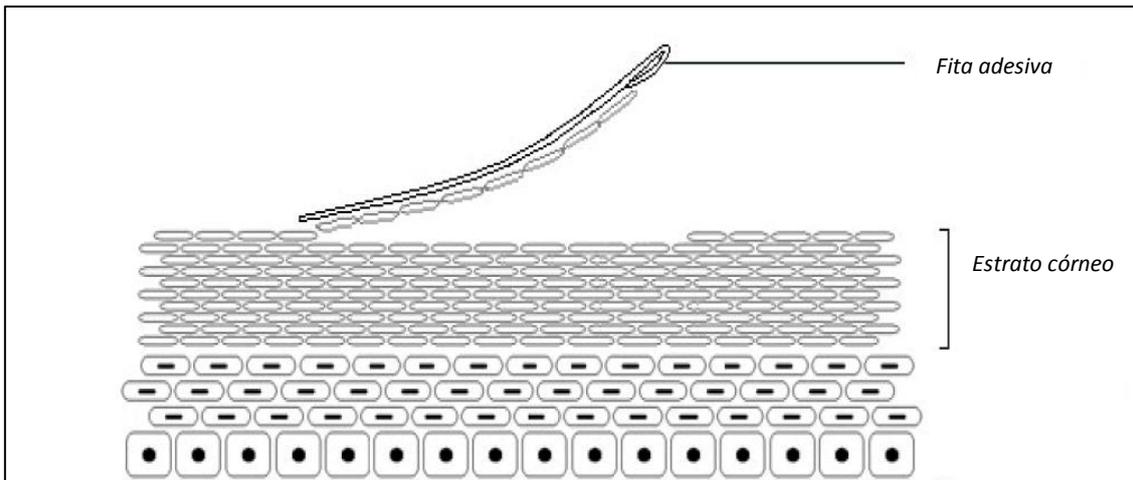


Figura 9: Remoção de uma camada do EC com fita adesiva (AU, 2010)

Segundo o guia, as duas primeiras fitas devem ser descartadas para evitar quantificação do fármaco residual e uma superestimação do fármaco. As demais fitas são analisadas para gerar os perfis de concentração *versus* tempo e determinar os parâmetros de área sob a curva (ASC), concentração máxima (C_{max}) e tempo máximo (T_{max}) (figura 10).

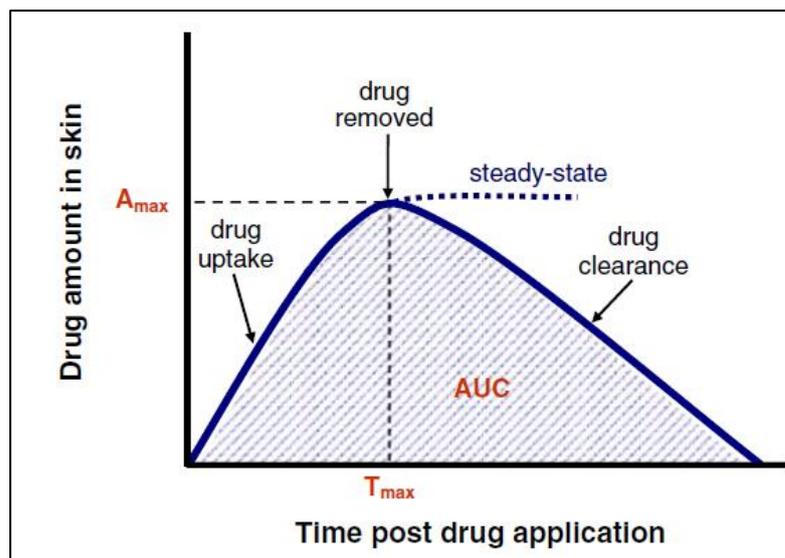


Figura 10: Ilustração da análise dermatofarmacocinética de um fármaco no EC pela metodologia de *tape stripping* recomendada pelo FDA (N'DRI-STEMPFER, 2008)

O guia sugere a aplicação de cada formulação em pelo menos 08 sítios, divididos igualmente, para estudar a cinética de absorção e eliminação do fármaco. O tempo que o produto fica em contato com a pele, em cada sítio de aplicação, não é definido, com exceção do tempo mais longo referente à

eliminação, que deve ser longo o suficiente para que a eliminação tenha atingido o estado de equilíbrio (FDA, 1998).

A bioequivalência entre as formulações teste e referência é avaliada pela construção de um intervalo de confiança de 90% para a razão das médias geométricas entre os produtos teste e referência, utilizando dois testes unicaudais correspondentes à hipótese nula de bioinequivalência, com nível de significância de 5%. Para as duas formulações serem consideradas bioequivalentes, o intervalo de confiança para a razão das médias deve estar entre 80-125% para a ASC e 70-143% para Cmax (FDA, 1995).

Para aplicação do método este precisa ser validado, demonstrando que o perfil de concentração no EC córneo reflete a disponibilidade do fármaco no sítio de ação e que as medidas dermatofarmacocinéticas estão relacionadas com o efeito clínico (BOIX-MONTANES, 2011). O primeiro ponto é facilmente atendido para fármacos que atuam diretamente no EC, como antifúngicos e antivirais, mas para fármacos que possuam outros alvos que não o EC e a contribuição de outras vias para sua liberação no sítio de ação, estudos específicos são demandados. Entretanto, como o EC é usualmente a principal resistência à penetração de fármacos aplicados topicamente, tem sido discutido que os níveis de fármaco presentes nessa barreira devem estar correlacionados com aqueles presentes no sítio de ação (HERKENNE, 2008).

O guia do FDA foi retirado em maio de 2002, após obtenção de resultados contraditórios obtidos de dois laboratórios independentes utilizando tretinoína gel, o que levantou dúvidas sobre a adequação da metodologia considerando medicamentos tópicos cujo sítio de ação não é o EC e os mecanismos de penetração não são a difusão pelo EC (FDA, 2002).

Os problemas práticos associados com a aplicação do estudo dermatofarmacocinético tal como descrito no guia do FDA são: variabilidade da quantidade de EC coletado em cada fita; variabilidade associada com a quantidade de fármaco que é descartada nas duas primeiras fitas e a variabilidade na efetividade do procedimento de limpeza do excesso da formulação (N'DRI-STEMPFER, 2008).

Diferentes propostas já foram apresentadas para refinar a metodologia primeiramente proposta e quatro pontos parecem ser de extrema relevância: (1) aprimoramento do procedimento de limpeza do excesso de formulação, (2)

quantificação das duas primeiras fitas, (3) padronização da quantidade de EC coletado com a combinação do aumento do número de fitas coletadas e um método que assegure remoção quase completa do EC, (4) área de amostragem localizada no interior da área de aplicação do produto para diminuir efeitos de borda (N'DRI-STEMPFER, 2009).

Existe uma grande discussão com relação ao descarte das duas primeiras fitas adesivas. 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 defendem 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, 2009).

Uma vez que a quantidade de EC coletado nos dois primeiros adesivos é altamente variável, a quantidade de fármaco absorvido presente nestas amostras também pode variar consideravelmente. Conseqüentemente, se o fármaco encontrado nos dois primeiros adesivos é descartado, a quantidade total de fármaco absorvido encontrado pode não representar a realidade (N'DRI-STEMPFER, 2009).

O racional do FDA para sugerir o descarte das duas primeiras fitas foi a possibilidade de incluir fármaco residual proveniente de uma limpeza ineficiente. Porém, a melhor solução para esse caso parece ser garantir uma limpeza efetiva da área e incluir todas as fitas na quantificação.

Stempfer defende a utilização das duas primeiras fitas, descartadas pelo guia do FDA, propondo uma remoção rápida e efetiva do produto aplicado, com a utilização de álcool embebido em algodão (N'DRI-STEMPFER, 2009). A limpeza da área do EC antes da aplicação das fitas deve ser eficiente na remoção do excesso da formulação presente nos sulcos, os quais podem ser mais profundos que a camada de EC e atuar como reservatório (HERKENNE, 2008).

Uma importante fonte de variação do estudo dermatofarmacocinético é ocasionada pela remoção não uniforme do EC. A quantidade de EC removido em uma fita depende de diferentes fatores como o sítio de aplicação, tipo de fita (é aconselhável que o adesivo tenha composição uniforme), modo de

aplicação (força aplicada, velocidade de remoção da fita) e propriedades da formulação que influenciam a quantidade de EC retirada em cada fita (LÖFFLER, 2004). Além desses fatores extrínsecos, a quantidade de EC removido por um único adesivo depende também de fatores intrínsecos, uma vez que o tamanho dos corneócitos é influenciado pelo sítio anatômico, idade e estação do ano (LADEMANN, 2009).

Para diminuir a variabilidade é desejável, portanto, uma remoção uniforme e quase completa do EC, de forma que todo fármaco presente no EC seja quantificado. Porém, uma vez que a espessura total do EC removido de diferentes voluntários (ou até mesmo entre diferentes regiões de um mesmo voluntário) utilizando um número fixo de fitas adesivas pode variar, o número de adesivos utilizados é um indicador pobre da quantidade de tecido removido, devendo ser utilizado em conjunto com uma estimativa da quantidade de EC coletado (N'DRI-STEMPFER, 2009).

Diferentes metodologias podem ser utilizadas para quantificar o EC removido, sendo as principais a gravimetria, onde a massa de EC removido é calculada pela diferença de peso da fita antes da sua aplicação e após a sua remoção (BOIX-MONTANES, 2011); espectroscopia, uma vez que os agregados de corneócitos diminuem a transmissão da luz, o número de camadas celulares coletadas está relacionado com o aumento da absorção (LADEMANN, 2006); microscopia, onde as células são quantificadas por inspeção visual; medida da perda transepidérmica de água (TEWL), onde a medida antes e após a remoção de cada fita adesiva pode ser usada para determinar a quantidade de EC restante (LADEMANN, 2009).

Au et al demonstraram que os valores da ASC normalizados com a espessura do EC, aumenta o poder discriminativo do método dermatofarmacocinético. Um estudo utilizando dois cremes (Dermovate® - Glaxo Wellcome – Midrand, South Africa e Dovate® - Aspen Pharmacare Ltd – Port Elizabeth, South Africa) e uma pomada (Dermovate® - Sekpharma Pty Ltd – Gauteng, South Africa) de propionato de clobetasol 0,05%, foi realizado com 30 voluntários sadios (15 homens e 15 mulheres com idade entre 20 e 36 anos) aplicando 5,5mg/cm² de cada formulação no antebraço dos voluntários. Após duas horas o excesso de formulação foi retirado com dois cotonetes secos e 15 fitas adesivas foram sucessivamente aplicadas no local demarcado e retiradas

com um movimento rápido. Um par de pinças foi utilizado para aplicação de força no adesivo friccionando com movimentos para frente e para trás por 10 vezes de forma a aderir cada fita adesiva uniformemente no local de aplicação do fármaco. Cada adesivo foi extraído individualmente e a quantidade de clobetasol em cada adesivo foi determinada por HPLC (AU, 2010). Os dados da primeira fita foram descartados para se calcular a ASC. A análise dos dois cremes indicou bioequivalência entre eles, utilizando tanto os dados corrigidos para espessura da pele (ASCcorr) como os dados não corrigidos (ASCuncorr) estando o intervalo de confiança de 90% dentro do limite de aceitação de 80-125%. Como esperado o Dermovate® creme não demonstrou bioequivalência com o Dermovate® pomada utilizando o mesmo critério de aceitação. Porém, tal resultado foi encontrado apenas quando utilizados os dados corrigidos (ASCcorr) (AU, 2010).

Outro fator que deve ser considerado para diminuir a variabilidade do estudo dermatofarmacocinético é o controle da área de amostragem (área destinada ao *tape stripping*). Este controle garante que uma mesma área seja amostrada a cada fita e que possíveis erros que possam ter ocorrido nas bordas da área de aplicação (ultrapassagem do limite da área ou não espalhamento adequado) sejam introduzidos no estudo. Tal erro foi identificado como a razão da geração de resultados contraditórios obtidos no estudo dos géis de tretinoína, que levaram a retirada do guia do FDA (PERSHING, 2001; FRANZ, 2001).

Stempfer sugere a restrição da área de aplicação da formulação e da área de amostragem através de moldes como ilustrado na figura 11 (N'DRI-STEMPFER, 2009).

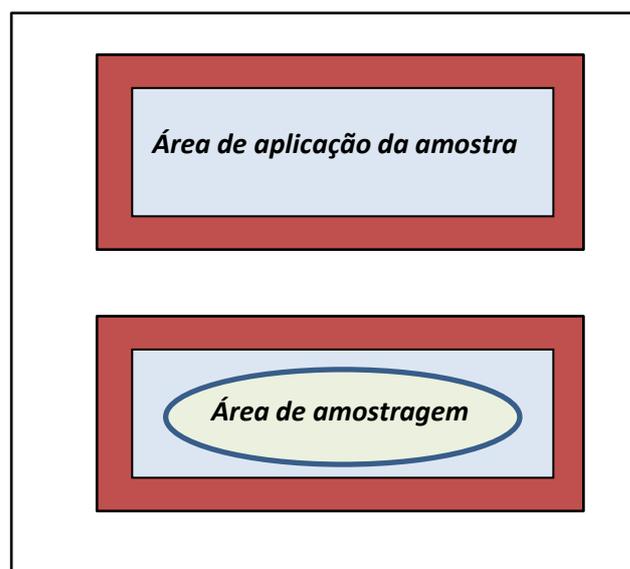


Figura 11: Ilustração da área de aplicação do fármaco e tape stripping

Embora o emprego de diferentes pontos de coleta para avaliar a bioequivalência de produtos orais seja importante (uma vez que a ASC e C_{max} são afetadas pela cinética de absorção do fármaco, sua distribuição, metabolismo e eliminação) este não é o caso de fármacos presentes em formulações tópicas dermatológicas (N'DRI-STEMPFER, 2008). Comparativamente com formulações de uso oral, os mecanismos de absorção e eliminação no EC são simplificados, sendo a absorção caracterizada pela difusão do fármaco através do EC e o particionamento no próprio EC, e a eliminação também controlada pela difusão no EC e pelo particionamento entre o EC e as camadas mais profundas da pele (N'DRI-STEMPFER, 2008). Dessa forma a utilização de quatro pontos de coleta em cada fase não são necessários para determinar a bioequivalência entre dois produtos tópicos, como proposto inicialmente no guia do FDA.

Um estudo com tretinoína em gel demonstrou que apenas um sítio de aplicação para determinar a absorção e um sítio para determinar a eliminação, podem ser usados permitindo uma medição em duplicata dos produtos teste e referência num mesmo indivíduo. Dessa forma, cada voluntário atua como controle de si mesmo, reduzindo a variabilidade intra-sujeito, levando a uma requisição de poucos voluntários para obtenção de um poder estatístico confiável (N'DRI-STEMPFER, 2008; NARKAR, 2010).

Uma simplificação da metodologia, com a utilização de apenas um sítio para comparação da quantidade total de fármaco presente no EC é adotada por alguns pesquisadores e pelo guia do Japão (PARFITT, 2011; JAPAN, 2003). Para determinação do tempo em que o fármaco fica em contato com a pele é realizado previamente um estudo piloto com construção de uma curva dose-reposta para definição do tempo onde uma sensibilidade máxima, capaz de diferenciar formulações, é alcançada (PARFITT, 2011).

Uma das críticas da metodologia do estudo dermatofarmacocinético, em analisar a bioequivalência entre duas formulações, é sua relevância clínica. No entanto, Pershing conduziu um estudo com 49 voluntários, comparando um produto clinicamente equivalente e outro inequivalente com relação ao produto referência. O produto terapeuticamente equivalente demonstrou bioequivalência pelo método dermatofarmacocinético enquanto o inequivalente demonstrou bioinequivalência, evidenciando assim a relevância clínica da metodologia dermatofarmacocinética (PERSHING, 2003).

Ainda de forma a avaliar a relevância clínica da metodologia dermatofarmacocinética, um estudo comparando o modelo farmacodinâmico adotado para analisar a bioequivalência de corticosteróides e a metodologia dermatofarmacocinética foi conduzido com diferentes formulações de propionato de clobetasol 0,05% (TSAI, 2004). Duas pomadas genéricas e quatro cremes genéricos foram comparados com as formulações creme e pomada do medicamento referência Dermovate®. A resposta de branqueamento foi avaliada em 24 voluntários sadios (12 homens e 12 mulheres com idade entre 22 e 41 anos) nos tempos de 0, 2, 4, 6, 11 e 24 horas após a remoção do produto. O estudo dermatofarmacocinético foi conduzido com seis voluntários sadios, aplicando 20 µL de cada produto em uma área de 2 x 2 cm² em ambos os braços. Após 0,5 h da aplicação, a formulação residual foi removida com algodão e lavagem com líquido de limpeza facial. Após secagem por 5 minutos, utilizando um secador de cabelo, 11 adesivos foram utilizados de forma sucessiva para retirada do EC. A quantidade de fármaco presente em 10 fitas (a primeira foi descartada) foi dosada em HPLC-UV a 240 nm. A bioequivalência baseada no intervalo de confiança de 90% de 80-125% foi demonstrada para apenas uma das pomadas no ensaio dermatofarmacocinético (pomada C), embora para a outra pomada

(pomada B) não tenha sido detectada diferença na resposta de branqueamento. A falta de correlação entre a resposta farmacodinâmica e o estudo dermatofarmacocinético com a pomada B reflete a saturação da resposta farmacodinâmica. Apesar da avaliação farmacodinâmica ter demonstrado bioequivalência entre a pomada B e a Dermovate® pomada, tais formulações podem não ser bioequivalentes. A diferença entre a pomada B e pomada referência também foi observada em teste *in vitro* (TSAI, 2002). Nenhuma das quatro formulações em creme testada demonstrou bioequivalência (TSAI, 2004).

2.3.4 – Microdiálise

Outra técnica descrita na literatura para comparar a permeação de diferentes formulações, contendo o mesmo fármaco, é a microdiálise. Esta técnica, minimamente invasiva, permite o monitoramento contínuo da velocidade e extensão da penetração do fármaco na pele. Por meio de uma sonda inserida na derme ou subderme, paralelamente à superfície da pele, perfundida com solução fisiológica, se faz uma amostragem *in vivo* das substâncias endógenas e exógenas presentes no fluido extracelular. A sonda atua como um vaso artificial, permitindo a troca por difusão passiva de pequenas moléculas do fluido extracelular para dentro da sonda e vice-versa, dependendo do gradiente de concentração, figura 12 (HERKENNE, 2008). Desta forma, similarmente aos estudos de absorção oral, este método pode fornecer perfis de concentração *versus* tempo, permitindo medidas farmacocinéticas.

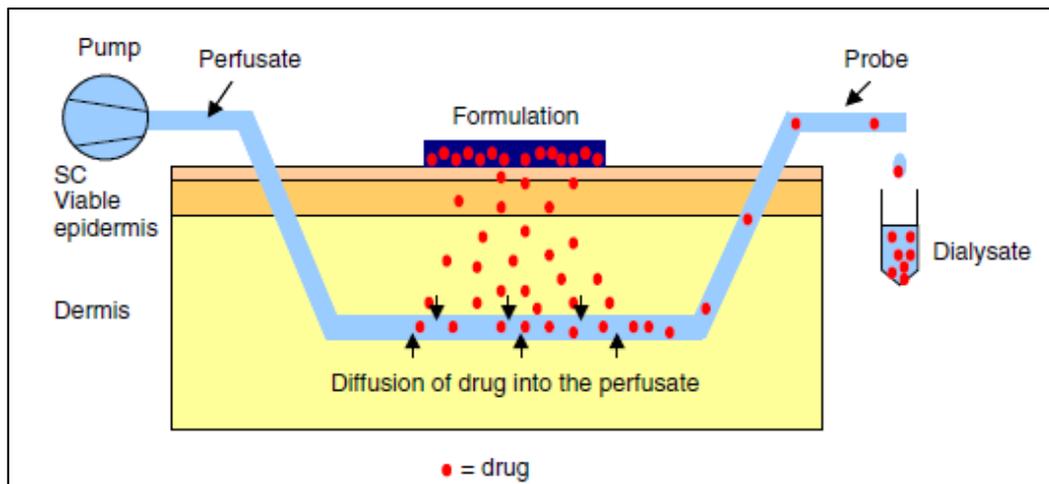


Figura 12: Representação esquemática do princípio da técnica de microdiálise (WIEDERSBERG, 2008)

A técnica de microdiálise apresenta algumas dificuldades técnicas. A recuperação é baixa para fármacos altamente lipofílicos e altamente ligados a proteína; métodos analíticos sensíveis são necessários devido à baixa recuperação do fármaco; a introdução da sonda requer treinamento especial para se alcançar uma determinada profundidade na pele, podendo causar trauma tecidual e levar a uma resposta inflamatória; a técnica apresenta alta variabilidade, resultando em coeficientes de variação entre 50 e 100% (NARKAR, 2010).

A alta variabilidade da técnica de microdiálise, frente ao ensaio dermatofarmacocinético, foi demonstrada por Ortiz em um estudo que avaliou a bioequivalência de três formulações de metronidazol (Flagyl® 1% - Aventis Pharma A/S, Denmark; Metronidazol® 1% - Alpharma ApS, Denmark e Rozex® 0,75% - Galderma Nordic AB, Sweden) (GARCÍA, 2010). Uma quantidade de 4 mg/cm² de cada formulação foi aplicada no antebraço de 14 voluntários sadios (sete homens e sete mulheres com idade entre 22 e 58 anos) numa área de 3 x 3,6 cm do braço esquerdo para os testes de microdiálise e 2,2 cm de diâmetro no braço direito para os testes de *tape stripping* (GARCÍA, 2010). Para o estudo de microdiálise três sondas foram inseridas em paralelo após anestesia local (xilocaína 1%) para reduzir os efeitos vasculares do trauma. As amostras foram coletadas a cada 20 minutos num intervalo de tempo de 5 horas, utilizando como perfusato solução salina isotônica com fluxo de 1,2 µL/min. Após o experimento, a espessura da pele e a profundidade de cada sonda

foram avaliadas (GARCÍA, 2010). O ensaio dermatofarmacocinético consistiu de coleta das amostras após 30 e 120 minutos, utilizando um total de 12 adesivos, descartando os dois primeiros. Após 15 minutos de descanso foram realizadas medidas da perda transepidérmica de água (GARCÍA, 2010). As amostras foram analisadas por HPLC acoplado a espectrofotômetro de massas. Nenhuma diferença entre os três cremes foi identificada pela técnica da microdiálise, porém o estudo apresentou uma variabilidade muito elevada, não sendo possível concluir pela bioequivalência entre os produtos. Pela metodologia dermatofarmacocinética a variabilidade foi menor podendo se concluir pela bioequivalência do medicamento teste Metronidazol® frente ao produto referência Flagyl® e bioinequivalência do medicamento Rozex® (GARCÍA, 2010). Este resultado poderia ser esperado uma vez que a formulação do Rozex® apresenta uma menor concentração de metronidazol (0,75%) que as outras duas formulações (1%).

Por ser fisiologicamente comparável com a pele humana, a pele de porco vem sendo proposta para realização da técnica de microdiálise (WEI, 2007). Um estudo, utilizando seis porcos Suzhong, com 20-30 dias de idade e pesando 5,5-6,5 kg, comparou três cremes de aciclovir 3% (WEI, 2012). Os porcos foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de uretano 3 mL/kg, 30 minutos antes de iniciar o experimento. No dorso do animal foram inseridas paralelamente três sondas cuja profundidade foi determinada utilizando um scanner. 0,2 g/cm² de cada formulação foi aplicada numa área de 1,5 x 2 cm² e as amostras foram coletadas a cada 30 minutos por 4 horas (WEI, 2012). A concentração de aciclovir no dialisado foi medida utilizando HPLC. Tanto C_{max} quanto ASC_{0-4h} para o creme 1 foram significativamente maiores que os outros dois cremes, sugerindo que o creme 1 não é bioequivalente aos cremes 2 e 3. Os cremes 2 e 3 se mostraram bioequivalentes entre si, apesar da liberação *in vitro* do creme 2 ser maior que o creme 3. Em um estudo de liberação *in vitro* utilizando membrana de celulose com os 3 cremes de aciclovir, os cremes 1 e 2 tiveram maior liberação que o creme 3, não sendo neste caso a liberação tópica do fármaco na derme predita pelo estudo *in vitro*, o que se deve a eventos como a penetração no EC e a difusão dentro da derme (WEI, 2012).

2.3.5 - Outras metodologias

Outras metodologias vêm sendo aplicadas para comparar diferentes formulações tópicas. Um estudo cruzado paralelo utilizando 4 mini-porcos de laboratório (2 machos e 2 fêmeas) foi realizado para comparar duas formulações de tacrolimus pomada 0,1% de dois fabricantes diferentes (Protopic® da Astellas Toyama Co - Toyama, Japão e Guizhou Hongqi Pharmaceutical Co. - Guizhou, China). A concentração do fármaco no sangue e na pele foi determinada, após aplicação tópica, por HPLC-ESI-MS/MS, avaliando e comparando a penetração e liberação do fármaco das duas formulações (MA, 2013).

A avaliação do conteúdo de fármaco no sangue foi obtida com a aplicação dos medicamentos, na porção dorsolateral, na dosagem de 0,5mg de tacrolimus (0,5g pomada)/Kg. Foi coletado 1mL de sangue da veia da orelha após 2, 4, 6 e 8h do tratamento.

A avaliação do conteúdo de fármaco na pele foi obtida com a divisão em 10 partes (5 de cada lado) da porção dorsolateral do animal. 2g da pomada Protopic® foi aplicada em quatro partes do lado esquerdo e a outra pomada aplicada em quatro partes do lado direito. Depois de decorrido o tempo de 2, 4, 6 e 8h de aplicação, a pomada foi removida. O animal foi sacrificado e a pele dissecada e homogeneizada. As amostras foram congeladas a -20°C, até o momento da extração do tacrolimus (MA, 2013).

A concentração de tacrolimus em todas as amostras de sangue analisadas foi menor que 0,1ng/mL, com 53% das amostras abaixo do limite de detecção (0,005ng/ml), o que significa que o tacrolimus presente em ambas as pomadas penetra dificilmente na pele intacta (MA, 2013). As concentrações de tacrolimus na pele foram semelhantes para as duas pomadas, o que indica que as duas pomadas liberam quantidades de fármacos semelhantes, em velocidades semelhantes (MA, 2013).

3- OBJETIVOS:

3.1- Objetivo geral:

- Traçar um panorama da atual situação dos medicamentos tópicos registrados no Brasil e propor uma metodologia *in vitro* simplificada para avaliação das formulações tópicas.

3.2- Objetivos específicos:

- Fazer um levantamento das formulações tópicas com registro válido e dos estudos realizados no momento do registro;
- Fazer um levantamento dos estudos necessários internacionalmente, para o registro de medicamentos tópicos;
- Fazer um levantamento bibliográfico dos ensaios descritos na literatura para medicamentos tópicos e avaliar sua viabilidade;
- Avaliar e comparar parâmetros físico-químicos (pH, viscosidade, teor, e densidade) de diferentes formulações, disponíveis no mercado Brasileiro, contendo o fármaco propionato de clobetasol;
- Comparar a liberação *in vitro* do propionato de clobetasol, presente em diferentes formulações disponíveis no mercado brasileiro;
- Comparar a permeação *in vitro* das diferentes formulações de clobetasol, por dois métodos de permeação distintos.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS:

4.1 – Levantamento teórico

Com o objetivo de traçar um panorama da atual situação dos medicamentos tópicos registrados no Brasil, foi realizado um levantamento desses medicamentos por meio da base de dados i-Helps e do sistema DATAVISA.

O i-Helps é uma base de dados que reúne as publicações do Diário Oficial da União (DOU), contendo todos os medicamentos registrados no Brasil desde 1978. Essa base permite filtrar os medicamentos com registros atualmente válidos (IR-produtos consolidados) e realizar buscas com palavras chaves. O levantamento nessa base de dados foi realizado filtrando apenas os medicamentos com registros válidos até 2013, utilizando as seguintes palavras chaves correspondentes às formulações tópicas: creme, pomada, gel, emulsão, loção, pó, solução, suspensão, adesivo, esmalte, aerossol, óvulo, sabonete, xampu e supositório.

O sistema DATAVISA é o sistema interno de cadastramento de dados da ANVISA, que reúne dados sobre o cadastro de produtos e empresas, além de controlar a tramitação e arquivo dos documentos na Agência. Todos os produtos sob regulamentação da ANVISA, têm sua composição descrita nesse sistema. No caso de medicamentos, há informações sobre a composição de sua formulação, forma farmacêutica, apresentações registradas, empresa detentora do registro, validade do registro, especificações de embalagem, cuidados de conservação, restrições de venda, entre outras informações. O sistema DATAVISA foi utilizado para confirmar os dados levantados na base i-Helps.

Neste trabalho os medicamentos tópicos foram divididos em duas classes: medicamentos contendo um único fármaco (simples) e medicamentos contendo dois ou mais fármacos em associação. Os medicamentos simples de uso tópico foram classificados conforme sua forma e classe farmacêutica.

Considerando apenas os medicamentos simples de uso tópico registrados pela ANVISA, foi realizada uma busca no *Orange Book*, disponível

no *website* do FDA (FDA, 2013) pelo nome do fármaco, de forma a comparar o número dos registros concedidos pelos dois órgãos reguladores (FDA e ANVISA).

Estudos de bioequivalência de medicamentos tópicos, contendo os fármacos presentes nos medicamentos simples, foram levantados por meio da base de dados *PubMed*. Foram utilizadas como palavras chaves os nomes dos fármacos e as palavras: bioequivalência, absorção, permeabilidade, eficácia e equivalência.

4.2 – Produtos

Um total de sete cremes e sete pomadas, contendo propionato de clobetasol 0,05%, foi obtido no comércio local. Dipropionato de beclometasona USP (lote MOL276, teor 99,8%) foi utilizada como padrão interno. Propionato de clobetasol USP (lote H0K292, teor 99,6%) foi utilizado como padrão analítico. Todos os solventes e reagentes, utilizados nas análises, foram de grau analítico.

4.3 – Equivalência Farmacêutica

Os testes de equivalência farmacêutica foram conduzidos em um centro de equivalência certificado pela ANVISA – EQFAR 057. Os testes foram realizados conforme a monografia farmacopeica do produto descrita na USP e a atual legislação brasileira, sendo realizados todos os testes capazes de evidenciar diferenças entre as formulações (teor, viscosidade, densidade e pH).

4.3.1 - Teor

4.3.1.1 - Condições cromatográficas:

Coluna: Spherisorb ODS2, C-18, 5 μ m (150 μ m x 4,6mm)

Temperatura da coluna: 25°C

Detector: UV a 240nm

Fase móvel: Acetonitrila + metanol + tampão pH 5,5 (95:20:85)

Fluxo: 1,0 mL/min

Volume de injeção: 10 µL

4.3.1.2 - Preparo da solução tampão e fase móvel

Solução tampão pH 5,5: Para um béquer de 1000 mL foram transferidos 6g de fosfato de sódio monobásico. Foram adicionados 900 mL de água e o pH da solução foi ajustado para 5,5 utilizando hidróxido de sódio 50%. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 1000 mL e o volume completado com água.

Fase móvel: Foram transferidos 850 mL da solução tampão pH 5,5 para um frasco de 2000 mL. Foram adicionados 950 mL de acetonitrila e 200 mL de metanol. A solução foi homogeneizada e filtrada através de membrana PVDF de 0,45µm.

4.3.1.3- Preparo da solução de padrão interno – dipropionato de beclometasona 0,20mg/mL

20 mg do padrão USP de dipropionato de beclometasona foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL. O padrão foi solubilizado e o volume completado com metanol 100%.

4.3.1.4- Preparo da solução padrão de propionato de clobetasol

1,0 mg de propionato de clobetasol padrão USP foi transferido para um balão volumétrico de 25 mL. O fármaco foi solubilizado com 10,0 mL da solução de padrão interno e 10 mL de metanol 100%. O volume do balão volumétrico foi completado com metanol.

Concentração final: 0,04mg/mL de propionato de clobetasol e 0,08mg/mL de dipropionato de beclometasona.

O padrão foi preparado em duplicata: solução padrão 1 e solução padrão 2.

4.3.1.5 - *Preparo da solução de System suitability*

Solução de propionato de clobetasol composto relatado A – 0,05 mg/mL:
5,0 mg de propionato de clobetasol composto relatado A padrão USP foram transferidos para um balão volumétrico de 100 mL. O padrão foi solubilizado e o volume completado com fase móvel.

Solução de propionato de clobetasol 0,1mg e propionato de clobetasol composto relatado A 0,001mg/mL: 10,0 mg de propionato de clobetasol padrão USP foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL. 70 mL de fase móvel foram adicionados ao balão para solubilização da substância. 2,0 mL da solução de propionato de clobetasol composto relatado A foram transferidos para o balão e volume completado com fase móvel.

4.3.1.6 - *Preparo da amostra*

2,0 gramas de amostra foram transferidas para frasco com tampa. Foram transferidos volumetricamente 10,0mL da solução de padrão interno e 15,0mL de metanol 100%. A amostra foi agitada mecanicamente durante 30 minutos para dispersar o creme/pomada e em seguida a amostra foi centrifugada a 3500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado através de membrana PVDF de 13mm e 0,45µm.

Concentração final: 0,04mg/mL de propionato de clobetasol e 0,08mg/mL de dipropionato de beclometasona

4.3.1.7 - *Verificação do sistema cromatográfico*

Para verificação do sistema cromatográfico duas soluções padrão de propionato de clobetasol e PI foram preparadas (solução padrão 1 e 2). Foi realizada uma injeção da solução padrão 1 utilizando as condições cromatográficas citadas e os seguintes parâmetros foram avaliados para o pico principal: resolução entre picos e eficiência da coluna.

Em seguida foram realizadas mais 5 injeções da solução padrão e o desvio padrão relativo das áreas das 6 injeções foi determinado. Para

prosseguimento da análise foi determinado um valor menor ou igual a 2,0% para o desvio padrão relativo (USP 37, 2014).

A solução padrão 2 foi injetada 2 vezes para determinação do fator de recuperação, em relação a solução padrão 1. Para prosseguimento da análise foi determinado que o fator de recuperação deve estar entre 98,0 e 102,0% (USP 37, 2014).

A resolução entre o propionato de clobetasol e o propionato de clobetasol composto relatado A foi maior que 1,5 e a eficiência da coluna para o pico de propionato de clobetasol foi maior que 5000 pratos teóricos e o fator de cauda menor que 2,0, obedecendo aos critérios farmacopeicos (USP 37, 2014).

O tempo de retenção relativo é 1,0 para propionato de clobetasol e 1,1 para propionato de clobetasol composto relatado A.

Após a obtenção das condições ideais para a análise, a análise foi prosseguida com a injeção da amostra.

4.3.1.8 – Cálculo

O percentual de propionato de clobetasol encontrado em cada formulação, em relação ao valor declarado, foi calculado por meio da fórmula abaixo:

$$\frac{AA/A_{pi}(am)}{AP/A_{pi}(pd)} \times \frac{MP}{DP} \times PPD \times \frac{DA}{MA} \times \frac{1}{CT} \times 100 = \% \text{ Propionato de Clobetasol em relação ao declarado.}$$

Onde:

AA: Área do pico do ativo na solução amostra;

A_{pi}(am): Área do pico do padrão interno na solução amostra;

AP: Área do pico do ativo na solução padrão;

A_{pi}(pd): Área do pico do padrão interno na solução padrão;

MP: Tomada de ensaio do padrão em mg;

DP: Diluição do padrão;

PPD: Potência do padrão tal qual em decimal;

DA: Diluição da amostra;

MA: Tomada de ensaio da amostra em g;

CT: Concentração teórica em mg/g.

4.3.2 – Densidade

Para determinar a densidade das diferentes formulações foi utilizado um picnômetro específico para cremes e pomadas, previamente calibrado, com capacidade de 25 mL. A calibração do picnômetro foi realizada com a determinação da massa do picnômetro vazio e da massa de seu conteúdo com água ultrapura a 23°C.

A amostra foi colocada no picnômetro e a temperatura ajustada para 23°C. O excesso de formulação foi removido e o picnômetro contendo a amostra foi pesado. O peso da amostra foi obtido através da diferença de massas do picnômetro cheio e vazio.

A densidade da formulação foi calculada conforme fórmula abaixo:

$$D = \frac{(MAm - MV)}{(MH2O - MV)} \times 0,998$$

Onde:

D = Densidade da amostra em g/mL

MAm: Massa, em gramas, do picnômetro com amostra;

MV: Massa, em gramas, do picnômetro vazio;

MH2O: Massa, em gramas, do picnômetro com água a 23°C;

0,998: Fator de densidade para água a 23°C

4.3.3 – Viscosidade

Para determinação da viscosidade foi utilizado o viscosímetro Brookfield RVT. 100 mL de amostra foi transferida para um béquer de 100 mL. A temperatura da amostra foi acertada (quando necessário) para $25 \pm 1^\circ\text{C}$, utilizando um banho de aquecimento e agitação lenta. A rotação foi ajustada

para 2 rpm e o spindle para RV6. O aparelho foi acionado e após estabilização, o valor foi registrado.

4.3.4 – pH

0,5 gramas de amostra foram pesados para um frasco com tampa de 50 mL. Foi adicionado 25 mL de água ultrapura e após uma agitação magnética vigorosa, durante 20 minutos, foi efetuada a leitura de pH.

4.4 – Liberação *In Vitro*

4.4.1– Testes de Solubilidade

Para determinar o meio receptor a ser utilizado nos testes *in vitro* de liberação e permeação, a solubilidade do propionato de clobetasol foi determinada pela adição de um excesso do fármaco a seis meios diferentes (n=3): 1) tampão fosfato (PBS) pH7,4; 2) PBS pH 7,4 + 0.5% Tween® 20; 3) PBS pH7,4 + 0.5% β-ciclodextrina; 4) tampão acetato de sódio pH 4,5; 5) tampão acetato de sódio + 0,5% Tween® 20; 6) tampão acetato de sódio + 0,5% β-ciclodextrina. Os diferentes meios contendo o fármaco foram mantidos sob 37°C em agitação durante 24h. Os meios foram então filtrados e o fármaco dissolvido quantificado. O tampão fosfato e acetato de sódio foram preparados conforme a Farmacopéia Brasileira (ANVISA, 2010b).

4.4.2 – Teste de Liberação *in vitro*

O perfil de liberação *in vitro* do fármaco foi avaliado em equipamento de difusão tipo Franz (Microette Plus® auto sampler – Hanson Research, Chatsworth, California) (figura 13).



Figura 13: Equipamento de difusão tipo Franz Microette Plus Auto Sampler® - Hanson Research

O compartimento receptor foi preenchido com 7mL do meio receptor, escolhido pelo teste preliminar de solubilidade, em um sistema composto de seis células individuais. O meio receptor foi mantido a $32 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ sob agitação constante de 400rpm. 300mg de cada formulação, equivalente a 0,15mg de propionato de clobetasol, foi aplicada na membrana de éster de celulose (Millipore HA) com $0,1\mu\text{m}$ de diâmetro de poro e área difusional de $1,77\text{cm}^2$. Para caracterizar o perfil cinético de liberação, uma alíquota de 1mL do meio receptor foi coletado automaticamente nos tempos de 2, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 18 e 24 horas, para as formulações em creme e nos tempos de 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas para as formulações em pomada. O compartimento receptor foi repostado por igual volume de meio fresco após cada amostragem. As amostras foram quantificadas por LC-MS/MS.

4.4.3 - Preparo da amostra para quantificação

As amostras da liberação *in vitro* foram preparadas por meio de uma diluição com metanol 50% na proporção de 1:5, ou seja, 100 μL da amostra para 400 μL de metanol 50%. Em seguida, adicionou-se 25 μL do padrão interno beclometasona 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A diluição foi necessária para diminuir a

quantidade de íons fosfatos injetados no espectrômetro de massas, o que poderia prejudicar o equipamento.

4.4.4 - Cálculo da velocidade de liberação *in vitro*

A velocidade de liberação das diferentes formulações, em creme e em pomada estudadas, foi calculada com a construção de um gráfico da quantidade de clobetasol liberada por unidade de área da membrana ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função da raiz quadrada do tempo (horas). A plotagem desses dados produz uma linha reta. O *slope* (coeficiente angular) da regressão linear dessa reta representa a velocidade de liberação do produto (HIGUCHI, 1962).

4.4.5 - Comparação das velocidades de liberação *in vitro*

Para comparar a velocidade de liberação das diferentes formulações foi realizado o teste estatístico não paramétrico Wilcoxon Rank Sum/Mann-Whitney que compara as medianas das velocidades de difusão dos produtos (FDA, 1997).

Os dados também foram analisados por meio do teste t de Student (95% CI) com análise prévia da presença de *outliers* pelo teste de Grubbs, com nível de significância de 0,05 (bilateral).

4.5 – Permeação *in vitro*

4.5.1 – Obtenção e preparo da pele

No teste de permeação foram utilizadas orelhas de porco doadas gentilmente por um abatedouro local (BONASA – Asa Alimentos, São Sebastião, Brasil). As orelhas foram removidas imediatamente após a morte do animal e antes da escalda. As orelhas foram lavadas com água e detergente neutro e a pele foi removida com a utilização de um bisturi. Os pelos foram removidos com o uso de uma tesoura e a pele cortada no tamanho adequado

para utilização posterior na célula de Franz que foi utilizada (figura 14). A pele foi estocada a -20°C por no máximo 15 dias.



Figura 14: Preparo da pele para utilização no teste de permeação

4.5.2 – Teste de permeação

O teste de permeação *in vitro* foi realizado utilizando duas metodologias diferentes, uma tradicional que se baseia na quantificação do fármaco presente no EC (por meio da técnica de *tape stripping*) e na pele remanescente (derme + epiderme) e outra simplificada, proposta neste estudo, quantificando o fármaco presente na pele total, sem separação de nenhuma camada da pele.

O teste de permeação, utilizando pele de orelha de porco, foi conduzido em uma célula de Franz modificada com 5.72cm² de área difusional e um compartimento receptor de 70 mL (figura 15).



Figura 15: Célula de difusão de Franz modificada utilizada no ensaio de permeação *in vitro*

O estudo de permeação *in vitro* foi realizado aplicando, de maneira uniforme, um grama de cada formulação sob a pele de porco, previamente preparada. O meio receptor foi preenchido com 70 mL do mesmo meio receptor utilizado no estudo de liberação e foi mantido sob agitação constante a 400 rpm e $32 \pm 1^\circ\text{C}$, por 3 horas. Um total de seis células foram utilizadas para cada formulação teste. Para a formulação referência foram utilizadas 12 células. Após cada experimento a superfície da pele foi limpa duas vezes com algodão para remover o excesso de formulação. A pele foi em seguida submetida a um processo de secagem sem calor com o uso de um secador de cabelo por 5 minutos, numa altura de 10 cm da superfície da pele. Após secagem, a pele foi dividida ao meio com o auxílio de uma faca customizada, de forma que em cada metade pudesse ser utilizada uma metodologia de quantificação (metodologia tradicional com quantificação do fármaco presente no EC e pele remanescente e metodologia simplificada proposta neste estudo, quantificando o fármaco presente na pele total) e no final as duas metodologias pudessem ser comparadas (figura 16).

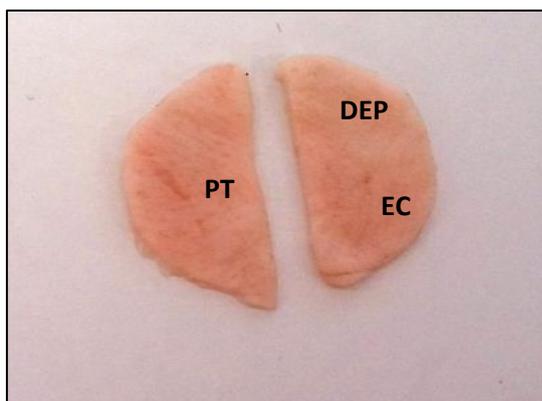


Figura 16: Divisão da pele para análise do estrato córneo (EC), derme e epiderme (DEP) e pele total (PT)

Em uma das metades da pele, o EC foi removido utilizando a técnica de *tape stripping*. Foram utilizadas um total de 15 fitas adesivas (Scotch Book Tape nº 845 - 3M, St Paul, MN, USA). As fitas foram colocadas em tubos eppendorfs para posterior quantificação. A pele remanescente, composta de epiderme e derme, foi pesada e em seguida picotada em pequenos pedaços. A outra metade da pele, que não sofreu o procedimento de *tape stripping* (pele total composta de EC, derme e epiderme), também foi pesada e picotada. Os pedaços da pele remanescente, assim como da pele total, foram colocados em dois eppendorfs diferentes para posterior extração e quantificação.

4.5.3 – Determinação do tempo de ensaio

O tempo de duração do estudo de permeação *in vitro* foi determinado com um experimento conduzido apenas com a pomada referência. O experimento foi realizado conforme o procedimento descrito acima, quantificando o EC e a pele remanescente (derme e epiderme). Os tempos avaliados foram 0,5; 1; 2; 4 e 6 horas. O tempo escolhido foi o maior tempo observado antes de se atingir o platô de concentração.

4.5.4 – Procedimento de extração do clobetasol nas fitas e pele

O fármaco, presente nas fitas de *tape stripping* e pele, foi extraído por método previamente validado, com a adição de 1mL de metanol 100% nos *ependorfs* contendo as fitas ou as peles picotadas. As amostras foram mantidas sob agitação (Vibrax®, VXR B, IKA, Staufen, Germany) por 3 horas e centrifugadas por 5 minutos a 3000 rpm (Centrifuga 5424, Eppendorf, AG, Hamburg, Germany). As amostras foram quantificadas por LC-MS/MS por método previamente validado.

4.5.5 – Análise dos dados

Os dados encontrados para cada fração de pele estudada (EC, derme e epiderme e pele total) foram avaliados individualmente e comparados entre as diferentes formulações. Para análise estatística dos dados foi realizado o teste t de Student (95% CI) com análise prévia da presença de *outliers* pelo teste de Grubbs, com nível de significância de 0,05 (bilateral).

Uma avaliação das duas metodologias de permeação *in vitro* foi realizada comparando os valores de massa e fármaco obtidos para a fração de pele total (PT) com o somatório das frações de EC e pele remanescente (derme e epiderme – DEP).

4.6 – Desenvolvimento do Método de Quantificação

As amostras dos testes de liberação e permeação foram quantificadas utilizando um cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massas (LC-MS/MS API 5000, ABSciex, Cingapura).

4.6.1 - Preparo das soluções

4.6.1.1 - *Preparo da solução primária de propionato de clobetasol 250 µg/mL*

2,51 mg do padrão USP de propionato de clobetasol foram pesados para um balão volumétrico de 10mL. O fármaco foi solubilizado e o volume completado com metanol 50%. A solução foi sonificada por 10 minutos. A partir desta solução foram preparadas três soluções mães de 250 ng/mL, 500 ng/mL e 12500 ng/mL.

4.6.1.2 - *Preparo da solução primária de padrão interno – dipropionato de beclometasona 500 µg/mL*

5,01 mg do padrão USP de dipropionato de beclometasona foram pesados para um balão volumétrico de 10mL. O fármaco foi solubilizado e o volume completado com metanol 50%. A solução foi sonificada por 10 minutos. A partir desta solução foi preparada a solução de trabalho de padrão interno de 50µg/mL.

4.6.1.3 - *Preparo das Soluções padrão de calibração*

As soluções padrão foram preparadas conforme as concentrações descritas na tabela 1, utilizando o diluente PBS pH 7.4 + Tween® 20, 0.5% : Metanol 50% na proporção de 1:10. A faixa de linearidade do método foi de 1,25 a 500 ng/mL. Ao longo de cada corrida foram utilizados controle de qualidade nas concentrações de 5 ng/mL (CQB), 50 ng/mL (CQM) e 150 ng/mL (CQA).

Tabela 1: Modo de preparo das soluções de trabalho (curva de calibração e controles de qualidade)

Conc final (ng/mL)	Controle de Qualidade	Tipo	Vol pipetar (µL)	Sol. Mãe (ng/mL)	Balão (µL)
1,25		LIQ	250	250,00	50000
5,00	CQB	2	250	500,00	25000
25,00		3	1250	500,00	25000
50,00	CQM	4	200	12500,00	50000
150,00	CQA	5	300	12500,00	25000
250,00		6	500	12500,00	25000
500,00		LSQ	1000	12500,00	25000

4.6.1.4 - Condições cromatográficas

HPLC – Agilent 1200

Espectrômetro de Massas – API 5000 da ABSciex

Coluna: ACE C₁₈ 100 x 4,6mm i.d 5µm

Fase móvel: 80:20 Acetonitrila (j.t Baker): Ácido Fórmico 0,1%_(j.t Baker)

Fluxo: 1,1 mL/min

Temperatura do auto-injetor: 10°C

Temperatura da Coluna: 20 °C

Volume de injeção: 2 µL

Tempo de Lavagem da Agulha: 5seg

Solução de lavagem da agulha: Metanol 50%

Uso de splitting: sim

Altura da probe: Horizontal 5mm Vertical 2mm

Tempo de corrida: 2,5min

4.6.1.5 - Condições do espectrômetro de massas

O espectrômetro de massas foi operado em modo de ionização por eletronspray positivo (ESI+). Os íons monitorados (Monitoramento Múltiplo de Reação – MRM) são descritos na tabela 2.

Tabela 2: Íons monitorados na quantificação do estudo de liberação e permeação

Analito	Precursor	Produto
Propionato de Clobetasol	467,20	263,00
Dipropionato de Beclometasona	521,00	337,00

A figura 17 apresenta o espectro de massas obtido para o fármaco e seu padrão interno

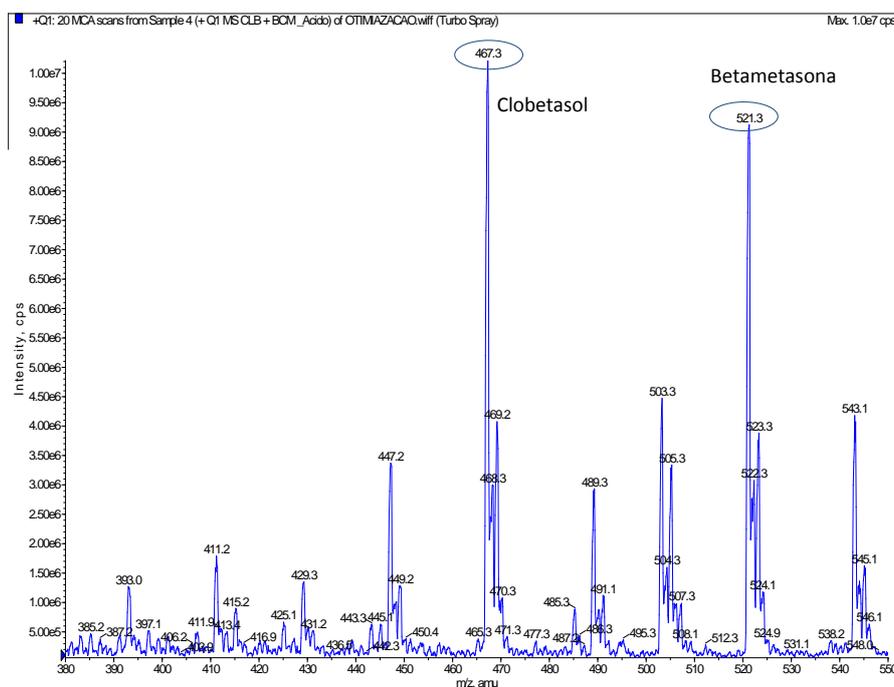


Figura 17: Espectro de massas do analito (propionato de clobetasol) e do padrão interno (dipropionato de beclometasona)

As figuras 18 e 19 apresentam os espectros obtidos da fragmentação dos compostos, clobetasol e beclometasona, respectivamente.

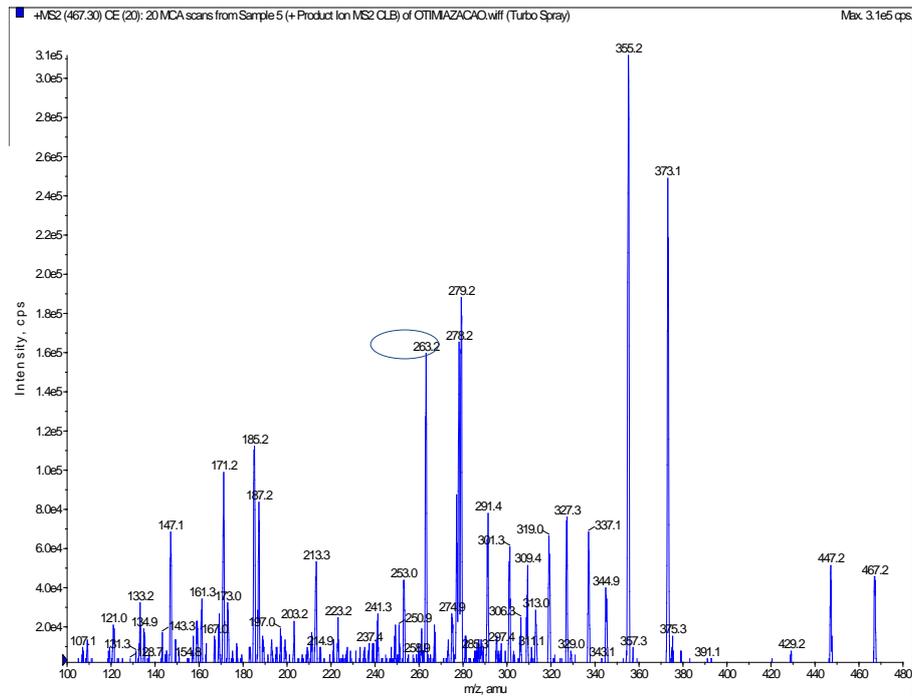


Figura 18: Espectro de massas da fragmentação do composto propionato de clobetasol.

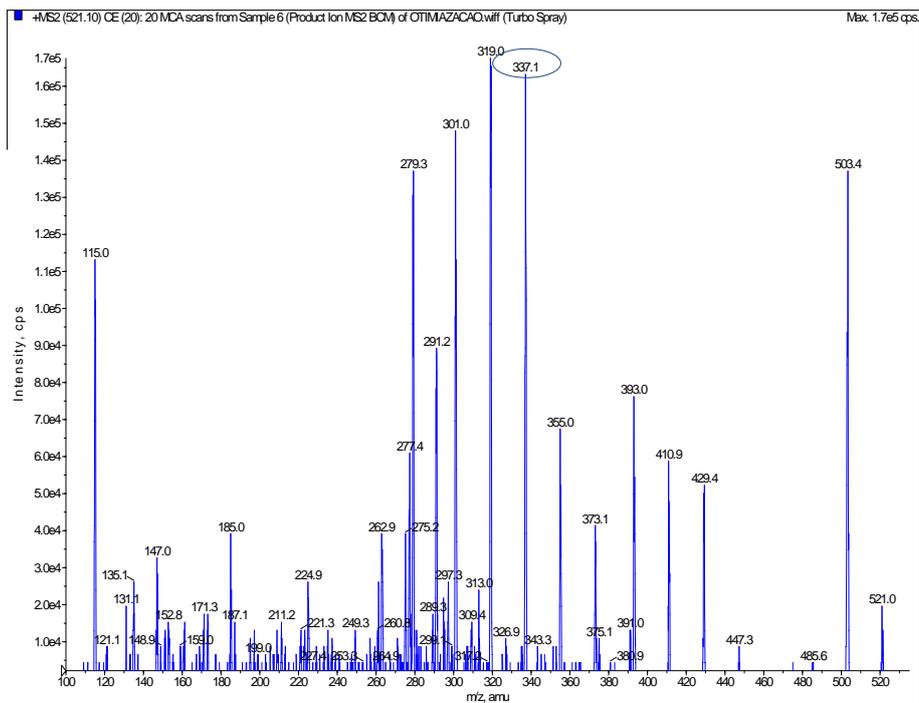


Figura 19: Espectro de massas da fragmentação do composto dipropionato de beclometasona (padrão interno).

4.7 – Validação do método

4.7.1 – Seletividade

A seletividade foi testada em amostras de metanol 50%, metanol 50%: PBS (5:1) + Tween® 20 0,5%, acetonitrila e ácido fórmico 0,1%, fita adesiva utilizada para *tape stripping*, pele remanescente e PT, usando as condições cromatográficas pré-estabelecidas.

4.7.2 – Linearidade

A linearidade foi avaliada a partir de curvas de calibração em triplicata, na faixa de 1,25 a 500 ng/mL.

4.7.3 – Precisão e Exatidão

A precisão e exatidão do método foram determinadas em uma mesma corrida analítica (precisão e exatidão intracorrída) e em três corridas diferentes (precisão e exatidão intercorrídas).

A precisão do método foi avaliada pelo coeficiente de variação conforme fórmula abaixo:

$$CV (\%) = (\text{Desvio padrão}/\text{Média}) \times 100$$

A exatidão do método foi obtida pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente (CME) e a concentração nominal correspondente, conforme fórmula abaixo:

$$\text{Exatidão} (\%) = (\text{CME} / \text{concentração nominal}) \times 100$$

A precisão e exatidão intracorrída do método foi verificada utilizando-se quatro concentrações (LIQ, CQB, CQM e CQA) em triplicata.

A precisão e exatidão intercorrída do método foi verificada utilizando-se quatro concentrações (LIQ, CQB, CQM e CQA) em triplicata, em duas corridas distintas.

4.7.4 – Validação do tempo de extração do clobetasol da pele

Para determinar o tempo de extração do clobetasol, doze amostras de PT foram contaminadas com 500 µL de solução referente ao controle de qualidade alto (CQA – 150 ng/mL). As amostras foram mantidas durante 12 horas em capela para secagem e em seguida foram extraídas com 1mL de metanol 100% sob agitação (Vibrax®, VXR B, IKA, Staufen, Germany) por 0,5; 1; 3 e 6 horas em triplicata. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 3000 rpm (Centrifuga 5424, Eppendorf, AG, Hamburg, Germany) e quantificadas por LC-MS/MS pelo método previamente validado.

4.7.5 - Avaliação da recuperação do procedimento de extração

4.7.5.1 – Amostras contaminadas e extraídas (amostras A)

Seis amostras de *tape stripping*, seis de pele remanescente e outras seis de PT, foram contaminadas com 500µL de solução referente ao controle de qualidade alto (CQA – 150ng/mL). As amostras foram mantidas durante 12 horas em capela para secagem e em seguida foram extraídas com 1mL de metanol 100% sob agitação (Vibrax®, VXR B, IKA, Staufen, Germany) por 3 horas. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 3000 rpm (Centrifuga 5424, Eppendorf, AG, Hamburg, Germany) e quantificadas por LC-MS/MS pelo método previamente validado.

4.7.5.2 – Amostras extraídas e contaminadas (amostras B)

Seis amostras de *tape stripping*, seis de pele remanescente e outras seis de PT, foram extraídas com 1 mL de metanol 100% sob agitação (Vibrax®, VXR B, IKA, Staufen, Germany) por 3 horas. Em seguida as amostras foram contaminadas com 500µL de solução referente ao controle de qualidade alto (CQA – 150ng/mL). As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 3000 rpm (Centrifuga 5424, Eppendorf, AG, Hamburg, Germany) e quantificadas por LC-MS/MS pelo método previamente validado.

O cálculo da recuperação do analito foi realizado comparando-se a área do pico de clobetasol, das amostras extraídas da pele contaminada (amostras A) com as áreas dos picos de clobetasol, cuja adição de analito foi realizada após extração da pele não contaminada (amostras B).

As amostras extraídas e contaminadas (amostras B) foram consideradas como 100% no cálculo da recuperação e comparadas com as amostras extraídas após contaminação (amostras B) conforme o cálculo abaixo.

$$\text{Recuperação} = \text{amostra A} \times 100 / \text{amostra B}$$

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO:

5.1 – Levantamento teórico

Foi encontrado um total de 2220 medicamentos de uso tópico (dermatológico, oftálmico, nasal, capilar, ginecológico, retal e otológico) com registros válidos na ANVISA, sendo 1573 medicamentos simples e 647 medicamentos contendo fármacos em associação. Nesse universo de 2220 medicamentos de uso tópico, 19,4% são medicamentos inovadores, 34,3% dos medicamentos são genéricos, 41,3% referem-se a medicamentos similares e 5% correspondem a medicamentos em que não se aplica o conceito de bioequivalência, ou seja, medicamentos fitoterápicos, dinamizados, específicos e biológicos (figura 20).

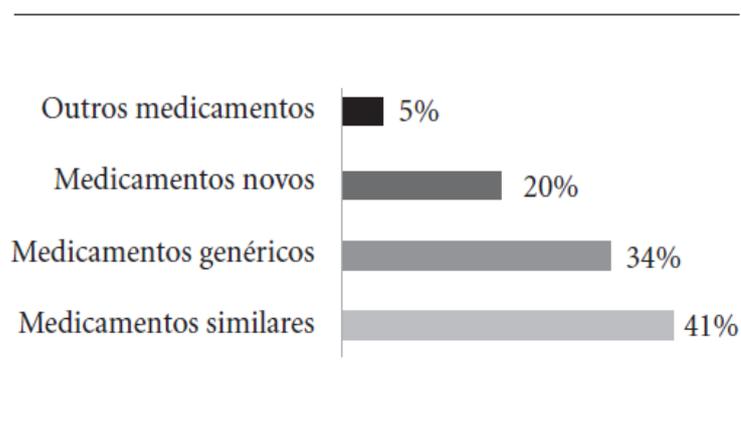


Figura 20: Medicamentos tópicos registrados no Brasil

Dos 1573 medicamentos contendo um único fármaco, a grande maioria (900 produtos) é destinada ao uso dermatológico, sendo 708 deles registrados como cópias (medicamentos genéricos ou similares) e 193 como medicamento referência.

Considerando apenas os medicamentos simples semissólidos, em que a permeação do fármaco é dependente de sua liberação pela base dermatológica, têm-se 625 medicamentos cópias com registros válidos concedidos pela ANVISA e 62 medicamentos novos. Percebe-se com isso o grande predomínio dos medicamentos semissólidos cópias registrados no

Brasil, uma média de 10,25 cópias para cada medicamento referência (figura 21).

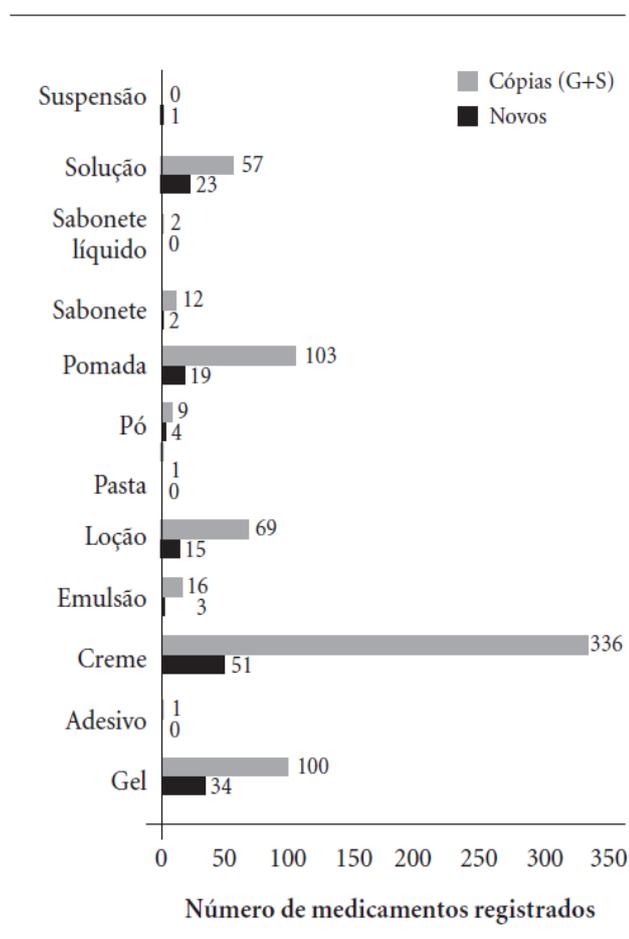


Figura 21: Número de medicamentos tópicos simples registrados no Brasil conforme sua forma farmacêutica

A lista dos medicamentos semissólidos de uso tópico dermatológico, que possuem registro de cópias no Brasil está apresentada na tabela 3. O número de medicamentos genéricos (G) representa aqueles medicamentos para os quais no momento do registro foram apresentados os testes *in vitro* de equivalência farmacêutica. Os medicamentos similares (S) foram registrados sem qualquer estudo de comparabilidade e devem apresentar, até o momento da sua segunda renovação, os mesmos estudos de equivalência farmacêutica exigidos no momento do registro do medicamento genérico. Os medicamentos inovadores (N) são aqueles medicamentos para os quais se apresentou algum estudo clínico no momento do seu registro. A tabela 3 apresenta ainda, a

quantidade de medicamentos tópicos dermatológicos semissólidos, registrados pelo FDA.

Tabela 03: Medicamentos dermatológicos semissólidos de uso tópico, que possuem registros de medicamentos genéricos e similares.

Fármaco	Classe Terapêutica	Referência	Concentração	Forma Farmacêutica	G	S	N	FDA
Aceclofenaco	Antiinflamatório	Proflam® - Eurofarma	15mg/g	creme	3	3	1	-
Aciclovir	Antiviral	Zovirax® - Glaxo	50mg/g	creme	20	18	1	1 N
Adapaleno	Anti-acne	-	1mg/g	gel	5	4	1	1N e 2G
Azelaico ácido	Anti-acne	Azelan® - Intendis	150mg/g	gel		1	1	1N
Benzila Benzoato	Antiparasitário	-	250mg/ml	emulsão	-	14	-	-
		Miticoçan® - Aché	0,2ml/ml	emulsão	-	2	1	-
		-	100mg/ml	loção	-	1	-	-
Benzocaína	Anestésico local	-	200mg/g	gel	-	1	-	-
Benzoila peróxido	Anti-acne	-	100mg/g	gel	-	1	1	-
			50mg/g	gel	-	1	1	-
			25mg/g	gel	-	1	-	-
Betametasona valerato	Glicocorticóide	Betnovate® - Glaxo	1mg/g	creme	8	5	1	2N e 2G
			1mg/g	pomada	8	5	1	1N e 1G
			1mg/g	loção	1	-	1	1N e 2 G

Fármaco	Classe Terapêutica	Referência	Concentração	Forma Farmacêutica	G	S	N	FDA
Betametasona dipropionato	Glicocorticóide	Diprosone® - Aché	0,5mg/g	creme	3	1	1	1N e 2G
			0,5mg/g	pomada	3	-	1	1N e 2G
			0,5mg/ml	loção	3	-	1	4G
Calcipotriol	Glicocorticóide	-	50µg/g	pomada	-	1	1	1G
Cetoconazol	Antimicótico	Nizoral® - Janssen	20mg/g	creme	17	20	1	3G
Cetoprofeno	Anti-inflamatório antirreumático	Profenid® - Sanofi	25mg/g	gel	4	3	1	-
Ciclopirox Olamina	Antimicótico	Loprox® - Sanofi	10mg/g	creme	7	7	1	-
Clindamicina fosfato	Anti-acne	Clinagel® - Stiefel	10mg/g	gel	2	1	1	2N e 1G
								2N e 6G
Clobetasol propionato	Glicocorticóide	Psorex® - Glaxosmith Kline	0,5mg/g	creme	11	6	1	2N e 6G
			0,5mg/g	pomada	11	6	1	1N e 4G
Clotrimazol	Antimicótico	Canesten® - Bayer	10mg/g	creme	10	12	1	3G
Deltametrina	Antiparasitário	-	0,2mg/ml	loção		7	1	-
Desonida	Glicocorticóide	-	0,5mg/g	creme	7	6	-	2N e 1G
			0,5mg/g	pomada	3	3	-	1N e 3G
			0,5mg/g	loção	3	2	-	2G
Dexametasona acetato	Glicocorticóide	-	1mg/g	creme	9	21	-	-

Fármaco	Classe Terapêutica	Referência	Concentração	Forma Farmacêutica	G	S	N	FDA
Dexclorfeniramina maleato	Antialérgico	Polaramine® - Mantecorp	10mg/g	creme	9	4	1	-
Diclofenaco dietilamônio	Anti-inflamatório	Cataflam emugel® - Novartis	11,6mg/g	gel	14	13	1	-
Diclofenaco sódico	Anti-inflamatório	Diclofenaco sódico – SEM	10mg/g	gel	3	3	1	1N
Diclofenaco potássico	Anti-inflamatório	-	10mg/g	gel	-	2	1	-
Eritromicina	Anti-acne	Ilosone® Valeant Farmacêutica	20mg/g	gel	-	2	-	1N e 2G
Fluoruracila	Antineoplásico	-	50mg/g	creme	-	1	-	1N e 2G
Fludrocortida	Glicocorticóide	-	0,125mg/g	creme	-	1	-	-
			0,125mg/g	pomada	-	1	-	-
Fusídico ácido	Antifeccioso	Verutex® - Roche	20mg/g	creme	1	2	1	-
Gentamicina sulfato	Antifeccioso	Garamicina® - Mantecorp	1mg/g	creme	4		1	3G
Hidrocortisona acetato	Glicocorticóide	Berlison® - Intendis	10mg/g	creme	3	4	1	5G
			10mg/g	pomada	4	2	1	4G
Hidroquinona	Desmelanizante	Claripel® - Stiefel	40mg/g	creme	4	6	1	-
			40mg/g	gel	4	4	1	-
Imiquimode	Imunomodulador	-	50mg/g	creme	3	6	1	1N e 7G

Fármaco	Classe Terapêutica	Referência	Concentração	Forma Farmacêutica	G	S	N	FDA
Isoconazol nitrato	Antimicótico	Icaden® - Schering do Brasil	10mg/g	creme	6	1	1	-
Isotipendil cloridrato	Antialérgico	-	7,5mg/g	gel	-	1	-	-
Isotretinoína	Produtos anti-acne	Isotrex® - Stiefel	0,5mg/g	gel	1	-	1	-
Lidocaína	Anestésico local	Xylocaína pomada® - Astrazeneca	50mg/g	pomada	5	8	1	3G
		Dermomax® - Biosintética	40mg/g	creme	3	4	1	-
		Xylocaína geléia® - Astrazeneca	20mg/ml	gel	5	3	1	1N e 3G
Lisozima cloridrato	Produto não enquadrado em classes terapêuticas	-	20mg/g	pomada	-	1	-	-
Miconazol nitrato	Antifúngico	Daktazol® - Brainfarma	20mg/ml	loção	11	9	1	-
		-	20mg/g	creme	11	11	-	-
Mometasona furoato	Glicocorticóide	Elocom® - Mantecorp	1mg/g	creme	7	4	1	2N e 5G
			1mg/g	pomada	6	4	1	1N e 5G
Mupirocina	Antibiótico	Bactroban® - Glaxo	20mg/g	pomada	3	4	1	2N e 5G
		-	20mg/g	creme	-	2	1	1N e 1G

Fármaco	Classe Terapêutica	Referência	Concentração	Forma Farmacêutica	G	S	N	FDA
Neomicina sulfato	Antibiótico	-	5mg/g	pomada	-	3	-	-
		-	3,5mg/g	pomada	1	3	-	-
Nimesulida	Antinflamatório	Nisulid® - Aché	20mg/g	gel	6	6	1	-
Nitrofurural	Antifeccioso		2mg/g	pomada	1	2	1	-
Nitrofurazona	Antifeccioso	Furacin® - Mantecorp	2mg/g	pomada	-	2	-	-
Oxiconazol nitrato	Antimicótico	Oceral® - Bayer	10mg/g	creme	2	2	1	1N
Permetrina	Antiparasitário	Nedax® - Stiefel	50mg/ml	loção	-	7	-	-
		Kwell® - Glaxo	10mg/ml	loção	1	12	1	-
Piroxicam	Antinflamatório	Feldene® - Pfizer	5mg/g	gel	5	1	1	-
Podofilotoxina	Antivirótico	-	1,5mg/g	creme	-	1	-	-
Prata sulfadiazina	Outros produtos com ação na pele e mucosas	-	10mg/g	creme	3	6	-	4N
Prometazina	Antialérgico	CremFenerg an® - Sanofi	20mg/g	creme	2	4	1	-
Salicilato de metila	Analgésico	-	0,044ml/g	pomada	-	1	-	-
Salicílico ácido	Anti-acne	-	0,28g/g	pasta	-	1	-	-
Tacrolimo	Imunomodulador	Protopic® - Roche	0,3mg/g	pomada	1	1	1	1N
		Protopic® - Roche	1mg/g	pomada	1	1	1	1N
Terbinafina	Antimicótico	Lamisil® - Novartis	10mg/g	creme	9	3	2	-

Fármaco	Classe Terapêutica	Referência	Concentração	Forma Farmacêutica	G	S	N	FDA
Tiabendazol	Antiparasitário	-	50mg/g	pomada	4	6	-	-
		-	50mg/ml	loção	1	2	-	-
Tioconazol	Antimicótico	Tralen® - Pfizer	10mg/ml	creme	4	3	1	-
		-	10mg/ml	loção	3	4	-	-
Tretinoína	Anti-Acne	-	1mg/g	gel	-	1	-	1N e 1G
		Vitanol A® - Stiefel	0,25mg/g	creme	-	1	2	2N e 1G
			0,5mg/g	creme	-	1	2	2N e 1G
Tromantadina cloridrato	Antivirótico	-	10mg/g	gel	-	1	-	-
Uréia	Emoliente	Nutraplus® - Galderma	100mg/g	creme	-	1	1	-
		Ureadin® - Medley	200mg/g	creme	-	1	1	-
		Nutraplus® - Galderma	100mg/ml	loção	-	1	1	-

Entre todas as classes farmacêuticas, é possível observar que o número dos registros concedidos no Brasil é superior ao concedido pelo FDA, conforme pesquisado no *Orange Book* disponível no site deste órgão. A figura 22 apresenta uma comparação do número de medicamentos tópicos simples semissólidos dermatológicos registrados no Brasil e nos EUA conforme sua classe farmacêutica.

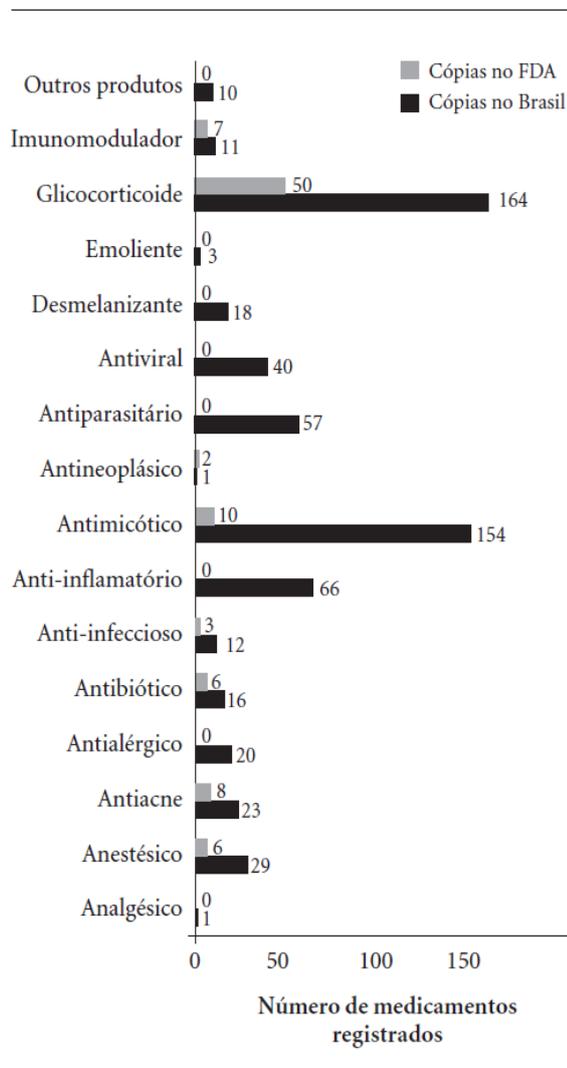


Figura 22: Comparação do número de medicamentos tópicos simples semissólidos dermatológicos registrados no Brasil e no FDA conforme sua classe terapêutica

Enquanto o FDA possui registro de 92 cópias de medicamentos tópicos simples dermatológicos semissólidos, para os quais foi apresentado algum estudo *in vivo*, o Brasil possui 625 formulações registradas para as quais foram realizados apenas ensaios *in vitro* descritos em farmacopeia.

Pode-se observar que a classe farmacêutica dos glicocorticóides é a mais expressiva tanto no Brasil quanto nos Estados Unidos. Uma vez que o FDA requer um teste específico para essa classe específica de fármacos (teste de branqueamento) que pode substituir os estudos clínicos, a obtenção de registro nos EUA dessa classe farmacêutica é facilitada frente às demais classes que necessitam dos estudos clínicos para obtenção do registro.

A flexibilização das exigências regulatórias no âmbito nacional pode ser um dos fatores que reflete no maior número de medicamentos tópicos genéricos disponíveis no mercado brasileiro.

Como pode ser verificado na tabela 4, as legislações internacionais que regulamentam o registro de um medicamento genérico tópico são mais antigas, mas ainda assim mais rígidas, em comparação com a legislação brasileira atual.

Tabela 4: Comparação das exigências requeridas 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 n°31/2010	Ensaio físico-químicos e microbiológicos	Nenhum	Ensaio físico-químicos e microbiológicos e estudo de permeação (ainda sem regulamentação específica)
FDA (EUA)	CDER (1998)	Ensaio físico-químicos	Estudo farmacodinâmico ou estudo clínico	Ensaio físico-químicos, ensaio de liberação (para alterações de nível 2), estudo clínico (para alteração de nível 3)
Health Canada (Canadá)	HC/1990	Ensaio físico-químicos e de liberação	Estudo farmacodinâmico ou estudo clínico	Ensaio físico-químicos, ensaio de liberação, estudo farmacodinâmico ou estudo clínico
EMA (Europa)	CPMP/1995	Ensaio físico-químicos	Estudo farmacodinâmico ou estudo clínico	Estudo farmacodinâmico ou estudo clínico
TGA (Austrália)	CPMP/1995	Ensaio físico-químicos	Estudo farmacodinâmico ou estudo clínico	Estudo farmacodinâmico ou estudo clínico

Nos Estados Unidos, para um medicamento ser registrado como genérico é recomendado que os excipientes sejam os mesmos do medicamento referência. No caso de excipientes diferentes, deve-se comprovar que a segurança e a eficácia do produto não são alteradas (SHAH, 1998). Além disso, o FDA recomenda para a maioria dos medicamentos tópicos o estudo de bioequivalência com *endpoints* clínicos, onde uma determinada resposta específica do medicamento em estudo é observada (NARKAR, 2010).

Para avaliar a equivalência de produtos, após algumas alterações pós-registro de nível 2 - alterações que podem ter um impacto significativo na

qualidade e performance da formulação, estudos de liberação *in vitro* são aceitos pelo FDA (FDA, 1997).

Com relação às alterações pós-registro de medicamentos de uso tópico, a ANVISA estabeleceu a necessidade da apresentação de testes de desempenho *in vitro* comparativo (ANVISA, 2016). Entretanto a ANVISA não dispõe de guias específicos nem para a condução destes estudos pelos entes regulados, nem para a avaliação deles pelo órgão regulador.

Na Europa, o EMA (*European Medicines Agency*) bioisenta as soluções tópicas (EMA, 2010), porém para outras formulações tópicas é necessária a apresentação de estudos clínicos, que podem ser substituídos por estudos farmacodinâmicos, estudos de disponibilidade local, estudos com animal ou *in vitro*, desde que devidamente validados (EMA, 1995).

5.2 – Medicamentos avaliados

A tabela 5 apresenta a composição qualitativa dos cremes, com propionato de clobetasol, comercializados no Brasil e utilizados neste estudo.

Tabela 5: Composição qualitativa dos cremes de propionato de clobetasol 0,5mg/g, utilizados no estudo

EXCIPIENTE	FUNÇÃO	R	A	B	C	D	E	F
Ácido Cítrico	Acidificante	X			X			
Água	Solvente	X	X	X	X	X	X	X
Álcool Cetoestearílico	Emulsificante	X	X		X		X	X
Arlacel 165 (Estearato de glicerila + PEG-100)*	Emulsificante	X						
Cera Branca	Agente de consistência	X						
Citrato de Sódio	Alcalinizante	X			X			
Clorocresol	Conservante	X						
Monoestearato de Glicerila	Emoliente, emulsificante, solubilizante	X						X
Propileneglicol *	Solvente, emulsificante, umectante	X	X	X	X	X	X	
Ácido Estearico	Emoliente						X	
Álcool Benzílico	Conservante				X			
Álcool Etilíco *	Conservante, solvent					X		
Álcool de lanolina +Óleo Mineral	Emoliente, emulsificante			X				
Aminometilpropanol	Alcalinizante						X	
Cera Emulsionante Aniônica	Emulsificante		X	X	X	X		
Cetearil Sulfato de Sódio	Emulsificante						X	
Dimetilsulfóxido*	Solvente						X	
Edetato Dissódico	Agente quelante			X		X		
Estearato de Macrogol 400	Emulsificante, solubilizante							X
Fenoxietanol	Conservante		X	X				
Glicerol	Umectante		X					X
Lactato de Amônio	Hidratante							X
Metabissulfito de Sódio	Conservante					X		
Monoestearato de Dietilenoglicol *	Emoliente, emulsificante				X			
Oleato de Decila	Emoliente		X					
Parabenos	Conservante		X	X		X	X	X
Petrolato Branco	Emoliente			X		X	X	X
Petrolato Líquido	Emoliente						X	
Polietilenoglicol *	Emoliente, umectante				X			
Polisorbato 60	Emulsificante, solubilizante						X	
Quaternário 15	Conservante							X
Simeticona	Antiespumante		X					
Sorbitol	Umectante							X

*Promotor de permeação

Comparando as diferentes formulações em creme podemos observar que a formulação genérica com composição qualitativamente mais parecida

com a formulação referência é o creme C, que contém 5 dos 9 excipientes presentes no produto referência.

Todos os cremes, com exceção do creme F, apresentam propilenoglicol, um excipiente que pode atuar como promotor de permeação. As formulações C, D e E possuem ao todo dois excipientes promotores de permeação, assim como a formulação referência, sendo os promotores da formulação C os mesmos do produto referência.

Considerando apenas a composição qualitativa dos diferentes cremes podemos esperar que a formulação C seja a que permeia pelas camadas da pele e gere uma resposta mais parecida em relação ao produto referência

A tabela 6 apresenta a composição qualitativa das pomadas, com propionato de clobetasol 0,5 mg/g, comercializados no Brasil e utilizados neste estudo.

Tabela 6: Composição qualitativa das pomadas de propionato de clobetasol 0,5mg/g, utilizadas no estudo

Excipiente	Função	R	A	B	C	D	E	F
Ésters de Sorbitana	Emulsificante	X			X		X	X
Petrolato Branco	Emoliente	X		X		X	X	X
Propilenoglicol *	Solvente, emulsificante, umectante	X			X	X	X	
Álcool Cetoestearílico	Emulsificante					X		
Álcool Etilico *	Conservante, solvent					X		
Butilhidroxitolueno	Antioxidante					X		X
Fenoxiethanol	Conservante			X				
Lanolina Anidra	Emulsificante					X		
Parabenos	Conservante			X		X		
Petrolato	Emoliente				X			
Petrolato Líquido	Emoliente		X			X	X	X
Plastibase	Emoliente							
Polietileno	Emoliente		X					
Polieilenoglicol *	Emoliente, umectante			X				
Polioxietileno Alquil Eter*	Emulsificante					X		

**Promotor de permeação*

Comparando as diferentes formulações em pomada podemos notar que as formulações C e E são as mais similares qualitativamente em relação à

formulação referência. A formulação C difere da formulação referência apenas por conter petrolato ao invés de petrolato branco, como discriminado na bula dos medicamentos. A formulação E difere da formulação referência por conter um excipiente a mais (petrolato líquido), porém apresenta todos os excipientes discriminados na bula do produto referência. As formulações A e F são as únicas que não apresentam promotores de permeação. A formulação D parece ser a mais diferente qualitativamente em relação à formulação referência, contendo três vezes mais excipientes que a formulação referência e 3 promotores de permeação.

Para assegurar que dois produtos sejam equivalentes terapeuticamente, é desejável que os excipientes das formulações sejam os mais similares possíveis. Desta forma, as formulações genéricas tendem a copiar ao menos qualitativamente a fórmula do produto referência (CHANG, 2012). Nos EUA a maioria das formulações genéricas tópicas possui qualitativamente (Q1) e quantitativamente (Q2) os mesmos excipientes do produto referência (SHAH, 2015). Porém no Brasil, esta semelhança não é um requerimento regulatório (ANVISA 2011, SOARES 2015a, SOARES 2015b).

A maioria das formulações genéricas, contendo propionato de clobetasol, avaliadas neste estudo mostrou significativa diferença na composição qualitativa em relação à formulação referência. Nenhuma das doze formulações genéricas estudadas possui o atributo Q1 dado pelo FDA, para as formulações qualitativamente iguais ao produto referência.

Foi observado, tanto para as formulações em creme como para as formulações em pomada, diferenças com relação a excipientes que podem atuar como promotores de permeação. Estes excipientes podem provocar uma alteração do EC e aumentar o transporte do fármaco de diferentes formas (SELZER, 2013). Sendo assim, considerando formulações que requerem intercambialidade, seria interessante se as formulações genéricas Brasileiras tivessem pelo menos promotores de permeação iguais à formulação referência, o que significa ter o mesmo excipiente com essa característica na mesma concentração que o produto referência. Considerando as doze formulações estudadas, apenas duas (pomadas C e E) possuem o mesmo promotor de permeação presente no produto referência.

5.3 - Estudos de equivalência farmacêutica

Os ensaios exigidos no estudo de equivalência farmacêutica, que foram conduzidos neste trabalho, são aqueles que podem impactar na liberação e na permeação do fármaco, sendo eles: densidade, viscosidade, pH e doseamento, cumprindo as especificações descritas na Farmacopéia Americana (USP), uma vez que o clobetasol não consta da farmacopeia Brasileira. Os testes que constam da farmacopeia e que não foram realizados neste trabalho, mas foram conduzidos no momento do registro dos medicamentos são: aspecto, identificação, peso médio e testes microbiológicos.

As tabelas 7 e 8 apresentam os resultados obtidos para as formulações em creme e pomada, respectivamente.

Tabela 7: Resultados do estudo de equivalência farmacêutica das formulações em creme

Teste	Especificação	Crema Ref	Crema A	Crema B	Crema C	Crema D	Crema E	Crema F
Densidade (g/mL)	---	0,6806	0,8542	0,7839	0,8157	0,6935	0,8953	0,7847
Viscosidade (cP)	---	298,750	82,500	57,500	257,500	120,000	53,750	92,500
pH	4,5 – 7,0	4,7	4,7	5,9	5,2	5,5	6,2	4,5
Doseamento	90,0 – 115%	100,5%	91,2%	79,1%*	96,6%	98,4%	97,8%	97,4%

*Resultado fora de especificação

Tabela 8: Resultados do estudo de equivalência farmacêutica das formulações em pomada

Teste	Especificação	Pom Ref	Pom A	Pom B	Pom C	Pom D	Pom E	Pom F
Densidade (g/ml)	---	0,4772	0,7491	0,7140	0,6099	0,5423	0,6803	0,6494
Viscosidade (cP)	---	182.500	357.500	347.500	263.750	170.000	127.500	271.250
Teor	90,0 – 115%	108,3%	92,0%	103,3%	100,0%	101,2%	100,0%	99,7%

Todos os cremes e pomadas, com exceção do creme B, atenderam as especificações farmacopeicas.

Uma vez que a farmacopeia não define um critério de aceitação para os testes de viscosidade e densidade, os únicos parâmetros que podem ser utilizados, para definir a equivalência entre as diferentes formulações, são os teste de teor e pH, sendo o pH aplicado apenas para as formulações em

creme. Desta forma, todas as formulações em creme, com exceção do creme B, e todas as formulações em pomada, atenderam as especificações da USP 37, sendo possível atestar que todas as formulações estudadas, exceto o creme B, são equivalentes ao produto referência, de acordo com a legislação Brasileira vigente.

A viscosidade, apesar de não apresentar um critério de aceitação, pode afetar a velocidade de liberação do fármaco, comprometendo a segurança e eficácia do medicamento (UEDA, 2009). Interessante notar que a formulação genérica em creme mais similar qualitativamente, em relação ao creme referência (creme C), foi a que apresentou a viscosidade mais próxima ao referência, 257,500cP para o creme C e 298,750 para o creme referência. Porém no caso das pomadas, a pomada genérica que apresentou viscosidade mais próxima à pomada referência foi a considerada mais diferente qualitativamente em relação à composição do produto referência, pomada D.

5.4 – Validação do método

Os testes realizados para validar a metodologia de quantificação do propionato de clobetasol foram: seletividade, linearidade, precisão e exatidão, tempo de extração e recuperação.

5.4.1 – Seletividade

No teste de seletividade foi avaliada a existência de interferência, na metodologia de análise, dos solventes utilizados na fase móvel, dos solventes que fazem parte da composição da amostra e da matriz biológica utilizada no teste de permeação (EC, derme + epiderme – DEP, e PT).

A tabela 9 apresenta os valores de área encontrados para o analito (clobetasol) e o padrão interno (beclometasona), bem como o percentual de interferência em relação ao limite inferior de quantificação (LIQ) e solução de padrão interno.

Tabela 9: Valores de área e percentual de interferência obtidos no teste de seletividade

	Clobetasol		Beclometasona	
Amostra	Área	% de interferência	Área	% de interferência
Metanol 50%	0	0	0	0
Metanol 50%: PBS + Tween 20 0,5% (5:1)	0	0	0	0
Acetonitrila	0	0	0	0
Ácido fórmico 0,1%	0	0	0	0
Solução analito	2480	-	0	0
Solução PI	0	0	1570844	-
AVALIAÇÃO DA MATRIZ BIOLÓGICA				
	Clobetasol		Beclometasona	
Amostra	Área	% de interferência	Área	% de interferência
EC	1891	5,5%	0	0
DEP	804	2,3%	0	0
PT	0	0	0	0
Solução analito	34243	-	0	0
Solução PI	0	0	747547	-

Seguindo a RDC nº27/2012, que trata da validação de métodos bioanalíticos, que determina que as respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras processadas no LIQ (ANVISA, 2012), o teste de seletividade demonstrou que o método utilizado é adequado com relação aos possíveis interferentes presentes no tempo de retenção do fármaco e do padrão interno.

5.4.2 – Linearidade

A tabela 10 apresenta os dados das três curvas obtidas no teste de linearidade.

Tabela 10: Resultados obtidos no teste de linearidade

Curva	Concentração nominal (ng/mL)							R ²
	1,25	5	25	50	150	250	500	
Curva 1	1,21	4,85	23,68	51,69	150,12	246,45	486,49	0,9994
Curva 2	1,25	5,03	24,30	51,61	151,31	249,98	518,50	0,9999
Curva 3	1,20	4,98	24,23	49,64	152,93	253,98	498,12	0,9999
Média	1,22	4,95	24,07	50,98	151,45	250,14	501,04	
DP	0,03	0,09	0,34	1,16	1,41	3,76	16,20	
CV (%)	2,17	1,88	1,41	2,28	0,93	1,51	3,23	

O teste de linearidade demonstrou que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro do intervalo especificado. O modelo de regressão linear ($1/x^2$) foi utilizado devido à amplitude da curva de calibração (1,25 a 500 ng/mL) visando aumentar a exatidão dos padrões de concentração baixa.

A apresentação gráfica de linearidade estabelecida pelo método é demonstrada na figura 23.

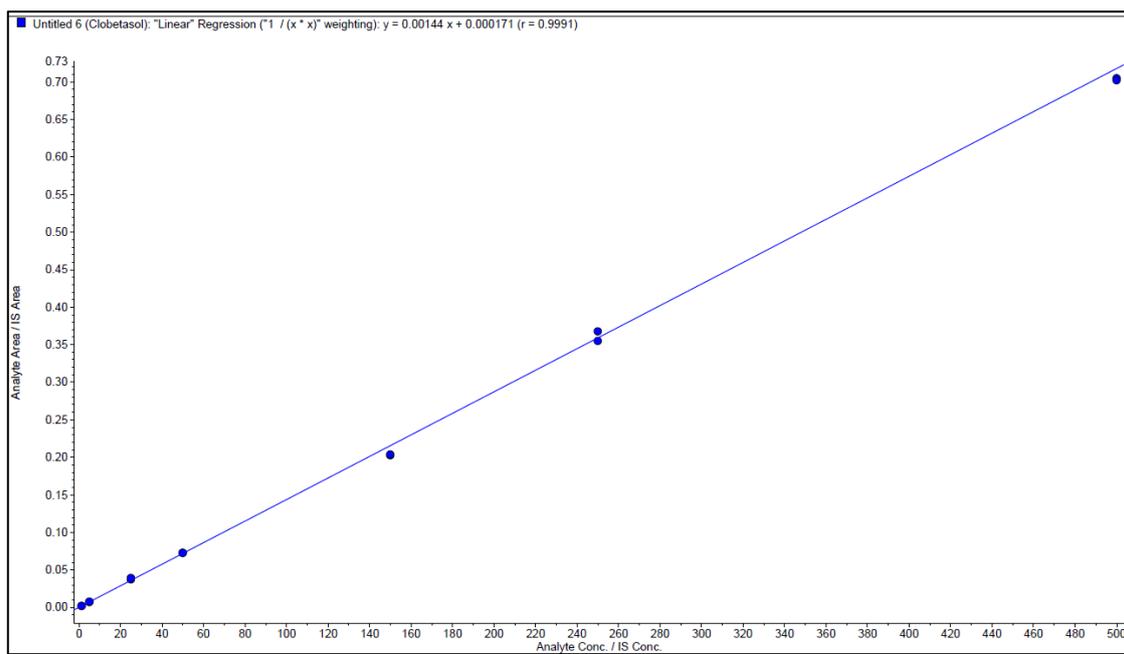


Figura 23: Curva de calibração representativa (modelo linear, ponderada, $1/x^2$).

5.4.3 - Precisão e exatidão

As tabelas 11 e 12 apresentam os resultados obtidos nos testes de precisão e exatidão intracorrída e intercorrída, respectivamente.

Tabela 11: Resultado do teste de precisão e exatidão obtido no teste intracorrída

Controles	Concentração quantificada (ng/mL)			Precisão e exatidão intracorrída		
	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Média	CV(%)	Exatidão (%)
LIQ (1,25ng/mL)	1,21	1,25	1,20	1,22	2,17	97,60
CQB (5ng/mL)	4,85	5,03	4,98	4,95	1,88	99,00
CQM (50ng/mL)	51,69	51,61	49,64	50,98	2,28	101,96
CQA (150ng/mL)	150,12	151,31	152,93	151,45	0,93	100,97

Tabela 12: Resultado do teste de precisão e exatidão obtido no teste intercorrída

Controles	Concentração quantificada (ng/mL)		Precisão e exatidão intercorrída		
	Dia 01	Dia 02	Média	CV (%)	Exatidão (%)
LIQ (1,25ng/mL)	1,22	1,25	1,24	1,72	99,2
CQB (5ng/mL)	4,95	4,98	4,97	0,43	99,4
CQM (50ng/mL)	50,98	50,84	50,91	0,19	101,82
CQA (150ng/mL)	151,45	147,22	149,34	2,00	99,56

Conforme RDC nº27/2012, os testes realizados demonstraram que o método desenvolvido, para quantificação das amostras do estudo de liberação e permeação, é preciso e exato.

5.4.4 – Tempo de extração do clobetasol da pele

A tabela 13 apresenta o resultado do teste realizado para determinar o tempo de extração do fármaco nas amostras de PT.

Tabela 13: Determinação do tempo de extração do clobetasol nas amostras do teste de permeação em pele total

Tempo	Área Amostra 1	Área Amostra 2	Área Amostra 3	Média	CV
0,5h	148013	117581	112515	126036	12%
1h	194843	165227	234341	198137	14%
3h	615420	615640	729080	653380	8%
6h	702490	804910	900500	802630	10%

O teste demonstrou que até o tempo de 3h, uma variação no tempo de extração influencia proporcionalmente a extração. Porém, após o tempo de 3h a extração do fármaco não aumenta na mesma proporção que o tempo. Considerando este fato, com o menor coeficiente de variação encontrado para o tempo de 3h, este tempo foi o considerado mais adequado para realizar a extração das amostras do teste de permeação.

5.4.5 - Recuperação do procedimento de extração

A tabela 14 apresenta o resultado da análise de recuperação para amostras de EC, DEP e PT.

Tabela 14: Resultado do teste de recuperação

Ensaio	EC		DEP		PT	
	Amostras A	Amostras B	Amostras A	Amostras B	Amostras A	Amostras B
Áreas do analito	203415	335953	72208	189469	74634	167025
	222654	367513	76233	189481	83097	175518
	187944	362709	79381	139732	85022	148182
	202956	399402	80540	138948	90481	161728
	170584	325337	87835	171061	102246	174991
	190817	363696	96494	191313	107661	194449
Média	196395	359101,67	82115,17	170000,67	90523,50	170315,50
CV (%)	8,97	7,27	10,65	14,63	13,70	9,12
Recuperação	54%		48,30%		53,15%	

O teste de recuperação demonstrou que a recuperação do propionato de clobetasol, das frações de pele utilizadas no estudo de permeação, foi por volta

de 50%, e que o procedimento adotado é preciso ($CV < 15\%$), conforme RDC n°27/2012 (ANVISA, 2012).

5.5 - Liberação *In Vitro*

O perfil de liberação *in vitro* de um fármaco pode refletir o efeito combinado de diferentes parâmetros físico-químicos das formulações, sendo desta forma um teste promissor na avaliação das propriedades de liberação do fármaco de uma formulação tópica (PARTICLE SCIENCES, 2009).

Um meio receptor apropriado deve ser usado para garantir condição *sink*, e desta forma uma avaliação preliminar da solubilidade do fármaco em diferentes solventes é fundamental.

5.5.1 – Teste de solubilidade do propionato de clobetasol

A Tabela 15 apresenta os resultados do estudo de solubilidade realizado com seis diferentes meios.

Tabela 15 – Solubilidade do propionato de clobetasol em diferentes meios ($n=3$)

Meio	Solubilidade ($\mu\text{g/mL}$)
Tampão fosfato pH7.4	2,30 $\mu\text{g/mL}$
Tampão fosfato pH 7.4 + 0.5% Tween® 20	26,9 $\mu\text{g/mL}$
Tampão fosfato pH 7.4 + 0.5% β -ciclodextrina	19,6 $\mu\text{g/mL}$
Tampão acetato de sódio pH 4.5	2,20 $\mu\text{g/mL}$
Tampão acetato de sódio pH 4.5 + 0,5% Tween® 20	27,0 $\mu\text{g/mL}$
Tampão acetato de sódio + 0,5% <u>β-ciclodextrina</u>	17,4 $\mu\text{g/mL}$

No estudo de liberação 300 mg das formulações em creme e pomada, contendo 0,05% de propionato de clobetasol, foram aplicadas no compartimento doador da célula de Franz. O compartimento receptor foi preenchido com 7 mL do meio receptor. Assumindo que o propionato de clobetasol é livremente solúvel no meio receptor, a concentração máxima teórica de fármaco no meio receptor esperada neste estudo, considerando um estudo de liberação *in vitro* de dose infinita, é calculada como sendo 6,43

µg/mL (30% da quantidade total de fármaco aplicado no compartimento doador) (HIGUCHI, 1962; GUY, 1990).

Os dados de solubilidade apresentados na tabela 15 demonstram que o propionato de clobetasol possui uma solubilidade de 26,9 µg/mL em tampão fosfato pH7,4 + 0.5% Tween® 20, o que corresponde a aproximadamente 4 vezes a concentração máxima que pode ser alcançada de clobetasol no meio receptor (6.43 µg/mL). Desta forma, considerando a solubilidade do meio, o fato do tampão fosfato ser o meio utilizado que melhor representa o fluido fisiológico e que condições *sink* adequadas são alcançadas em meios que apresentam uma solubilidade no mínimo três vezes superior ao valor esperado (USP 39, 2016), o meio composto por tampão fosfato pH 7,4 + 0.5% Tween 20 foi considerado apropriado para o estudo de liberação *in vitro*.

5.5.2 – Estudo de liberação

A quantidade liberada do fármaco em função da raiz quadrada do tempo de ensaio permite obter, a partir da inclinação das retas (*slope*), a velocidade de liberação do fármaco em um produto semissólido (FDA, 1997; UEDA, 2009).

A quantidade de propionato de clobetasol liberada no compartimento receptor ao longo do tempo, bem como sua velocidade de liberação, são apresentadas na tabela 16 (para as formulações em creme) e na tabela 17 (para as formulações em pomada).

Tabela 16 – Liberação *in vitro* do propionato de clobetasol das formulações em creme

Formulação	Quantidade liberada (µg/cm ²)									Slope*(CV)	R ²
	2h	4h	6h	7h	8h	10h	12h	18h	24h		
Creme Ref	192,33	784,07	1503,28	1673,99	1893,74	2460,22	3013,07	4497,49	5455,58	1565,57(8,55)	0,99
Creme A	124,21	214,04	288,96	309,57	315,20	381,47	430,60	596,19	742,91	175,74(13,31)	0,99
Creme B	6,50	24,81	63,54	86,29	104,15	160,43	210,07	387,33	506,54	174,440(11,8)	0,98
Creme C	151,70	554,16	771,32	891,73	975,78	1266,91	1521,81	2314,70	2868,26	798,99(3,96)	0,98
Creme D	88,72	221,63	382,58	432,92	462,89	609,06	736,69	1125,79	1422,83	392,03(4,25)	0,98
Creme E	96,78	241,72	353,99	373,69	395,24	500,53	563,69	789,22	984,66	252,08(22,53)	0,99
Creme F	0	3,13	7,26	6,83	5,26	12,51	24,14	41,70	58,39	86,59(27,28)	0,98

Cada valor representa a média de seis células.

$$*Slope = \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}^{-0.5}$$

Tabela 17 – Liberação *in vitro* do propionato de clobetasol das formulações em pomada

Formulação	Quantidade liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)									Slope*(CV)	R ²
	1h	2h	3h	4h	6h	8h	10h	12h	24h		
Pomada Ref	193,92	330,68	488,52	589,67	748,89	904,22	1033,69	1128,76	1682,68	382,76(6,41)	0,99
Pomada A	38,45	119,03	200,12	265,89	414,04	534,59	639,38	710,51	1255,80	313,03(4,28)	0,99
Pomada B	26,26	70,81	128,70	184,35	303,98	388,26	466,03	514,09	897,08	227,56(16,83)	0,99
Pomada C	3,83	11,74	31,31	60,77	146,46	235,98	317,92	382,99	668,81	197,66(11,69)	0,99
Pomada D	28,02	86,75	164,37	231,00	370,63	470,17	557,36	600,55	950,26	245,01(1,59)	0,99
Pomada E	4,59	10,73	36,77	85,92	242,47	414,13	556,65	668,49	1269,03	394,53(11,93)	0,98
Pomada F	7,43	8,16	14,79	26,85	62,56	103,93	143,67	175,25	367,74	107,14(12,08)	0,98

Cada valor representa a média de seis células.

$$*Slope = \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}^{-0.5}$$

Podemos notar que as formulações qualitativamente mais similares ao produto referência (creme C e pomada E) foram as que apresentaram também maior semelhança com relação à velocidade de liberação do fármaco.

A formulação F em creme e pomada, que não possui nenhum excipiente que atua como promotor de permeação foi a que apresentou menor velocidade de liberação (menor *slope*). Provavelmente, o propionato de clobetasol apresenta maior afinidade por estas formulações, liberando uma menor quantidade de fármaco para o meio receptor.

Considerando que a liberação do fármaco é o primeiro passo para um produto tópico semissólido estar disponível para penetrar na pele e poder exercer seu efeito, a menor liberação dos cremes e pomadas genéricos, em relação ao produto referência, pode afetar o desempenho do produto e comprometer a intercambialidade dessas formulações.

Diferentes estudos relatam que a liberação de um fármaco é influenciada pela viscosidade da formulação, sendo a liberação do fármaco inversamente proporcional a esta (THAKKER, 2003; CHORILLI, 2007, BRUSCHI, 2007, A-SASUTJARIT, 2005). Neste estudo a pomada que apresentou a menor viscosidade (pomada E) foi a que apresentou maior velocidade de liberação (maior *slope*). Porém esta relação entre viscosidade e velocidade de liberação não ocorreu da mesma forma para as outras formulações em pomada, a pomada A, que apresentou maior viscosidade, foi uma das formulações com maior velocidade de liberação. Para as formulações em creme, foi observado

que as formulações com maior viscosidade (cremes referência, C e D) foram aquelas que apresentaram também maior velocidade de liberação (maior *slope*).

Como podemos observar, neste estudo não foi possível correlacionar a viscosidade com a velocidade de liberação, o que se deve ao fato das formulações apresentarem outras variáveis, como diferenças qualitativas, que podem afetar o coeficiente de partição do fármaco do seu veículo para o meio receptor.

O perfil de liberação do propionato de clobetasol das formulações em creme e pomada é apresentado nas figuras 24 e 25, respectivamente.

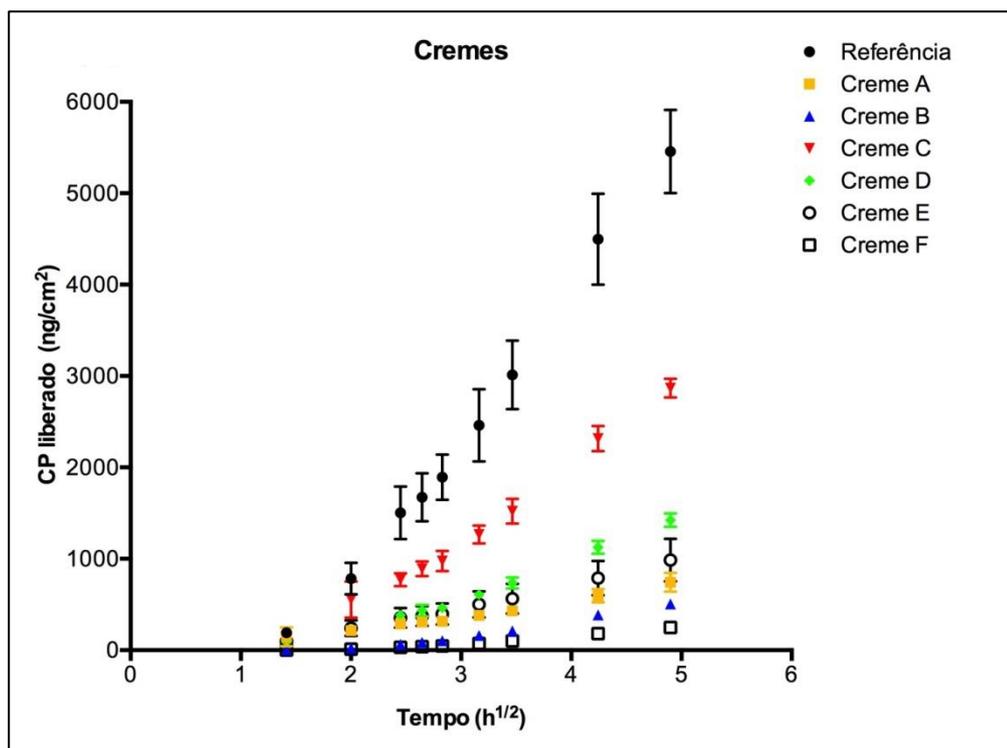


Figura 24 – Perfil de liberação do propionato de clobetasol das formulações em creme

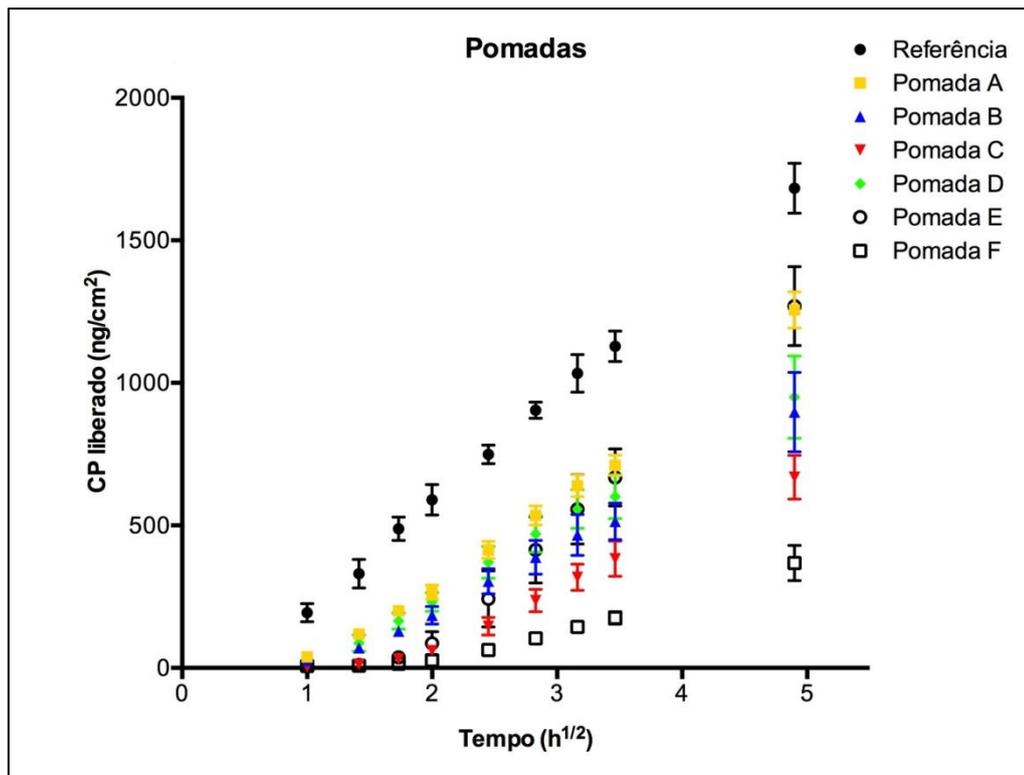


Figura 25 – Perfil de liberação do propionato de clobetasol das formulações em pomada

As diferentes formulações genéricas foram comparadas com a formulação referência conforme preconizado no guia do FDA (FDA, 1997). Os valores limite obtidos do intervalo de confiança de 90%, para a razão das medianas das velocidades de liberação do propionato de clobetasol, são apresentados nas tabelas 18 e 19.

O fluxo (valores de *slopes*) das diferentes formulações genéricas também foi comparado com o fluxo obtido para a formulação referência por meio do teste estatístico t de Student. Um teste preliminar para detecção de *outliers* foi realizado pelo teste de Grubbs, com nível de significância de 0,05. Nenhum *outlier* foi detectado.

Tabela 18 – Comparação das diferentes formulações em creme com o produto referência pelo estudo de liberação *in vitro*

Creme	Comparação pelo Guia do FDA		Comparação pelo teste t de Student	
	90% CI and T/R limites	Conclusão*	Valores de p	Conclusão**
Referência X A	9,92% - 12,58%	Inequivalente	p < 0,0001	Diferença estatisticamente significativa
Referência X B	9,43% - 12,89%	Inequivalente	p < 0,0001	Diferença estatisticamente significativa
Referência X C	46,53% - 55,66%	Inequivalente	p < 0,0001	Diferença estatisticamente significativa
Referência X D	23,23% - 27,14%	Inequivalente	P < 0,0001	Diferença estatisticamente significativa
Referência X E	12,55% - 19,87%	Inequivalente	p < 0,0001	Diferença estatisticamente significativa
Referência X F	3,90% - 6,91%	Inequivalente	p < 0,0001	Diferença estatisticamente significativa

*Critério para equivalência: 75 % - 133,33 % (FDA, 1997)

**Critério para diferença estatisticamente não significativa: $p > 0,05$ (95%CI)

Tabela 19 – Comparação das diferentes formulações em pomada com o produto referência pelo estudo de liberação *in vitro*

Pomada	Comparação pelo Guia do FDA		Comparação pelo teste t de Student	
	90% CI and T/R limites	Conclusão*	Valores de p	Conclusão**
Referência X A	76,02% - 87,26%	Equivalente	p < 0,0001	Diferença estatisticamente significativa
Referência X B	47,53% - 68,97%	Inequivalente	p < 0,0001	Diferença estatisticamente significativa
Referência X C	45,44% - 58,37%	Inequivalente	p < 0,0001	Diferença estatisticamente significativa
Referência X D	56,22% - 73,58%	Inequivalente	p < 0,0001	Diferença estatisticamente significativa
Referência X E	91,73% - 114,87%	Equivalente	P = 0,6398	Diferença estatisticamente NÃO significativa
Referência X F	24,85% - 31,66%	Inequivalente	p < 0,0001	Diferença estatisticamente significativa

*Critério para equivalência: 75 % - 133,33 % (FDA, 1997)

**Critério para diferença estatisticamente não significativa: $p > 0,05$ (95%CI)

Avaliando os resultados pelo método proposto pelo guia do FDA (FDA, 1997) as pomadas A e E podem ser consideradas equivalentes ao produto inovador. O intervalo da pomada A está deslocado e se encontra próximo ao limite inferior de aceitação. Já o intervalo da pomada E encontra-se centralizado e desta forma a determinação da equivalência farmacêutica para a pomada E é mais confiável. Na avaliação pelo teste t de Student apenas a pomada E demonstrou não ter diferença estatisticamente significativa em relação ao produto referência. Para os cremes, nenhuma formulação genérica foi considerada equivalente ao produto referência.

5.6 – Permeação *In Vitro*

5.6.1 – Determinação do tempo de ensaio

Para determinar o tempo de exposição do fármaco, na pele de orelha de porco, foi realizado um estudo piloto com a pomada referência, empregando diferentes tempos de exposição (0,5, 1, 2, 4 e 6 horas). A figura 26 apresenta o resultado gráfico da quantidade de fármaco permeada no EC e na pele remanescente (derme e epiderme) respectivamente em cada tempo testado.

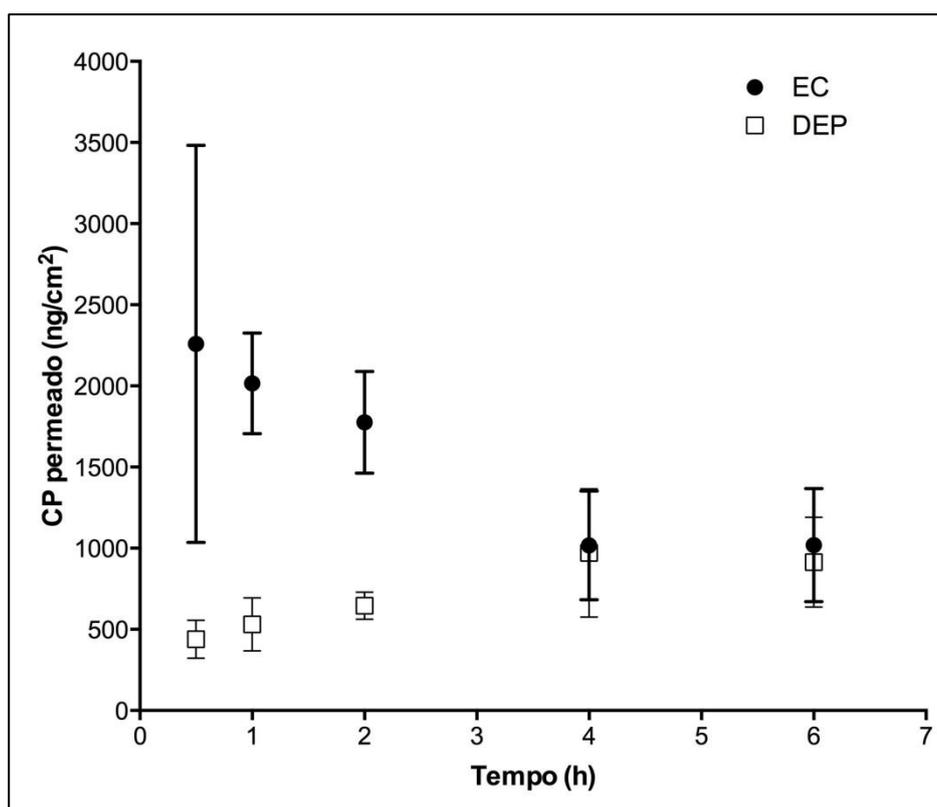


Figura 26 – Permeação do propionato de clobetasol no estrato córneo e na pele remanescente (derme e epiderme)

Por ser o EC e a pele remanescente representantes da PT, o experimento foi realizado apenas com estas duas frações.

Como diferenças entre formulações são melhor observadas na porção linear da curva, o tempo escolhido para realizar o estudo de permeação foi o tempo de 3 horas, uma vez que este foi o maior tempo observado antes da concentração atingir o platô, tanto no EC como na pele remanescente.

5.6.2 – Teste de Permeação

As tabelas 20 e 21 apresentam os resultados da quantidade permeada (ng/cm^2) de propionato de clobetasol em cada fração da pele (EC, DEP e PT) e o coeficiente de variação (CV), após 3 horas de ensaio. Os resultados representam a média de seis replicatas. A formulação referência foi avaliada duas vezes para verificar a adequabilidade do exercício de comparabilidade realizado entre as formulações genéricas e a formulação referência.

Tabela 20 – Quantidade de propionato de clobetasol, das formulações em creme (ng/cm^2) permeada nas diferentes frações de pele após 3 horas

Formulação	Pele total (CV%)	Estrato córneo (CV%)	Pele remanescente(DEP)* (CV%)
Creme Referência	480,07 (24,71)	261,89 (65,86)	290,22 (47,33)
Creme A	112,93 (21,75)	142,98 (53,64)	60,09 (21,75)
Creme B	191,16 (32,64)	151,36 (50,54)	80,91 (34,91)
Creme C	235,71 (43,10)	278,07 (54,04)	91,15 (43,89)
Creme D	178,78 (51,30)	156,98 (18,08)	107,92 (28,11)
Creme E	179,59 (32,25)	134,59 (66,55)	76,86 (42,03)
Creme F	350,90 (5,50)	208,92 (85,91)	153,26 (19,73)

* DEP – Derme e epiderme

Tabela 21 – Quantidade de propionato de clobetasol, das formulações em pomada (ng/cm^2) permeada nas diferentes frações de pele após 3 horas

Formulação	Pele total (CV%)	Estrato córneo (CV%)	Pele remanescente DEP)* (CV%)
Pomada Referência	511,45 (47,39)	320,78 (37,50)	288,06 (46,10)
Pomada A	91,84 (14,74)	138,37 (61,16)	48,16 (24,79)
Pomada B	198,11 (20,62)	307,20 (88,48)	87,04 (32,30)
Pomada C	364,53 (13,39)	113,27 (35,35)	194,08 (11,36)
Pomada D	185,27 (33,62)	323,82 (116,85)	111,98 (24,20)
Pomada E	168,68 (12,17)	143,73 (40,09)	101,15 (23,94)
Pomada F	149,68 (8,84)	228,41 (61,48)	100,13 (37,26)

*DEP – Derme e epiderme

As figuras 27 a 29 (A) e (B) apresentam graficamente a quantidade de propionato de clobetasol permeada nas diferentes frações de pele estudadas.

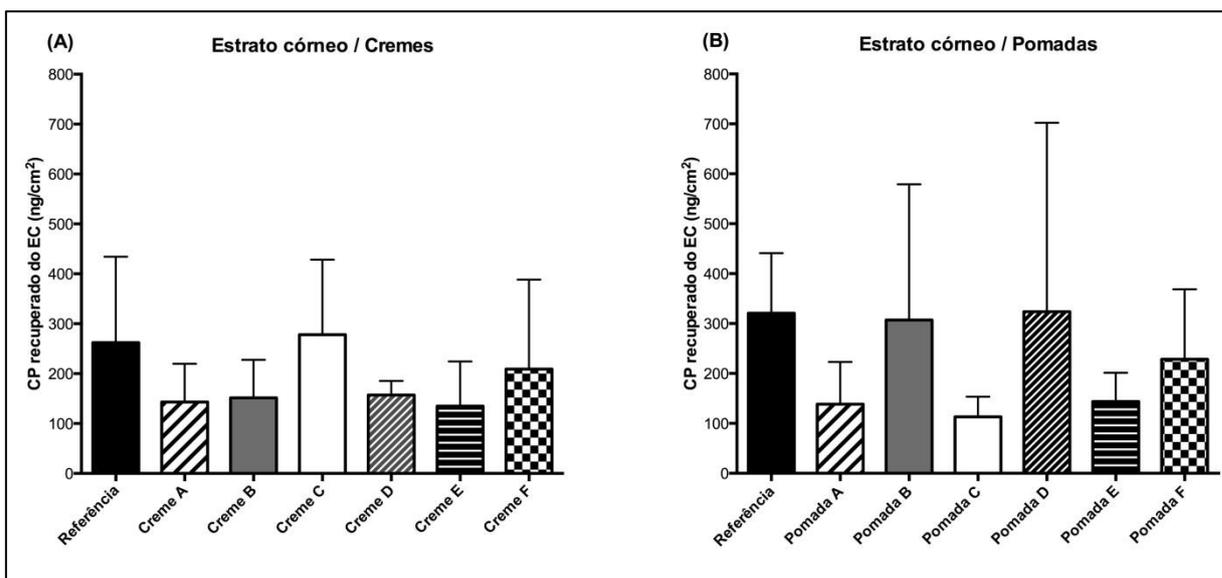


Figura 27: Quantidade de propionato de clobetasol permeada no EC (A) quantidade permeada das formulações em creme (B) quantidade permeada das formulações em pomada.

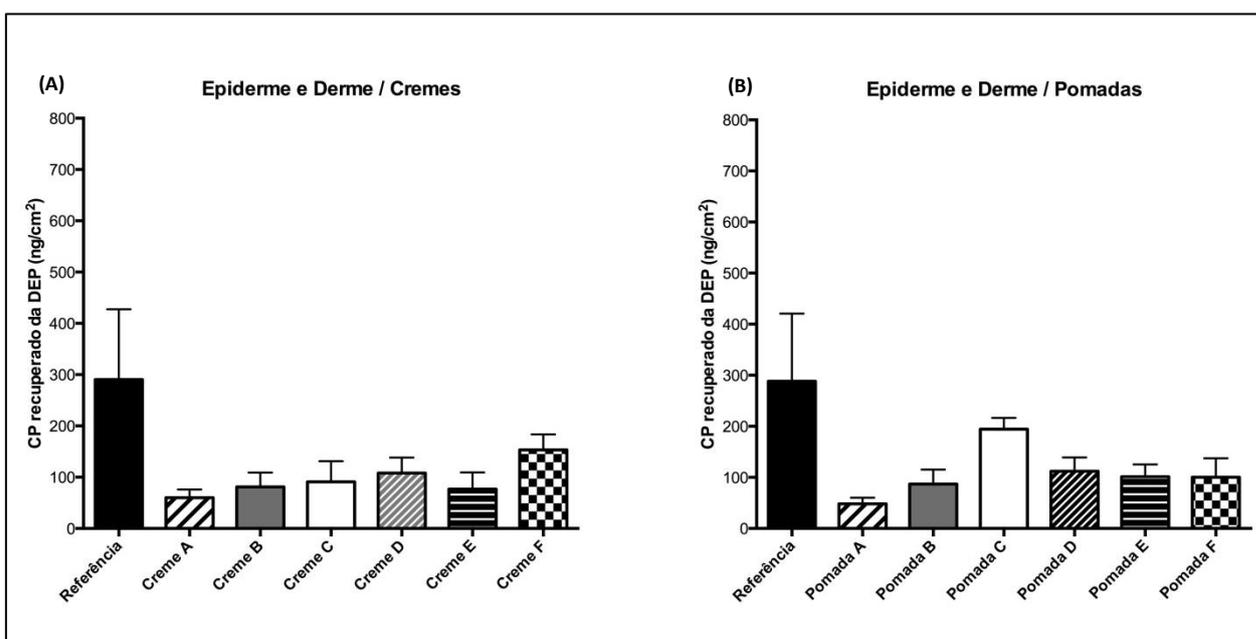


Figura 28: Quantidade de propionato de clobetasol permeada na DEP (A) quantidade permeada das formulações em creme (B) quantidade permeada das formulações em pomada.

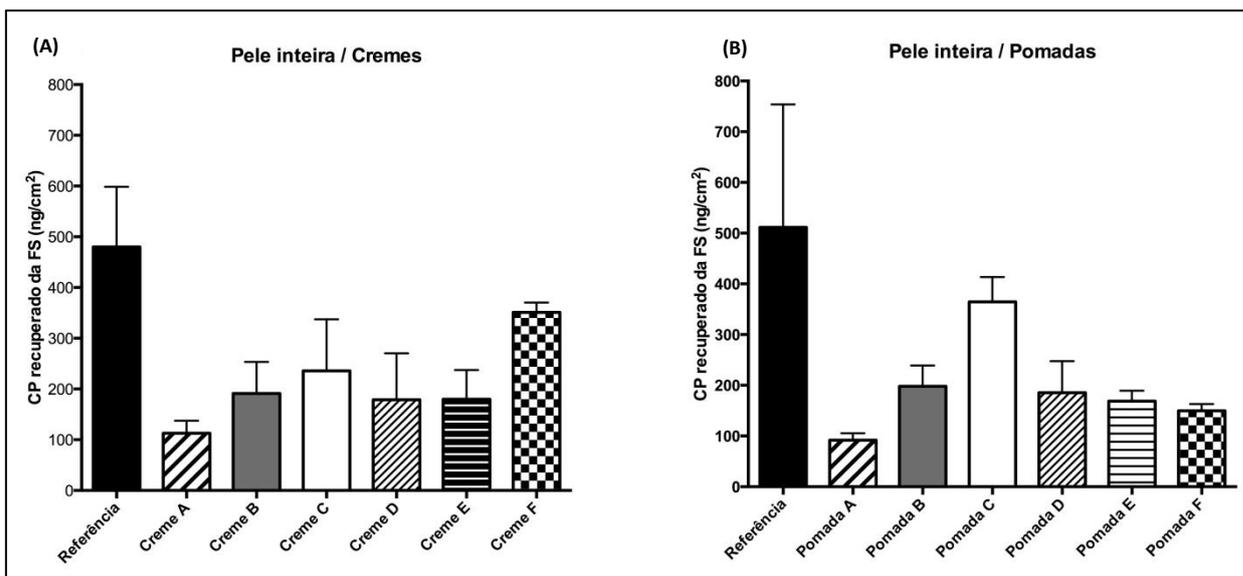


Figura 29: Quantidade de propionato de clobetasol permeada na PT (A) quantidade permeada das formulações em creme (B) quantidade permeada das formulações em pomada.

Considerando o EC, os cremes C e F foram os que apresentaram valores de fármaco mais próximos ao creme referência. Nas demais frações (DEP e PT) estes dois cremes também estiveram com os valores de fármaco entre os mais próximos do creme referência, porém, a permeação de todos os cremes genéricos foi muito inferior ao creme referência nestas frações (DEP e PT). Apesar disso, é interessante observar que o creme C foi também o que apresentou composição, viscosidade e liberação mais parecida com a formulação referência, diferentemente do creme F que foi o creme com menor velocidade de liberação. Além disso, o creme F, diferentemente de todos os cremes estudados, não apresenta nenhum promotor de permeação que poderia justificar sua maior permeação e semelhança com o creme referência, frente aos demais cremes.

Com relação às formulações em pomada e considerando o EC, as pomadas B e D foram as que apresentaram permeabilidade mais próxima do produto referência. Para as outras frações, a pomada C foi a que apresentou maior similaridade em relação à pomada referência, com relação à quantidade de propionato de clobetasol permeada, porém a permeação de todas as pomadas genéricas foi muito inferior à pomada referência nestas frações (DEP e PT). A pomada A foi uma das que apresentou menor permeação em todas as

frações de pele estudadas, apesar de ter sido uma das pomadas com maior velocidade de liberação.

Um estudo realizado anteriormente com 5 cremes genéricos de propionato de clobetasol (1, 2, 3, 4, 5) e o medicamento referência, avaliou as propriedades físico-químicas (cor, odor, viscosidade, pH e teor), a liberação *in vitro* e a permeação *in vivo* (através do teste de branqueamento) das diferentes formulações (PUAVILAI, 2002). Tal como observamos neste trabalho as propriedades físico-químicas das diferentes formulações não apresentaram diferenças, entretanto no estudo de liberação *in vitro*, duas formulações (3 e 4) apresentaram velocidade de liberação 3 vezes mais rápida que o produto referência. O estudo de permeação *in vivo* demonstrou que apesar da formulação 4 apresentar maior liberação *in vitro* esta formulação apresentou permeabilidade menor que o produto referência. Fato observado neste estudo para a pomada A.

Os resultados do estudo de permeação, realizados em pele de orelha de porco, foram avaliados por meio do teste estatístico t de Student, com avaliação prévia da existência de *outliers* pelo teste de Grubbs. Os resultados são apresentados nas tabelas 22 e 23.

Tabela 22: Comparação da quantidade de propionato de clobetasol permeada das formulações em creme pelo teste *t* de Student

Formulação – Creme	Estrato córneo	
	valores de p	Conclusão*
Referência I X Referência II	p = 0,0757	Diferença estatisticamente NÃO significativa
Referência X A	p = 0,1743	Diferença estatisticamente NÃO significativa
Referência X B	p = 0,2042	Diferença estatisticamente NÃO significativa
Referência X C	p = 0,8638	Diferença estatisticamente NÃO significativa
Referência X D	p = 0,1683	Diferença estatisticamente NÃO significativa
Referência X E	p = 0,1226	Diferença estatisticamente NÃO significativa
Referência X F	p = 0,5759	Diferença estatisticamente NÃO significativa
Formulação – Creme	Pele remanescente (Derme + epiderme)	
	valores de p	Conclusão*
Referência I X Referência II	p = 0,5891	Diferença estatisticamente NÃO significativa
Referência X A	p = 0,0029	Diferença estatisticamente significativa
Referência X B	p = 0,0027	Diferença estatisticamente significativa
Referência X C	p = 0,0081	Diferença estatisticamente significativa
Referência X D	p = 0,0069	Diferença estatisticamente significativa
Referência X E	p = 0,0024	Diferença estatisticamente significativa
Referência X F	p = 0,0496	Diferença estatisticamente significativa
Formulação – Creme	Pele total	
	valores de p	Conclusão*
Referência I X Referência II	p = 0,1587	Diferença estatisticamente NÃO significativa
Referência X A	p = 0,0001	Diferença estatisticamente significativa
Referência X B	p = 0,0001	Diferença estatisticamente significativa
Referência X C	p = 0,0022	Diferença estatisticamente significativa
Referência X D	p = 0,0002	Diferença estatisticamente significativa
Referência X E	p = 0,0001	Diferença estatisticamente significativa
Referência X F	p = 0,0351	Diferença estatisticamente significativa

*Critério para diferença não ser considerada estatisticamente significativa: $p > 0,05$ (Intervalo de confiança de 95%)

Tabela 23: Comparação da quantidade de propionato de clobetasol permeada das formulações em pomada pelo teste t de Student.

Formulação – Pomada	Estrato córneo	
	valores de p	Conclusão*
Referência I X Referência II	p = 0,2849	Diferença estatisticamente NÃO significativa
Referência X A	p = 0,0051	Diferença estatisticamente significativa
Referência X B	p = 0,8870	Diferença estatisticamente NÃO significativa
Referência X C	p = 0,0024	Diferença estatisticamente significativa
Referência X D	p = 0,9804	Diferença estatisticamente NÃO significativa
Referência X E	p = 0,0043	Diferença estatisticamente significativa
Referência X F	p = 0,1735	Diferença estatisticamente NÃO significativa
Formulação – Pomada	Pele remanescente (Derme + Epiderme)	
	valores de p	Conclusão*
Referência I X Referência II	p = 0,8737	Diferença estatisticamente NÃO significativa
Referência X A	p = 0,0006	Diferença estatisticamente significativa
Referência X B	p = 0,0026	Diferença estatisticamente significativa
Referência X C	p = 0,1105	Diferença estatisticamente NÃO significativa
Referência X D	p = 0,0064	Diferença estatisticamente significativa
Referência X E	p = 0,0042	Diferença estatisticamente significativa
Referência X F	p = 0,0044	Diferença estatisticamente significativa
Formulação – Pomada	Pele total	
	valores de p	Conclusão*
Referência I X Referência II	p = 0,0903	Diferença estatisticamente NÃO significativa
Referência X A	p = 0,0007	Diferença estatisticamente significativa
Referência X B	p = 0,0069	Diferença estatisticamente significativa
Referência X C	p = 0,1667	Diferença estatisticamente NÃO significativa
Referência X D	p = 0,0056	Diferença estatisticamente significativa
Referência X E	p = 0,0036	Diferença estatisticamente significativa
Referência X F	p = 0,0024	Diferença estatisticamente significativa

*Critério para diferença não ser considerada estatisticamente significativa: $p > 0,05$ (Intervalo de confiança de 95%)

A comparação entre as formulações genéricas e o produto referência, pelo método empregado neste estudo, foi considerado válido uma vez que todas as comparações do produto referência com ele mesmo, tanto para creme como para pomada, em todas as frações de pele, mostraram não haver diferença estatisticamente significativa.

Avaliando os resultados pelo teste t de Student, todos os cremes são considerados ter uma permeação, no EC, similar ao produto referência, uma vez que todas as formulações genéricas demonstraram não ser estatisticamente diferentes em relação à formulação referência. Porém, na DEP, que é o local de ação do fármaco estudado, e na PT, nenhum creme demonstrou semelhança de permeação com relação ao produto referência.

Para as formulações em pomada, as pomadas B, D e F não demonstraram ter permeação significativamente diferente da pomada referência no EC. A pomada C foi a única que demonstrou similaridade de permeação na DEP e PT.

O estudo de permeação conduzido, apesar de ter apresentado uma alta variabilidade, demonstrou claramente que as formulações genéricas se diferem do produto inovador.

5.6.3 – Avaliação das duas metodologias de permeação

As figuras 30 e 31 apresentam a comparação entre a quantidade de fármaco permeada no EC, somada a quantidade permeada na DEP, e a quantidade de fármaco permeada na PT.

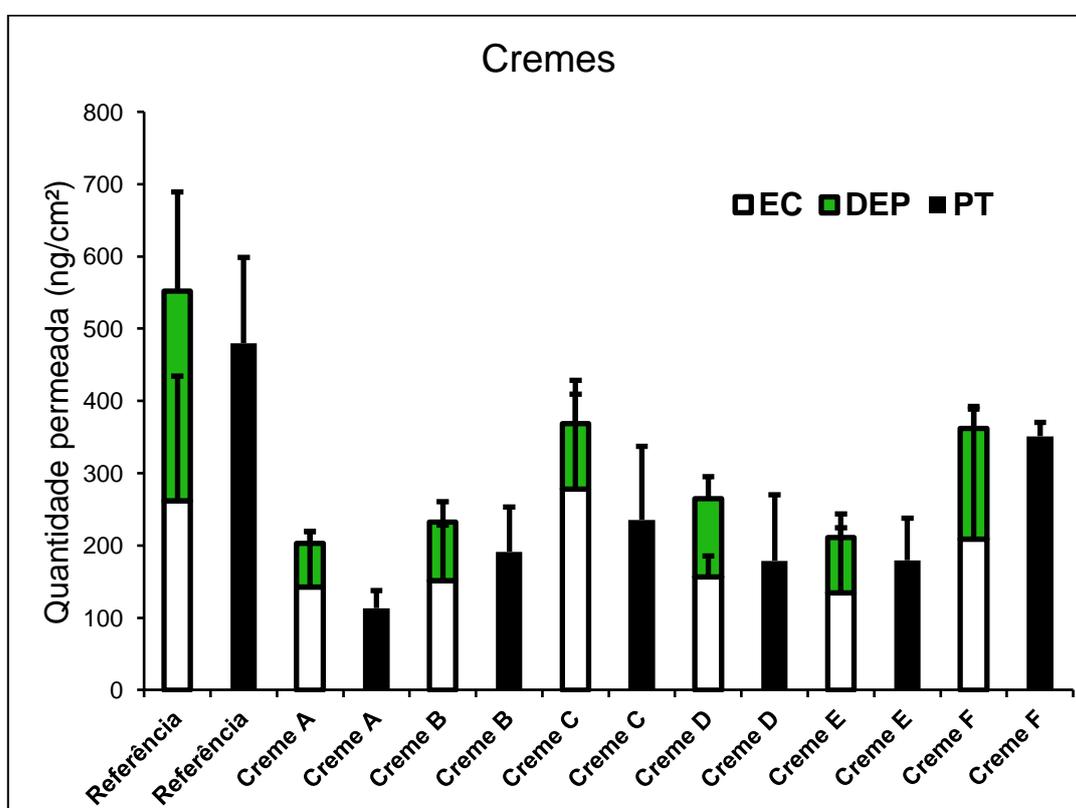


Figura 30 – Quantidade de propionato de clobetasol permeada no EC + DEP em comparação com a quantidade permeada na PT para as formulações em creme

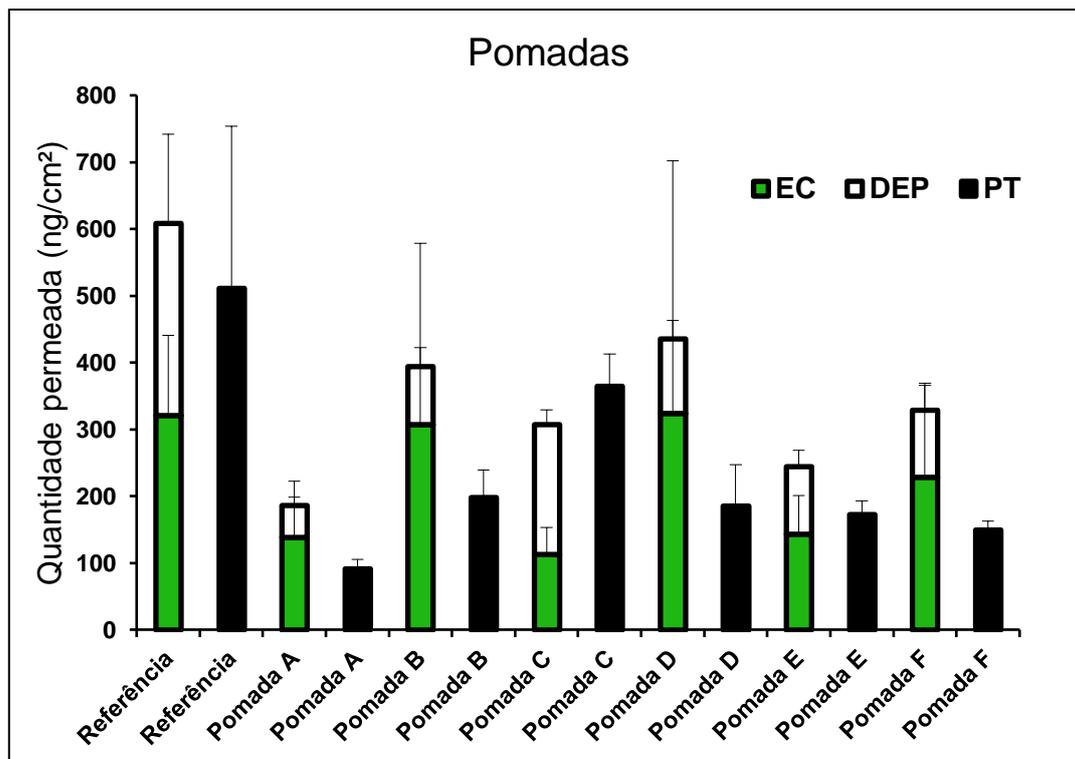


Figura 31 – Quantidade de propionato de clobetasol permeada no EC + DEP em comparação com a quantidade permeada na PT para as formulações em pomada

As tabelas 24 e 25 apresentam os resultados estatísticos realizados, comparando a quantidade de propionato de clobetasol permeada nas duas metodologias realizadas.

Tabela 24 – Comparação entre a quantidade de propionato de clobetasol permeada nas duas metodologias realizadas com as formulações em creme, pelo teste t de Student.

Formulação	Valores de p	Conclusão*
Creme referência	$p = 0,4338$	Diferença estatisticamente NÃO significativa
Creme A	$p = 0,0480$	Diferença estatisticamente significativa
Creme B	$p = 0,2761$	Diferença estatisticamente NÃO significativa
Creme C	$p = 0,1782$	Diferença estatisticamente NÃO significativa
Creme D	$p = 0,0745$	Diferença estatisticamente NÃO significativa
Creme E	$p = 0,5580$	Diferença estatisticamente NÃO significativa
Creme F	$P = 0,6524$	Diferença estatisticamente NÃO significativa

*Critério para diferença não ser considerada estatisticamente significativa: $p > 0,05$ (Intervalo de confiança de 95%)

Tabela 25 – Comparação entre a quantidade de propionato de clobetasol permeada nas duas metodologias realizadas com as formulações em pomada, pelo teste t de Student.

Formulação	Valores de p	Conclusão*
Pomada referência	p = 0,2738	Diferença estatisticamente NÃO significativa
Pomada A	p = 0,0272	Diferença estatisticamente significativa
Pomada B	p = 0,1047	Diferença estatisticamente NÃO significativa
Pomada C	p = 0,1026	Diferença estatisticamente NÃO significativa
Pomada D	p = 0,1551	Diferença estatisticamente NÃO significativa
Pomada E	p = 0,0170	Diferença estatisticamente significativa
Pomada F	P = 0,0173	Diferença estatisticamente significativa

*Critério para diferença não ser considerada estatisticamente significativa: $p > 0,05$ (Intervalo de confiança de 95%)

Para todas as formulações avaliadas, com exceção do creme A, pomadas A, E e F, a quantidade total de fármaco permeada, por meio das duas metodologias realizadas, demonstrou não possuir diferença estatisticamente significativa.

Ainda de forma a avaliar as duas metodologias empregadas no teste de permeação, as duas metades de pele foram pesadas. A diferença de massa entre as duas metades estudadas poderia ser indicativo de uma maior superfície de pele disponível para a permeação do fármaco em uma das frações, o que poderia levar a um resultado de permeação diferente entre as duas metodologias.

A tabela 26 apresenta o resultado da pesagem de cada metade da pele submetida ao estudo de permeação.

Tabela 26: Massa de cada uma das metades de pele submetidas ao teste de permeação.

Formulação	DEP (g) (CV%)	PT (g) (CV%)	Diferença (%) (CV%)
Crème			
Crème Referência I	0,337 (23,60)	0,378 (6,80)	4,502 (1,33)
Crème Referência II	0,419 (16,41)	0,381 (22,92)	-1,693 (2,68)
Crème A	0,465 (19,27)	0,433 (21,13)	-3,704 (0,71)
Crème B	0,486 (20,80)	0,559 (23,43)	6,697 (1,37)
Crème C	0,372 (27,63)	0,378 (20,39)	1,290 (10,10)
Crème D	0,461 (22,37)	0,576 (25,59)	10,738 (0,94)
Crème E	0,422 (15,14)	0,418 (17,70)	-0,678 (14,95)
Crème F	0,377 (12,22)	0,413 (12,18)	4,555 (1,04)
Pomada			
Pomada Referência I	0,421 (27,07)	0,486 (23,89)	7,382 (0,98)
Pomada Referência II	0,469 (15,69)	0,521 (17,72)	5,148 (0,48)
Pomada A	0,420 (17,96)	0,486 (24,18)	6,747 (0,91)
Pomada B	0,385 (17,54)	0,423 (33,70)	3,114 (3,08)
Pomada C	0,354 (22,04)	0,380 (21,26)	3,450 (1,92)
Pomada D	0,385 (16,80)	0,438 (4,14)	5,989 (1,59)
Pomada E	0,357 (22,34)	0,360 (13,17)	5,604 (1,21)
Pomada F	0,419 (17,52)	0,444 (21,02)	2,644 (1,45)

Apesar da diferença entre a massa das duas frações de pele não ter sido elevada, menos que 10% para todas as formulações estudadas com exceção do creme D, podemos observar uma grande variação de peso entre as frações utilizadas para avaliação de uma mesma formulação, o que pode ter contribuído para aumentar o coeficiente de variação do estudo de permeação. Essa diferença é decorrente da espessura de cada fração de pele utilizada que foi oriunda de partes da orelha diferentes e de animais diferentes. Para diminuir essa fonte de variabilidade o uso de um dermatômetro, que auxilie a padronização da espessura da pele, pode ser utilizado.

Outro fator que pode ter contribuído para a elevada variabilidade do estudo de permeação, foi a incerteza sobre a integridade do EC. Uma avaliação prévia da integridade do EC, com a medida da perda transepidermica de água (TEWL) poderia garantir o uso de peles com o EC íntegro e assim diminuir essa fonte de variação.

Ainda, um procedimento de limpeza mais eficiente do que o utilizado neste estudo, que permitisse a retirada completa da formulação da pele após finalizado o tempo de permeação, poderia garantir que nenhum excesso de formulação fosse quantificado, o que pode ter ocorrido principalmente na quantificação das primeiras fitas de *tape stripping*.

Por fim, uma demarcação da área de *tape stripping*, internamente a área de aplicação da formulação, para melhor controle da área de amostragem, poderia ter prevenido possíveis erros oriundos de efeitos de borda.

6 – RESUMO DOS RESULTADOS

6.1 – Levantamento teórico

O levantamento dos medicamentos tópicos, com registro válido na ANVISA, demonstrou que a grande maioria das formulações tópicas dermatológicas, atualmente bioisentas, são semissólidas. Uma vez que as propriedades físicas dessas formas farmacêuticas dependem de vários fatores, incluindo tensão interfacial entre as fases, coeficiente de partição do fármaco entre as fases e a reologia do produto, um maior número de estudos, além dos exigidos atualmente, é necessário para garantir a intercambialidade entre essas formulações.

O levantamento dos estudos internacionalmente necessários, para o registro de medicamentos tópicos, demonstrou que o Brasil é o único país, dentro do cenário regulatório estudado, que não exige estudo *in vivo* para comprovação da intercambialidade entre as formulações genéricas e seu produto inovador. A literatura apresenta algumas possibilidades de estudo *in vivo* que podem ser realizados para substituir os estudos clínicos e alguns órgãos reguladores já adotam o estudo de branqueamento e o dermatofarmacocinético, para comprovação da bioequivalência de produtos tópicos.

6.2 – Comparação entre os medicamentos genéricos e o referênci

Embora todas as 12 formulações genéricas estudadas, com exceção do creme B, satisfaçam o critério da monografia farmacopeia, e possam ser consideradas equivalentes ao produto referência, conforme legislação vigente, elas apresentaram, neste estudo, diferenças com relação à liberação e à permeação *in vitro*. A tabela 27 resume os resultados obtidos, com relação à equivalência entre as formulações, a partir de todos os ensaios realizados.

Tabela 27: Resumo dos resultados obtidos. E – Equivalente, NE – Não equivalente

	Equivalência	Liberação	Permeação metodologia usual (EC/DEP)	Permeação metodologia proposta (PT)
CREMES				
Creme A	E	NE	E / NE	NE
Creme B	NE	NE	E / NE	NE
Creme C	E	NE	E / NE	NE
Creme D	E	NE	E / NE	NE
Creme E	E	NE	E / NE	NE
Creme F	E	NE	E / NE	NE
POMADAS				
Pomada A	E	E	NE / NE	NE
Pomada B	E	NE	E / NE	NE
Pomada C	E	NE	NE / E	E
Pomada D	E	NE	E / NE	NE
Pomada E	E	E	NE / NE	NE
Pomada F	E	NE	E / NE	NE

6.3 – Comparação entre as metodologia de permeação

As duas metodologias utilizadas para avaliar a permeação *in vitro* não demonstraram diferenças significativas para a maioria das formulações. A nova metodologia proposta foi capaz de concluir sobre a equivalência das formulações (apenas a pomada C foi considerada equivalente ao produto referência) da mesma forma que a metodologia usualmente empregada, considerando apenas o parâmetro com menor variabilidade (DEP).

7- CONCLUSÃO

Os cremes e pomadas de propionato de clobetasol analisados neste estudo apresentam características diferentes na formulação, com diferenças qualitativas e provavelmente quantitativa de excipientes. Tais diferenças são críticas com relação à atuação de cada formulação sendo a real intercambialidade, entre as formulações genéricas e o produto referência, questionada. Todas as 12 formulações genéricas estudadas apresentaram diferenças com relação à liberação e à permeação *in vitro*. O impacto destas diferenças, na disponibilidade do fármaco *in vivo* e performance clínica de cada formulação, não pode ser avaliado neste estudo. Porém, a equivalência farmacêutica entre as formulações genéricas tópicas semissólidas é colocada em dúvida e evidencia a necessidade da elaboração de um guia específico para estes produtos, com a inclusão de um maior número de testes para determinação da intercambialidade entre produtos tópicos.

8- ARTIGOS E TRABALHOS ORIGINADOS DA TESE

8.1- Bioequivalência de Medicamentos Tópicos Dermatológicos: O Cenário Brasileiro e os Desafios Para a Vigilância Sanitária. Ciência & Saúde Coletiva, 2015a, 20(11):3599-360.

8.2 - An Update of the Brazilian Regulatory Bioequivalence Recommendations for Approval of Generic Topical Dermatological Drug Products. The AAPS Journal, 2015b, 17(6): 1517-1518.

**8.3 – Are Topical Generics Reliable? Posted by AAPS
blog in AAPS publications, May 2016. Disponível em:**

<https://aapsblog.aaps.org/2016/05/24/are-topical-generics-reliable/>

8.4 - Simplified in Vitro Bioequivalence Methodology for Topical Drug Products: Comparison of Clobetasol Generics. Submetido para Pharmaceutical Research.

9 - REFERÊNCIAS

ANVISA. Resolução RDC nº 48, de 06 de outubro de 2009. Regulamento técnico para realização de alteração, inclusão, suspensão, reativação e cancelamento de medicamentos (Pós-Registro de Medicamentos). Brasil, Diário Oficial Da União, 2009.

ANVISA. Resolução RDC nº 31, de 12 de agosto de 2010. Requisitos para a realização dos estudos de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução comparativo. Brasil, Diário Oficial da União, 2010a.

ANVISA. Farmacopeia Brasileira, volume 01, 5ª Ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010b. Disponível em <http://farmacopeia.org.br/>.

ANVISA. Resolução RDC nº 37, de 03 de agosto de 2011. Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. Brasil, Diário Oficial da União, 2011.

ANVISA. Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Brasil, Diário Oficial da União, 2012.

ANVISA. Resolução RDC nº 60, de 10 de outubro de 2014. Critérios para a concessão e renovação do registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como novos, genéricos e similares. Brasil, Diário Oficial da União, 2014.

ANVISA. Resolução RDC nº 73, de 07 de abril de 2016. Procedimentos para mudanças pós registro e cancelamento de registro de medicamentos. Brasil, Diário Oficial da União, 2016.

A-Sasutjarit, R; Sirivat, A; Vayumhasuwan, P. Viscoelastic Properties of carbopol 940 gels and their relationships to piroxicam diffusion coefficients in gels bases. *Pharmaceutical Research*, 2005, v22, p.2134-2140.

Au, W.L.; Skinner, M.; Kanfer, I. Bioequivalence assessment of topical clobetasol propionate products using visual and chromametric assessment of skin blanching. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 2008 11(1): 160-166.

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 & Pharmaceutical Sciences*, 2010, 13(1): 11-20.

Barbero, A.M.; Frasch H.F. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: a quantitative review. *Toxicology in Vitro*, 2009, 23(1):1-13.

Bhaskar, K.; Ramachandran S.; Sridar S.K.; Rajarajan, A.T.; Ramkumar, A.; Sanathkumar, K.; Rao, G.S.; Ambu, J.; Dhanaraju, M.D.; Saravanan, M. Biopharmaceutical and pharmacodynamic studies on topically applied diclofenac gel available in Indian market. *Bollettino Chimico Farmaceutico*, 2004, 143(5): 208-210.

Boix-Montanes, A. Relevance of equivalence assessment of topical products based on the dermatopharmacokinetics approach. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2011, 42(3): 173-179.

Brady, 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. *The AAPS Journal*, 2014.

Bruschi, M.L.; Jones D.S.; Panzeri, H.; Gremiao, M.P.; Freitas, O.; Lara, E.H. Semisolid systems containing propolis for the treatment of periodontal disease: In vitro release kinetics syringeability, rheological, textural, and mucoadhesive properties. *Journal Pharmaceutical Sciences*, 2007, Vol 96 (8), 2074-2089.

Caron, D.; Roussel, C.Q.; Shah, V.P.; Schaefer, H. Correlation between the drug penetration and the blanching effect of topically applied hydrocortisone creams in human beings. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 1990, 23(3): 458-462.

Chang, R.K.; Raw, A.; Lionberger, R.; Yu, L. Generic development of topical dermatological products: formulation development, process development, and testing of topical dermatological products, *The AAPS Journal*, 2012, Vol 15 (1), 41-52.

Chorilli, M.; Zague V.; Scarpa, M.V.; Lionardi, G.R. Influence of the vehicle in the in vitro release on the caffeine, *Revista Eletrônica de Farmácia*, 2007, Vol IV (1), 52-60.

Elewski, B. E. Percutaneous absorption kinetics of topical metronidazole formulations in vitro in the human cadaver skin model. *Advances in Therapy*, 2007, 24(2): 239-246.

EMA. Note for guidance on the clinical requirements for locally applied, locally acting products containing known constituents, 1995.

EMA. Guideline on the investigation of bioequivalence. C.F.M.P.F.H. CHMP), 2010.

FDA. Guidance for industry. Topical dermatologic corticosteroids: In vivo bioequivalence. Rockville: Food and drug administration. Center for drug evaluation and research (CDER), 1995.

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. 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. 2002.

FDA. Orange Book. Food and Drug Administration. Disponível em <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/ob/docs/queryai.cfm>. Acesso em 12/12/2013.

Frans, T.J. Study #1, Avita Gel 0.025% vs Retin-A gel 0.025%, transcribed presentation, Advisory Committee for Pharmaceutical Sciences Meeting, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Food and Drug Administration (FDA), Rockville, MD, November 29, 2001; Presentation slides available at http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/slides/3804s2_03_franz.pdf.

Ortiz, P.G.; Hansen, S.H.; Shah, V.P.; Sonne, J.; Benfeldt, E. Are marketed topical metronidazole creams bioequivalent? Evaluation by in vivo microdialysis sampling and tape stripping methodology. *Skin Pharmacology and Physiology*, 2010, 24(1): 44-53.

Guy, R.H.; Hadgraft, J. On the determination of drug release rates from topical dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*, 1990, 60, R1 - R3.

Harrison, L. I.; Stoesz, J.D.; Battiste, J.L.; Nelson, R.J.; Zarraga, I.E. A pharmaceutical comparison of different commercially available imiquimod 5% cream products. *Journal of Dermatological Treatment*, 2009, 20(3): 160-164.

Herkenne, C.; Alberti, I.; Naik, A.; Kalia, Y.N.; Mathy, F.X.; Pr eat, V.; Guy, R.H. In vivo methods for the assessment of topical drug bioavailability. *Pharmaceutical Research*, 2008, 25(1): 87-103.

Higuchi, W.I. Analysis of data on the medicament release from ointments. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1962, V51, n8, p 802-804.

JAPAN. Guideline for bioequivalence studies of generic products for topical use. Minister of Health. Labour and Welfare, Pharmaceutical and Food Safety Bureau, National Institute of Health Sciences. 2003.

Jackson, D.B.; Thompson, C.; McComarck, J.R.; Guin, J.D. Bioequivalence (bioavailability) of generic topical corticosteroids. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 1989, 20(5): 791-796.

Lademann, J.; Ilgevičius, A.; Zurbau, O.; Liess, H.D.; Schanzer, S.; Weigmann, H.J.; Antoniou, C.; Pelchrzim, R.V.; Sterry, W. Penetration studies of topically applied substances: Optical determination of the amount of stratum corneum removed by tape stripping. *Journal of Biomedical Optics*, 2006, 11(5): 054026-054026s.

Lademann, J.; Jacobi, U.; Surber, C.; Weigmann, H.J.; Fluhr, J.W. The tape stripping procedure – evaluation of some critical parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2009, 72(2): 317-323.

Lanke, S.S.S.; Kolli, C.S.; Strom, J.G.; Banga, A.K. Enhanced transdermal delivery of low molecular weight heparin by barrier perturbation. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, 365(1): 26-33.

Leal, L.B.; Araujo, T.P.; Chagas, S.C.C; Andrade, A.R.B.; Bedor, D.C.G.; Santana, D.P. Registro de medicamentos genéricos tópicos dermatológicos: Cenário Brasileiro e estudos para demonstração de bioequivalência. *Revista Visa em Debate*, 2017, 5(2): 3-12.

Leopold, C.S. Pharmacokinetic analysis of the FDA guidance for industry: "Topical dermatologic corticosteroid: in vivo bioequivalence". *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2003, 56(1): 53-8.

Lippold, B.C. and Schneemann, H. The influence of vehicles on the local bioavailability of betamethasone-17-benzoate from solution-and suspension-type ointments. *International journal of pharmaceutics*, 1984, 22(1): 31-43.

Löffler, H.; Dreher, F.; Maibach, H.I. Stratum corneum adhesive tape stripping: influence of anatomical site, application pressure, duration and removal. *British Journal of Dermatology*, 2004, 151(4): 746-752.

Ma, L.; Wang, X.; Fu, Z.; Sun, A.; Gao, B. Comparison of release and penetration of tacrolimus ointment reference and trial formulation after dermal application to pigs by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 2013, 27(9): 1117 - 1122.

McKenzie, A. and Stoughton, R. Method for comparing percutaneous absorption of steroids. *Archives of dermatology*, 1962, 86(5): 608-610.

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*, 2008. 25(7): 1621-1630.

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*, 2009, 26(2): 316-328.

Narkar, Y. Bioequivalence for topical products — an update. *Pharmaceutical Research*, 2010, 27(12): 2590-2601.

Norris, D. A. Mechanisms of action of topical therapies and the rationale for combination therapy. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2005 53(1): S17-S25.

Olsen, E.A. A double-blind controlled comparison of generic and trade-name topical steroids using the vasoconstriction assay. *Archives of Dermatology*, 1991, 127(2): 197-201.

Parfitt, N.R.; Skinner, M.; Bon, C.; Kanfer, I. Bioequivalence of topical clotrimazole formulations: an improved tape stripping method. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 2011, 14(3): 347-357.

Particle Sciences Technical brief, Development and validation of in vitro release testing methods for semisolid formulations. *Particle sciences, Technical Brief*, 2009, vol 10.

Pershing, L.K.; Nelson, J.L.; Corlett, J.L.; Shrivastava, S.P.; Hare, D.B.; Shah, V.P. Assessment of dermatopharmacokinetic approach in the bioequivalence determination of topical tretinoin gel products. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2003, 48(5): 740-751.

Pershing, L.K.; Silver, B.S.; Krueger, G.G.; Shah, V.P.; Skelley, J.P. Feasibility of measuring the bioavailability of topical betamethasone dipropionate in commercial formulations using drug content in skin and a skin blanching bioassay. *Pharmaceutical Research*, 1992, 9(1): 45-51.

Pershing, L.K. Bioequivalence assesment of three 0.025% tretinoin gel products: Dermatopharmacokinetic vs. clinical trial methods, transcribed presentation to the Advisory Committee for Pharmaceutical Sciences Meeting, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Food and Drug Administration (FDA), Rockville, MD, Noember 29, 2001; presentation slides available at

http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/slides/3804s2_02_Pershing/index.htm;

Ponec, M. and Kempenaar, J. Biphasic entry of glucocorticoids into cultured human skin keratinocytes and fibroblasts. *Archives of Dermatological Research*, 1983, 275(5): 334-344.

Puavilai, S.; Krisadaphong, P.; Leenutaphong, V.; Asawanonda, P.; Akaraphan, R.; Ploysangham, T.; Ruangarnchanasetr, S.; Noppakun, N.; Charuwichitratana, S.; Kulthanan, K.; Huiprasert, P.; Tresukosol, P.; Ophaswongse, S. Comparative study of the efficacy of topical corticosteroid:

five locally made and one brand name creams. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 2002, 85(7): 789-799.

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 Sciences*, 2002, 85(7): 789-799.

Selzer D.; Abdel-Mottaleb, M.M.A.; Hahn, T.; Schaefer, U.F.; Neumann, D. Finite and infinite dosing: Difficulties in measurements, evaluations and predicitions. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, 65(2): 278-294.

Sequeira, J.; Berardi, M.; Chan, T.M.; Letarte, J.; Malchow, R.; Pramanick, B.; Wolkoff, H.N. Assessing equivalence of innovator and generic formulations of betamethasone dipropionate cream and ointment. *Clinical Therapeutics*, 1990, 13(6): 687-694.

Shah, V.P. Guidance for industry — topical dermatological drug product NDAs and ANDAs — in vivo bioavailability, bioequivalence, in vitro release and associated studies. US Dept. of Health and Human Services, 1998, Rockville: 1-19.

Shah, V.P.; Flynn, G.L.; Yacobi, A.; Maibach, H.I.; Bon, C.; Fleischer, N.M.; Franz, T.J.; Kaplan, S.A.; Kawamoto, J.; Lesko, L.J.; Marty, J.P.; Pershing, L.K.; Schaefer, H.; Sequeira, J.A.; Shrivastava, S.P.; Wilkin, J.; Williams, R.L. Bioequivalence of topical dermatological dosage forms –methods of evaluation of bioequivalence. *Skin Pharmacology and Physiology*, 1998, 11(2): 117-124.

Shah, V.P; Yacobi, A.; Radulesco, F.S.; Miron, D.S.; Lane, M.E. A Science based approach to topical drug classification system (TCS). *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, 491(1-2): 21-25.

Soares K.C.C; Moraes M.V.; Gelfuso G.M.; Gratieri T, 2015a. Bioequivalence of dermatological topical medicines: the brazilian scenario and the challenges for health surveillance. *Ciência & Saúde Coletiva*, 2015a, 20(11):3599-360.

Soares K.C.C.; Santos G.M.L.; Gelfuso G.M.; Gratieri T. An update of the brazilian regulatory bioequivalence recommendations for approval of generic topical dermatological drug products. *The AAPS Journal*, 2015b, 17(6): 1517-1518.

Spruance, S. L.; McKeough, M.B.; Cardinal, J.R. Penetration of guinea pig skin by acyclovir in different vehicles and correlation with the efficacy of topical therapy of experimental cutaneous herpes simplex virus infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1984, 25(1): 10-15.

Stoughton, R.B. Are generic formulations equivalent to trade name topical glucocorticoids? *Archives of Dermatology*, 1987, 123(10): 1312.

Suzuki, T.; Uchino, T.; Miyazaki, Y.; Kagawa, Y. Release profiles of dexamethasone dipropionate from admixtures of steroid and heparinoid ointments prepared by different mixing methods. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2011, 60(2): 260-266.

Thakker, K.D. and Chern, W.H. Development and validation of in vitro release testing methods for semisolid formulations. *Dissolution Technologies*, 2003, May, 10-15.

Trottet, L.; Owen, H.; Holme, P.; Heylings, J.; Collin, I.P.; Breen, A.P.; Siyad, M.N.; Nandra, R.S.; Davis, A.F. Are all aciclovir cream formulations bioequivalent? *International Journal of Pharmaceutics*, 2005, 304(1): 63-71.

Tsai, J.-C. Content and transdermal delivery of clobetasol 17-propionate from commercial creams and ointments. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2002, 10 (1): 7-12.

Tsai, J. C.; Cheng, C.L.; Tsai, Y.F.; Sheu, H.M.; Chou, C.H. Evaluation of in vivo bioequivalence methodology for topical clobetasol 17-propionate based on

pharmacodynamic modeling using chinese skin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2004, 93(1): 207-217.

Ueda, C.T.; Shah, V.P.; Derdzinski, K; Ewing, G. Flyinn, G; Maibach, H.; Marques, M; Ritting, H; Shaw, S.; Thakker, K; yacobi, A. *Topical and Transdermal Drug Products*. The United States Pharmacopeial Convention, Inc. Pharmacopeial Forum, 2009, v.35, p.750-764.

USP 37 - NF 32. *The United States Pharmacopeia*. Rockville: USP United States Pharmacopeial Convention, 2014. p 2400 e 2401.

Wei, H.; Chen, Y.; Xu, L.; Zheng, J. Percutaneous penetration kinetics of lidocaine and prilocaine in two local anesthetic formulations assessed by in vivo microdialysis in pigs. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2007, 30(4): 830-834.

Wei, H.; Wang, S.Q.; Xu, F.; Xu, L.; Zheng, J.; Chen, Y. Topical bioequivalence of acyclovir creams using dermal microdialysis in pigs: a new model to evaluate bioequivalence for topical formulations. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2012 38(7): 785-791.

Wiedersberg, S.; Leopold, C.S.; Guy, R.H. Bioavailability and bioequivalence of topical glucocorticoids. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008, 68(3): 453-466.

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*, 2009, 71(2): 362-366.