



Vigilância Sanitária em Debate
ISSN: 2317-269X
INCQS-FIOCRUZ

Leal, Leila Bastos; Araujo, Thalita Pedon de; Chagas, Stephanye Carolyne Christino;
Andrade, Ana Rosa Brissant de; Bedor, Danilo Cesar Galindo; Santana, Davi Pereira de
Registro de medicamentos genéricos tópicos dermatológicos:
cenário brasileiro e estudos para demonstração de bioequivalência
Vigilância Sanitária em Debate, vol. 5, núm. 2, 2017, Abril-Junho, pp. 3-12
INCQS-FIOCRUZ

DOI: <https://doi.org/10.22239/2317-269X.00814>

Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=570562894002>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais informações do artigo
- Site da revista em redalyc.org

DEBATE

<https://doi.org/10.22239/2317-269x.00814>

Registro de medicamentos genéricos tópicos dermatológicos: cenário brasileiro e estudos para demonstração de bioequivalência

Registration of generic dermatologic topical medications: Brazilian scenario and studies to demonstrate bioequivalence

RESUMO

Leila Bastos Leal*

Thalita Pedon de Araujo

Stephanye Carolyne Christino Chagas

Ana Rosa Brissant de Andrade

Danilo Cesar Galindo Bedor

Davi Pereira de Santana

Comparando-se o número de registros concedidos para produtos tópicos pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) com o número de testes exigidos por essas e outras agências internacionais no momento do registro desses medicamentos, fica claro que a flexibilização das exigências regulatórias brasileiras vem proporcionando um maior número de medicamentos tópicos no mercado, sem que haja garantia da bioequivalência entre as diferentes formulações consideradas produtos genéricos. Diante disto, o objetivo deste trabalho é discutir, sob o ponto de vista do pesquisador brasileiro, as metodologias possíveis de serem utilizadas no Brasil para esta finalidade, considerando ser premente uma rediscussão da legislação brasileira no que concerne a bioequivalência destes produtos. Dentre as metodologias abordadas estão estudos de liberação e permeação *in vitro*, ensaio farmacodinâmico de branqueamento (exclusivo para os corticoides), dermatofarmacocinética e microdiálise dérmica. Concluímos que, inicialmente, baseados na simplicidade dos métodos, bem como na facilidade de implementação, parâmetros para a abordagem *in vitro* devem ser definidos. Posteriormente, uma discussão ampla envolvendo Anvisa, comunidade científica e segmento industrial deveria ser buscada, visando avaliar a viabilidade técnica e econômica de adequação à realidade brasileira, no emprego dos métodos *in vivo*, aqui discutidos.

PALAVRAS-CHAVE: Medicamento Tópico; Bioequivalência; Registro de Medicamento; Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Vigilância Sanitária

ABSTRACT

Comparing the number of approvals granted for topical drug products by the FDA and by Anvisa, as well as the number of tests required by these and other international agencies at the time of registration, it becomes clear that the increased flexibility of the Brazilian regulatory requirements has resulted in a larger number of topical medicines on the market, without a guarantee of bioequivalence between the different formulations considered generic. For this reason, the aim of this study is to discuss, from the point of view of Brazilian researchers, the methodologies that could possibly be used in Brazil for the reasons mentioned above, the most urgent being a revaluation of Brazilian legislation concerning bioequivalence of these products. Among the approaches considered are: *in vitro* release test, *in vitro* permeation, pharmacodynamic test (only for corticoids), and dermatopharmacokinetic and dermal microdialysis. We conclude that, firstly, based on the simplicity of the methods, as well as the ease for their implementation, parameters for the *in vitro* approach must be defined. Later, a wider discussion involving Anvisa, the scientific community and the industrial sector should be sought, aiming to assess the technical and economic viability of the adaptation to the Brazilian scenario in relation to the use of the *in vivo* methods discussed here.

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE); Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (Nudfac), Recife, PE, Brasil

* E-mail: leila.leal@nudfac.com.br

Recebido: 03 jul 2016

Aprovado: 09 nov 2016

KEYWORDS: Medicine Topical; Bioequivalence; Registration of Medicines; Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Sanitary Surveillance



INTRODUÇÃO

A avaliação da Bioequivalência (BE) de produtos tópicos tem sido bastante debatida, principalmente pelo *Food and Drug Administration* (FDA), desde a publicação, em 1998, do esboço de um guia para estudos de BE de produtos tópicos utilizando a metodologia da dermatofarmacocinética (DPK)¹. Este guia deixou de ser recomendado em 2002 em virtude, principalmente, de dúvidas sobre a adequação e a reprodutibilidade do método em relação à análise de preparações tópicas à base de tretinoína^{2,3,4,5}. Desde então, vários workshops internacionais têm sido realizados para discutir este procedimento. Dentre os desafios propostos, podemos citar a avaliação da concentração do fármaco no tecido morto; a compreensão da relação entre a concentração do fármaco no estrato córneo (EC) e a eficácia tópica; a reprodutibilidade do método de DPK e a capacidade do mesmo em diferenciar, de forma confiável, diferentes formulações⁶. Exceto quando se trata de produtos tópicos contendo corticosteroides, para os quais o uso da abordagem farmacodinâmica é aceita pelo FDA, a utilização dos estudos clínicos é o único caminho para a aprovação de um medicamento genérico de uso tópico. Desta forma, as técnicas de DPK e da microdiálise cutânea *in vivo* estão em foco e direcionam diferentes abordagens, considerando a avaliação do ativo nas diferentes camadas da pele. Dentre estas, apenas o DPK é aceito para avaliação de produtos de uso tópico em países como a África do Sul e o Japão. Neste mesmo contexto, vale salientar a importância dos estudos de liberação e permeação *in vitro* como tentativa de avaliar modificações sucintas nas formulações, e/ou vislumbrar uma possível correlação entre procedimentos *in vitro* e *in vivo*. No Brasil, comparando-se o número de registros concedidos pelo FDA e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), no que diz respeito a formulações tópicas dermatológicas, com o número de testes exigidos por essas e outras agências internacionais no momento do registro do medicamento, pode-se concluir que a flexibilização das exigências regulatórias no âmbito nacional vem proporcionando um maior número de medicamentos tópicos dermatológicos genéricos e similares intercambiáveis no mercado brasileiro, sem que haja efetiva garantia em termos de BE entre suas diferentes formulações⁷. Na literatura internacional, está bem estabelecido que, para produtos dermatológicos, após aplicação tópica, a concentração de fármaco encontrada no fluido biológico pode não estar relacionada à eficácia terapêutica. Em virtude disso, a utilização de metodologias para avaliar a BE destes produtos continua sendo um grande desafio⁶. Baseado no exposto, o objetivo deste trabalho é discutir as metodologias possíveis de serem utilizadas no Brasil, para esta finalidade, considerando ser premente uma rediscussão da legislação brasileira no que concerne à BE de produtos tópicos.

MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE/BIOEQUIVALÊNCIA DE PRODUTOS TÓPICOS

Os principais métodos a serem considerados na determinação da Biodisponibilidade/Bioequivalência (BD/BE) tópica podem ser divididos em duas abordagens: (1) *in vitro*, incluindo os ensaios

de liberação e permeação cutânea, e (2) *in vivo*, englobando os ensaios clínicos, os farmacodinâmicos (por exemplo, vasoconstrição), a DPK e a microdiálise dérmica (MD), conforme mostrado na Figura 1.

ESTUDO DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO *IN VITRO*

No que diz respeito às abordagens *in vitro*, geralmente elas são realizadas através de células de difusão de Franz (CDF) (Figura 1), na qual se propõe a utilização do método para a avaliação da cinética de liberação do(s) componente(s) ativo(s) a partir de cada formulação aplicada. Desde a sua introdução, as CDF são utilizadas em diversos estudos, incluindo os de avaliação da absorção de formulações de ação local sistemas transdérmicos, cosméticos, produtos de cuidados com pele e pesticidas⁸. Basicamente, esses dispositivos são constituídos por dois compartimentos, um doador e outro receptor, separados por uma membrana (derivados de celulose, silicone, entre outras). O compartimento receptor é preenchido com uma solução que favorece as condições *sink*, isto é, uma condição bastante afastada do limite de saturação do sistema dinâmico⁹, possibilitando um fluxo contínuo e unidirecional do fármaco. No diagrama esquemático de uma CDF vertical, observa-se a presença de uma “jaqueta” através da qual a água com temperatura controlada é recirculada, com o objetivo de realizar os ensaios à temperatura desejada. A passagem do ativo através da membrana é monitorada por amostragem periódica da solução receptora a partir do ducto coletor, e é posteriormente analisada por meio de técnicas analíticas adequadas. A inabilidade do Estudo de Liberação (EL) em se correlacionar com os resultados *in vivo* deve-se, sobretudo, à impossibilidade da obtenção de dados que representem a interação entre a formulação (incluindo os excipientes) e a pele, em particular, com o EC¹. No entanto, embora por si só o ensaio de liberação *in vitro* não seja um substituto para os testes de BD/BE, o guia do FDA afirma que um fabricante pode fazer pequenas alterações no seu produto, e utilizar o ensaio de liberação *in vitro* para demonstrar a “semelhança” entre eles. Desta forma, em se tratando de legislação brasileira, pode-se prever a possibilidade de uma maior utilização dos ensaios de liberação *in vitro* (de forma análoga ao perfil de dissolução para formas sólidas de uso oral), como parte de uma série de testes que possam ser utilizados para estabelecer a equivalência terapêutica de medicamentos de aplicação tópica.

Na avaliação da permeação *in vitro*, o procedimento é semelhante ao EL, com modificação da membrana a ser utilizada, bem como do tempo de duração do referido estudo. O ideal seria o uso de pele humana para avaliar as propriedades de permeação de um fármaco. No entanto, amostras de tamanho e qualidade adequadas para a realização dos experimentos não são suficientes, sendo de difícil acesso para a maioria dos pesquisadores¹⁰. Uma ampla variedade de modelos de pele animal são sugeridas como substitutos à pele humana, e estes têm sido utilizados para avaliar a permeação de diferentes fármacos^{11,12,13,14}. Tais modelos incluem roedores, primatas e suínos. Com relação à pele suína,



alguns estudos *in vitro* têm relatado que a espessura do EC e os parâmetros biofísicos (difusividade e coeficiente de permeabilidade da água) são correlacionáveis com aqueles da pele humana *in vivo* (Tabela)¹⁵. Diante disto, a utilização da pele de porco, principalmente da orelha, vem sendo bastante aplicada. Vale salientar que a pele proveniente da parte dorsal e ventral do corpo deste animal também tem sido utilizada, tornando os procedimentos de coleta e tratamento (incluindo a dermatomização) mais rápidos, e levando a uma menor variabilidade dos dados experimentais. Estes diferentes substratos cutâneos devem ser armazenados à temperatura de -20°C e, portanto, antes da sua utilização, é necessária a avaliação da integridade desses substratos¹.

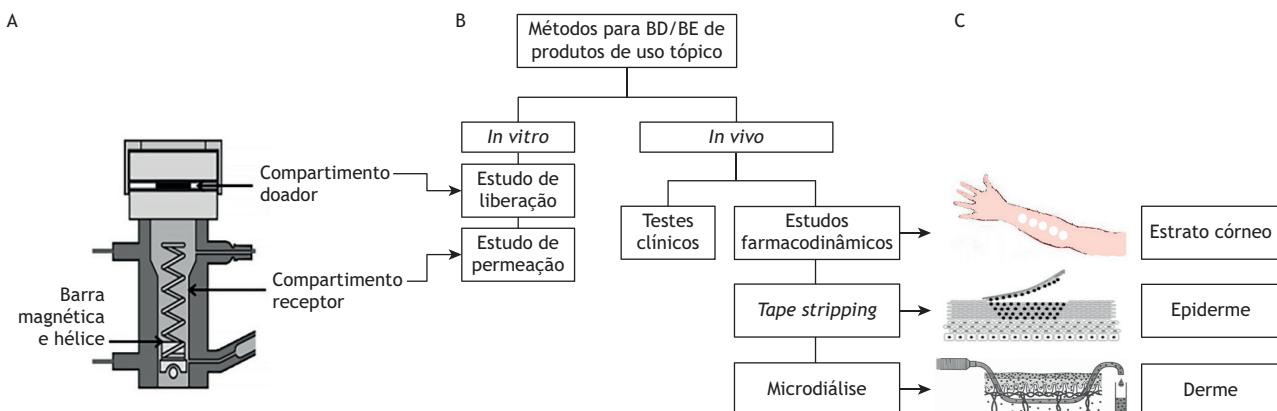
TESTES CLÍNICOS COMPARATIVOS

Os testes clínicos comparativos são considerados padrão ouro para a avaliação da BE de qualquer medicamento. No entanto, para medicamentos aplicados topicalmente, estes testes, em geral, são pouco sensíveis devido à alta variabilidade interindividual, são demorados, caros e necessitam de um grande número de participantes¹⁶, impossibilitando, na maioria das vezes, a sua realização, principalmente em países em desenvolvimento como é o caso do Brasil. Desta forma, a necessidade de testes que possam substituí-lo de forma segura deve ser considerada. Do ponto vista bioético, a diminuição do uso de seres humanos em estudos clínicos é um objetivo que mobiliza pesquisadores em todo o mundo. A substituição de um método *in vivo* por um método alternativo *in vitro* ou a utilização de outros métodos *in*

vivo utilizando um menor número de voluntários tem uma grande relevância científica e social.

TESTE FARMACODINÂMICO

Até o momento, como já mencionado, os únicos métodos aceitos pelo FDA para avaliar a BE de produtos tópicos restringem-se aos ensaios clínicos e farmacodinâmicos. O teste farmacodinâmico (ensaio de branqueamento) é de fácil execução. Os participantes da pesquisa são expostos a pequenas quantidades de formulação por curto período de tempo, o método é relativamente reproduzível e requer uma pequena amostra, quando comparado aos estudos clínicos comparativos (12 participantes da pesquisa para o estudo piloto e 40-60 para o estudo principal). Entretanto, esses estudos são aplicáveis apenas para fármacos corticosteroides¹⁷. A resposta farmacodinâmica dos glicocorticoides está associada com sua habilidade em produzir vasoconstricção na microvasculatura da pele, levando ao branqueamento no local da aplicação (Figura 1C). Desta forma, a intensidade do branqueamento pode ser correlacionada com a potência, bem como com o grau de liberação do fármaco no EC. Diversos estudos têm mostrado a correlação entre estes resultados e àquelas de eficácia clínica, em pacientes^{18,19}. Ao mesmo tempo, alguns autores também têm demonstrado que se trata de um teste passível de saturação, ou seja, a partir de certo nível de produto aplicado, o teste não conseguiria detectar diferenças de pouca intensidade entre as formulações. Apesar desta limitação, este método é aceito pelo FDA para a avaliação de medicamentos genéricos de uso tópico. Segundo o Guia do FDA *Topical Dermatologic Corticosteroids*:



FDA: Food and Drug Administration; BD/BE: Biodisponibilidade/Bioequivalência

Fonte: Adaptado de Hanson Research⁶²(A), Wiedersberg et al., 2006⁴⁷ (B) e Adaptado de Au et al.⁶¹(C).

Figura 1. (A) Modelo esquemático da célula de Franz; (B) Principais métodos para a determinação da BE de produtos uso tópicos (os métodos em itálico ainda estão sob avaliação do FDA; (C) Figuras representativas do ensaio de branqueamento, DPK e MD.

Tabela. Comparação dos parâmetros biofísicos das peles suína e humana *in vivo*.

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

Fonte: Sekkat et al. (2002) (apud Tabosa⁸).

H¹: Espessura do EC; D²: Difusividade da água através da pele; K_p³: Coeficiente de permeabilidade da água através da pele



*In vivo Bioequivalence*²⁰, é imperativa a realização de dois ensaios, sendo um piloto (preliminar), que tem por objetivo estabelecer a relação entre duração de dose e resposta farmacológica do produto referência (Figura 1C), e outro ensaio principal e mais extenso, no qual são comparadas as respostas *in vivo* do produto teste e produto referência, empregando ferramentas estatísticas apropriadas. Um fator crítico a ser considerado neste experimento é o volume de preparação aplicada, que se torna ainda mais complexo, para preparações nas quais o fármaco é apresentado em diferentes formas farmacêuticas (por exemplo, soluções e cremes). Considerando a legislação brasileira, isto não seria, portanto um fator de relevância, já que os medicamentos, para serem considerados genéricos, necessitam obrigatoriamente ter a mesma forma farmacêutica. Para realização do referido estudo, o cromômetro é o equipamento aceito pelo FDA para esta finalidade, independentemente de todos os pontos assinalados²¹.

AVALIAÇÃO DERMOTOFARMACOCINÉTICA

A DPK é uma metodologia na qual a quantidade de fármaco presente no EC é quantificada em função da pós-aplicação e pós-remoção do produto testado, utilizando a metodologia de *tape-stripping*²². Através da avaliação da perda de água transepidermal (TEWL) e da pesagem das fitas antes e após o procedimento de *tape-stripping*, é possível avaliar o perfil de permeação do fármaco no EC versus profundidade relativa (Figura 1C)^{23,24,25}. O principal pressuposto desta técnica é que a quantidade de fármaco recuperado do EC, principal barreira da absorção percutânea, esteja diretamente relacionada à quantidade de ativo que alcança as células-alvo. Assim, esta metodologia poderá ser utilizada em substituição aos testes clínicos em estudos de BE para produtos tópicos, ou mais especificamente para produtos com ação no EC. De acordo com o protocolo original publicado pelo FDA, a abordagem da DPK pode ser feita por meio da análise do fármaco em pelo menos oito locais: quatro diferentes locais expostos ao produto são coletados em intervalos sucessivos de tempo, correspondendo à cinética de absorção, enquanto outros quatro (ou mais) são coletados em diferentes locais, também expostos ao fármaco como os anteriores (porém com período de exposição igual ao último ponto da fase de absorção e tempos de coletas mais longos), e representam a cinética de eliminação¹. Em seguida, é construído um gráfico (quantidade na pele x tempo) e avaliados os parâmetros: tempo máximo de absorção (T_{max}), concentração máxima (C_{max}), área sob a curva do tempo total do estudo (ASC_{0-t}), meia vida ($T_{1/2}$) e constante de eliminação (K_e) do fármaco (FDA, 1998)¹, como pode ser verificado na Figura 2A.

Alguns anos mais tarde, as seguintes melhorias para este método foram propostas: (1) melhor limpeza do excesso de formulação em cada local de aplicação no final do período de absorção; (2) inclusão e determinação da concentração de fármaco nas duas primeiras fitas; (3) aumento no número de fitas coletadas combinado a um método que garanta a remoção de quase todo o EC; (4) melhor controle da área de amostragem com as fitas, a qual deve ficar no interior de área de aplicação da droga (para evitar efeitos de borda); e (5) procedimento de análise

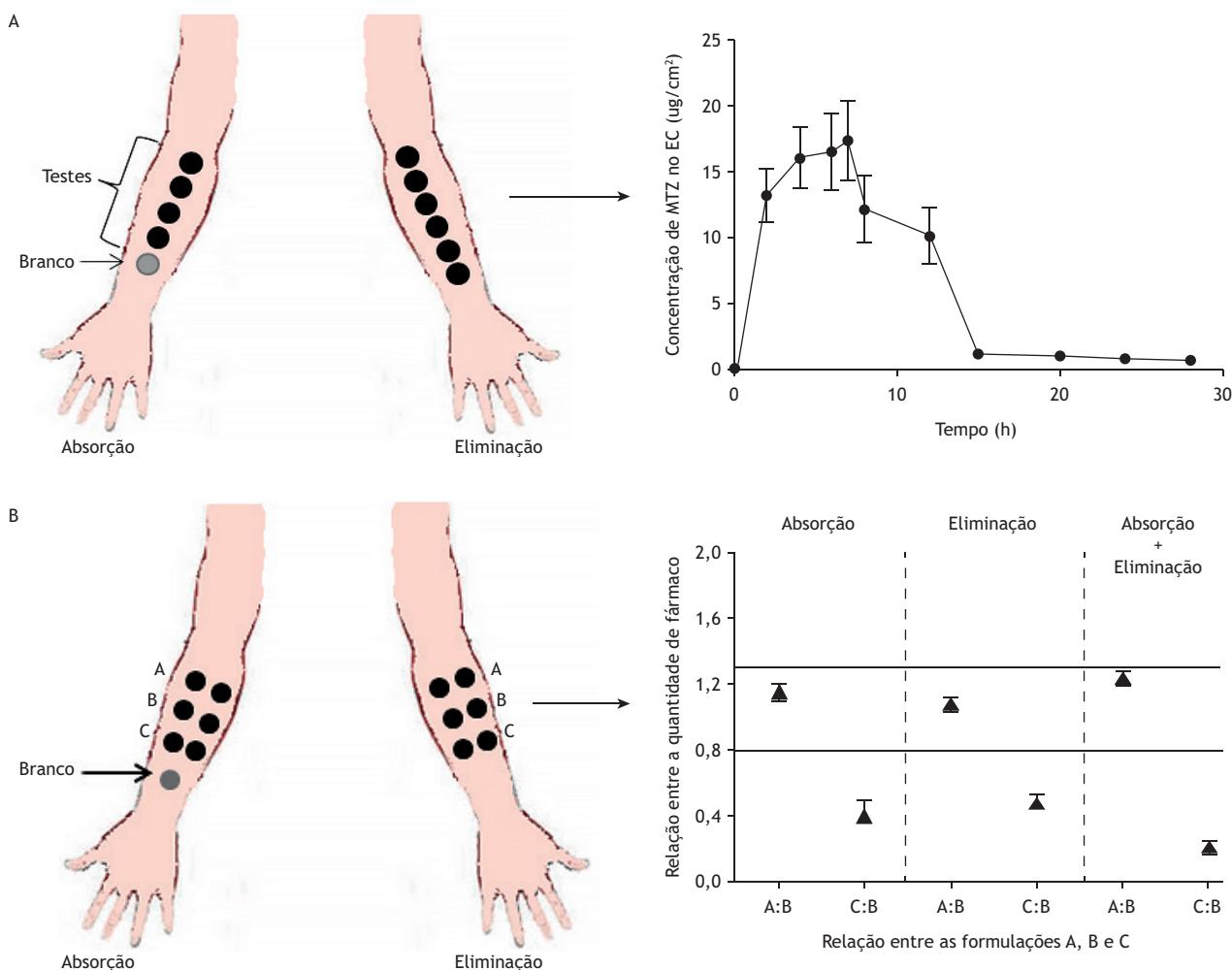
que possibilite a determinação do fármaco em todas as fitas, sozinhas ou associadas em grupos²². Esta nova análise dos dados somada à utilização de um protocolo diferenciado, na qual a absorção e a eliminação são avaliadas em apenas dois diferentes pontos, demonstraram que a comparação da BE entre diferentes formulações pode ser realizada mais facilmente, tendo a chance de ser mais reproduzível, visto que as análises são feitas em duplicata, conforme demonstrado na Figura 2B²⁶. Visando garantir que foi removido praticamente todo o EC, a avaliação da perda de água transepidermal é parâmetro essencial. Assim, preconiza-se que a última coleta de EC deve ocorrer quando o valor de TEWL alcança ~120 g/m²h. Por meio da avaliação de formulações de metronidazol gel 0,75% seguindo os melhoramentos na técnica de DPK supramencionados, nossa equipe foi capaz de evidenciar diferenças entre as formulações testadas (com alta reprodutibilidade e baixa variação nos dados) quando as análises da concentração do fármaco no EC foram feitas seja por área ou volume, tanto para o tempo de absorção como de eliminação, considerando ou não a quantidade de EC coletada, corroborando com os estudos realizados por N'stempfer^{22,27}. No entanto, novos estudos utilizando fármacos com características físico-químicas diferentes devem ser realizados.

Na realidade, o procedimento de DPK repousa numa técnica barata, relativamente rápida e que necessita de um pequeno número de indivíduos. De acordo com estudos realizados com formulações contendo o econazol²⁸ e corroborados por nosso grupo de pesquisa²⁷, na avaliação de formulações contendo metronidazol, a utilização de 14 voluntários sadios foi suficiente para demonstrar, com segurança, a BE de produtos tópicos.

A avaliação de DPK também tem sido realizada *in vitro*, utilizando pele de porco. No entanto, considerando que os mecanismos de eliminação da pele, nesse estado, não se encontram em pleno funcionamento e isto, somado principalmente à natureza lipofílica de alguns fármacos, como o econazol²⁸, pode tornar mais difícil a análise de DPK no tempo de eliminação usualmente empregado *in vivo*. Vale salientar que os estudos de DPK *in vitro*, em pele da região dorsal do porco, têm demonstrado baixa variabilidade dos dados experimentais (Figura 3)²⁷. Ao mesmo tempo, alguns estudos de correlação *in vitro/in vivo* utilizando estes dados têm sido descritos na literatura^{2,29,30,31,32,33}.

MICRODIÁLISE DÉRMICA

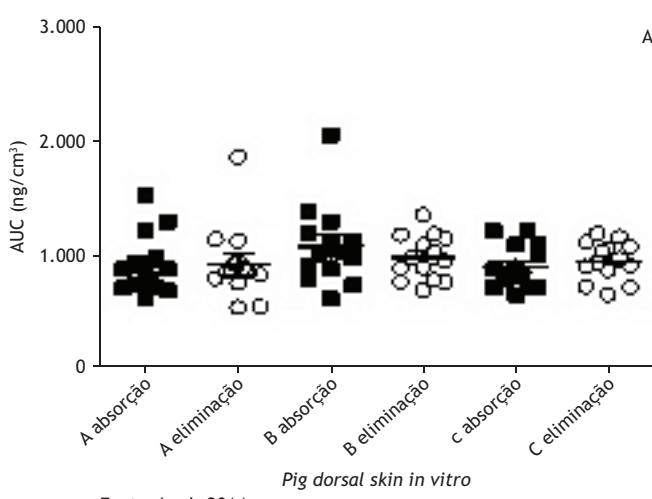
Dentre as outras técnicas citadas, a MD traduz-se por uma metodologia *in vivo* que visa a análise da concentração do fármaco livre no fluido extracelular, nos tecidos ou órgãos³⁴. Como não há perdas de fluidos corporais, pode ser utilizada em animais de pequeno porte e em humanos, mediante implantação de diferentes tipos de sondas em diferentes regiões^{35,36,37}. No caso da MD, esta técnica permite quantificar o teor de fármaco no fluido extracelular da derme/epiderme, e amostras podem ser continuamente coletadas durante um determinado período de tempo. De fato, muitos pesquisadores têm relatado a avaliação da penetração de fármacos a partir de formulações tópicas, utilizando estudos de MD em ratos, porco e no homem³⁸.



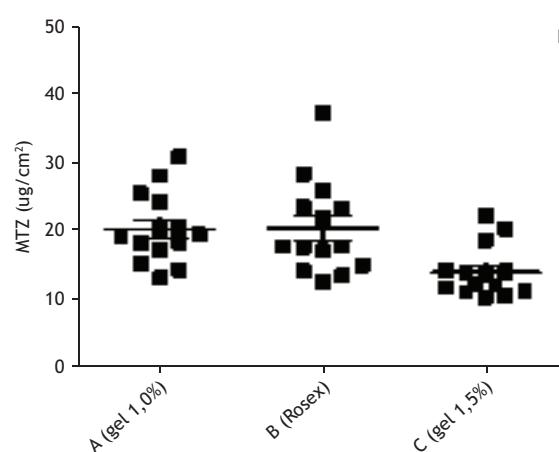
MTZ: metronidazol 0,75%; EC: estrato córneo

Fonte: Araújo, 2014.

Figura 2. (A) Perfil DPK em humanos, do metronidazol 0,75% (MTZ) no EC após a aplicação tópica de Rozex® segundo Guia do FDA (N = 8); (B) Avaliação da BE de géis de MTZ 0,75% (produtos testes A e produto teste C) em comparação com o medicamento de referência (produto B) medido em duplicata, em 14 voluntários saudos assumindo um tempo de absorção e um tempo de eliminação.



Fonte: Leal, 2014.



Fonte: Araujo, 2016.

Figura 3. (A) Quantidades de fármaco por unidade de volume/área avaliado em pele da região dorsal do porco para três produtos de econazol medidos após 6h de absorção e 17h de eliminação (n = 14) e (B) três produtos de MTZ medidos após 6h de absorção (n = 14).



Trata-se da utilização de uma sonda, neste caso é preconizada a do tipo linear, que deve ser introduzida entre a epiderme e a derme (Figura 1C). A profundidade de inserção da sonda é uma etapa crítica e que influenciará nos resultados obtidos, considerando que, segundo a lei de Fick, a espessura do tecido a ser permeado é inversamente proporcional ao fluxo do fármaco. A sonda serve como um vaso artificial, permitindo a troca de pequenas moléculas difusíveis a partir do fluido extracelular para a sonda e vice-versa. Assim, semelhante às experiências com absorção oral, este método pode proporcionar perfis de concentração x tempo, permitindo medições farmacocinéticas. Outro ponto, é que as formulações de teste e de referência podem ser testadas simultaneamente em cada voluntário a partir de vários pontos de amostragem. O que é de fundamental importância, uma vez que reduz a variabilidade inter-indivíduo, reduzindo assim o número total de voluntários necessários para estabelecer a BE de medicamentos de aplicação tópica³⁹. Um ponto desfavorável é que a microdiálise pode não ser adequada para todos os tipos de analito, como moléculas grandes e moléculas lipofílicas que podem ser amostras mais desafiadoras⁴⁰.

A microdiálise é um procedimento mais invasivo, quando comparado ao procedimento de DPK e mesmo havendo diferentes tipos de sondas, há uma dificuldade de implantação comum a todas elas, bem como na capacidade de determinar a quantidade de molécula a ser recuperada. Esta, por sua vez, é influenciada pelo fluxo, pela característica do líquido de perfusão, pelo tipo de molécula e área superficial da membrana. Vale salientar que, para cada teste, a recuperação *in vivo* da sonda deve ser avaliada para permitir a correção das amostras analisadas^{41,42}.

DOSEAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS A PARTIR DOS PROCEDIMENTOS DE DPK E MD

Existem vários relatos na literatura com relação à determinação da concentração de fármaco no EC por meio da análise de fitas. No entanto, a maior parte dos métodos usados não foi descrita como validada de acordo com um guia oficial. Alguns destes descrevem apenas ensaios de recuperação, seletividade e linearidade^{43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55}. A avaliação da confiabilidade dos dados gerados a partir da análise de fármacos em matrizes complexas de origem biológica e que correspondem a processos cinéticos, ou seja, variação da concentração em função do tempo (MD) ou da profundidade no EC (DPK), necessita de uma avaliação do ponto de vista da bioanálise.

Na validação do método bioanalítico, a forma de avaliação de alguns parâmetros deve ser procedida de forma diferente daqueles relativos aos métodos analíticos. Em atualização recente, a Anvisa desmembrou o guia de validação de métodos bioanalíticos⁵⁶ que anteriormente estava associado ao de métodos analíticos⁵⁷.

Dentre estes parâmetros, a avaliação da linearidade é realizada através do monitoramento da precisão e exatidão em todos os níveis da curva de calibração pela concentração calculada por meio da regressão utilizada e não somente pela avaliação do coeficiente de determinação (r^2). Isso se torna importante considerando principalmente que as quantidades de analito medida

em cada fita, obtida a partir do processo de permeação do fármaco no EC, alcançam concentrações diferentes, como pode ser observado no modelo esquemático (Figura 2A).

Neste mesmo sentido, é necessária a avaliação da precisão e exatidão do método com a realização de amostras de controle de qualidade em pelo menos quatro níveis diferentes: limite inferior de quantificação (LIQ) e controles de qualidade baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA) em pelo menos três sequências analíticas diferentes, sendo pelo menos uma delas em dia diferente das demais. Esse procedimento é essencial visto que os estudos de MD e DPK usualmente geram um grande número de amostras (*high throughput*), implicando em várias sequências analíticas diferentes.

Ao mesmo tempo, os fármacos são extraídos de uma matriz biológica (pele humana e/ou animal) com alta possibilidade de interferência de compostos endógenos, especialmente em cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta (CLAE-UV). Por este ponto de vista, a avaliação da interferência de componentes da pele de no mínimo quatro diferentes participantes da pesquisa/animais deve ser avaliada, e não somente da formulação sem o princípio ativo (placebo) como preconizado para métodos analíticos. A avaliação da recuperação pelo processo de extração deve ser avaliada em pelo menos três níveis de concentração diferentes (CQB, CQM e CQA) para verificar a homogeneidade da eficiência de recuperação no intervalo de calibração do método, a utilização de um composto como padrão interno deve ser considerada em casos de variação do processo de recuperação.

A estabilidade do fármaco na pele, em solução extratora, na fita bem como após o procedimento de extração deve ser avaliada, pois processos cinéticos com vários pontos de coleta e várias réplicas geram sequências analíticas com grande número de amostras, implicando em longo tempo no porta-amostra do equipamento dotado de amostrador automático.

Neste contexto, e considerando que ambos os métodos de DPK e MD estão sendo reconhecidos como abordagens promissoras na avaliação da BE de produtos tópicos, o desenvolvimento e validação de metodologia bioanalítica apropriada, para aplicação *in vivo* e *in vitro* deve ser explorada, considerando a RE nº 899/2003⁵⁷ e RDC nº 27/2012⁵⁶ da Anvisa e com base na orientação editada pelo FDA em 2013, para validação desses métodos⁵⁸.

AVALIAÇÃO DE MEDICAMENTOS GENÉRICOS NO BRASIL

No Brasil, a legislação vigente para registro de medicamentos genéricos e similares de aplicação tópica, não destinados a efeitos sistêmicos, não exige a apresentação de estudos de BE ou estudos clínicos para candidatos a genérico, como descrito na RDC nº 60, de 10 de outubro de 2014⁵⁸. Assim, atualmente, o produto pode ser isento de estudo de BD relativa/BE, se o medicamento teste apresentar o mesmo fármaco, na mesma concentração em relação ao medicamento referência (equivalentes farmacêuticos) e excipientes de mesma função do medicamento comparador. Os excipientes utilizados na formulação teste deverão ser bem estabelecidos para a forma farmacêutica,



via de administração e em concentrações adequadas à função pretendida. Para tanto, deve ser apresentada apenas a avaliação da equivalência farmacêutica (Eqfar). Entretanto esses estudos de Eqfar avaliam apenas os parâmetros físico-químicos e microbiológicos estabelecidos em compêndios oficiais como a Farmacopeia Brasileira⁷. Em abril de 2016, com a publicação da Resolução RDC n° 73, de 7 de abril de 2016⁵⁹, nenhum estudo foi solicitado para comparar as formulações semissólidas antes do registro e em casos de alterações pós-registro. Assim, não existe, até o momento, um guia oficial brasileiro recomendando e/ou orientando as indústrias com relação às bases técnico-científicas envolvidas nas metodologias de execução do(s) teste(s) ou delimitando especificações necessárias. Levando em consideração que a penetração do fármaco no EC é um processo complexo e dependente, entre outros fatores, das propriedades físico-químicas do fármaco, do tipo de formulação e tipo de associação estabelecida com a formulação, podemos esperar que a eficácia clínica de um produto tópico dermatológico dependa intimamente do produto medicamentoso final⁷.

DESAFIOS NO CONTEXTO DA LEGISLAÇÃO BRASILEIRA

Considerando todos os fatos acima expostos, a Figura 4 descreve os itens que, na nossa ótica, necessitam ser inicialmente discutidos e posteriormente padronizados, tomando como base o Guia da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

(OECD) 428⁶⁰ bem como o *Guidance for Industry* do FDA², visando uma adaptação à realidade brasileira. Esta padronização segue uma ordem de prioridade e facilidade de implementação, iniciando com os estudos *in vitro*. Desta forma, uma vez implementadas as modificações necessárias quando do registro/modificação de produto de uso tópico junto à Anvisa, o próximo passo seria a discussão dos testes *in vivo*. Neste contexto, a avaliação dos produtos corticoides mediante teste de branqueamento deve ser relatada à parte, considerando a especificidade deste grupo de fármacos. Para os demais, considerando o local de ação do fármaco na pele, as metodologias a serem aplicadas seriam a dermatofarmacocinética (DPK) e/ou a microdiálise cutânea (MC). Vale salientar que as indústrias farmacêuticas brasileiras, após o desenvolvimento do mercado de genéricos, acumularam capacidade técnico-científica para não só discutirem possíveis modificações como para se adequarem a elas. Ao mesmo tempo, existem vários centros no Brasil, certificados pela Anvisa, que realizam testes de BE para medicamentos de uso oral, englobando inclusive avaliação de cinéticas de liberação bem como dados farmacocinéticos, que, com sua experiência e competência, serão fundamentais neste processo de discussão. Tais centros poderão ao mesmo tempo contribuir para a realização dos testes propostos, devido à gama de equipamentos analíticos de alta seletividade e sensibilidade (CLAE acoplada à espectrometria de massas sequencial), sistemas de garantia da qualidade e pessoas tecnicamente qualificadas já existentes, e operacional, propiciando a obtenção de dados com a confiabilidade necessária.

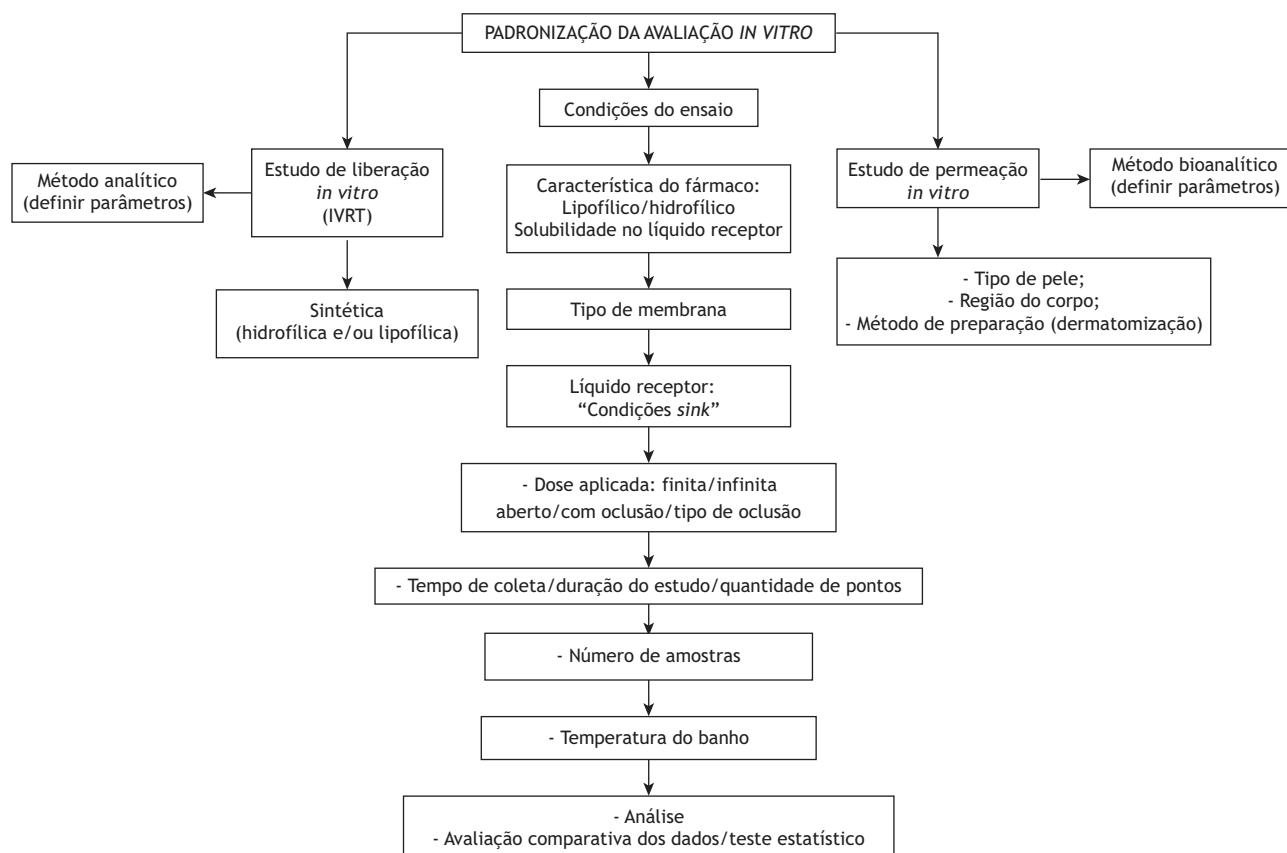


Figura 4. Fluxo de trabalho a ser seguido/avaliado na realização dos testes de BE de produtos tópicos e ação local no Brasil.



CONCLUSÃO

Estas primeiras reflexões nos levam a vislumbrar que, baseados na relativa simplicidade dos métodos *in vitro* bem como na sua facilidade de implementação, parâmetros para a abordagem essencialmente *in vitro* devem ser definidos, inicialmente. Posteriormente, uma discussão ampla envolvendo Anvisa, comunidade científica e segmento industrial deveria ser buscada,

visando avaliar a viabilidade técnica e econômica de adequação à realidade brasileira, do emprego dos métodos *in vivo*, aqui discutidos, para determinação da BE dos produtos de administração tópica e ação local, vislumbrando não só o melhor controle da segurança e eficácia destes produtos genéricos no mercado brasileiro, mas também a implementação de ferramentas de análise para desenvolvimento de produtos inovadores com maior competitividade nos diversos blocos econômicos a nível mundial.

REFERÊNCIAS

1. U. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Draft guidance. Rockville: Food and Drug Administration; 1998
2. U. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Guidance for industry on special protocol assessment; availability. Rockville: Food and Drug Administration; 2002.
3. Pershing LK. Bioequivalence assessment of three 0.025% tretinoin gel products: dermatopharmacokinetic vs. clinical trial methods. Rockville, 2001 [acesso 20 jan 2016]. Disponível em: http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/slides/3804s2_02_Pershing/index.htm
4. Conner DP. Bioequivalence assessment of three 0.025% tretinoin gel products: dermatopharmacokinetic vs. clinical trial methods. Título do documento. 2001 [acesso 20 jan 2016]. Disponível em: http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/slides/3804s2_05_conner/index.htm
5. Franz TJ, Leahman PA, Raney SG. Use of excised human skin to assess the bioequivalence of topical products. Skin Pharmacol Physiol. 2009;22(5):276-86. <https://doi.org/10.1159/000235828>
6. Shah VP, Williams RL. Challenges in evaluating bioequivalence of topical dermatological drug products. In: Shah V, Maiback HI, Jenner J, editors. Topical drug bioavailability, bioequivalence and penetration. 2nd ed. New York: Springer; 2014. p. 101-12.
7. Soares KCC, Moraes MV, Gelfuso GM, Gratieri T. Bioequivalência de medicamentos tópicos dermatológicos: o cenário brasileiro e os desafios para a vigilância sanitária. Ciênc Saúde Coletiva. 2015;20(11):3599-608. <https://doi.org/10.1590/1413-812320152011.01082015>
8. Tabosa MAM. Microemulsões contendo lapachol: desenvolvimento, caracterização e avaliação biofarmacêutica *vitro* e *in vivo* [dissertação]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2014.
9. Silva JA. Desenvolvimento, caracterização e estudo de permeação cutânea de diclofenaco de dietilamônio em sistemas tópicos nanoemulsionados [tese] Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2008.
10. Schmook FP, Meingassner JG, Billich A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in *in-vitro* percutaneous absorption. Int J Pharm. 2001;(215):51-6.
11. Lanke SSS, Kolli CS, Strom JG, Banga AK. Enhanced transdermal delivery of low molecular weight heparin by barrier perturbation. Int J Pharm. 2009;365(1):26-33. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.08.028>
12. Leopold CS. Pharmacokinetic analysis of the FDA guidance for industry: "Topical dermatologic corticosteroids: *in vivo* bioequivalence". Eur J Pharm Biopharm. 2003;56(1):53-8. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(03\)00045-6](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(03)00045-6)
13. Barbero AM, Frasch HF. Pig and guinea pig skin as surrogates for human *in vitro* penetration studies: a quantitative review. Toxicol In Vitro. 2009;23(1):1-13. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.10.008>
14. Panchagnula R, Bokalial R, Sharma P, Khandavilli S. Transdermal delivery of naloxone: skin permeation, pharmacokinetic, irritancy and stability studies. Int J Pharm. 2005;293(1-2):213-23. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.01.004>
15. Sekkat N, Kalia YN, Guy RH. Biophysical study of porcine ear skin *in vitro* and its comparison to human skin *in vivo*. J Pharm Sci. 2002;91(11):2376-81. <https://doi.org/10.1002/jps.10220>
16. Shaw VP, Flynn GL, Yacobi A, Maibach HI, Bon C, Fleischer NM et al. Bioequivalence of topical dermatological dosage forms: methods of evaluation of bioequivalence. Pharm Res. 1998;15(2):167-71. <https://doi.org/10.1023/A:1011941929495>
17. U. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Guidance for industry: topical dermatological drug product NDAs and ANDAs-*in vivo* bioavailability, bioequivalence, *in vitro* release, and associated studies. Rockville: Food and Drug Administration; 1995.
18. Pershing LK, Silver BS, Krueger GG, Shah VP, Skelley JP. Feasibility of measuring the bioavailability of topical betamethasone dipropionate in commercial formulations using drug content in skin and a skin blanching bioassay. Pharm Res. 1992;9(1):45-51. <https://doi.org/10.1023/A:1018975626210>
19. Cornell RC, Stoughton RB. Correlation of the vasoconstriction assay and clinical activity in psoriasis. Arch Dermatol. 1985;121(1):63-7. <https://doi.org/10.1001/archderm.1985.01660010067020>
20. Leopold CS. Pharmacokinetic analysis of the FDA guidance for industry: "Topical dermatologic corticosteroids: *in vivo* bioequivalence". Eur J Pharm Biopharm. 2003;56(1):53-8. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(03\)00045-6](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(03)00045-6)



21. Walker RB, Haigh JM, Smith EW. Application of the Minolta chromameter to the assessment of corticosteroid-induced skin blanching. In: Schwint DA, Maibach HI, editors. Cutaneous niometrics. New York: Kluwer Academic; 2000 p. 295-305.
22. N'Dri-Stempfer B, Navidi WC, Guy RH, Bunge AL. Optimizing metrics for the assessment of bioequivalence between topical drug products. *Pharm Res.* 2008;25(7):1621-30. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9577-4>
23. Herkenne CA, Naik A, Kalia Y, Hadgraft J, Guy RH. Pig ear skin ex vivo as a model for in vivo dermatopharmacokinetic studies in man. *Pharm Res.* 2006;23(8):1850-6. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-9011-8>
24. Kalia YN, Alberti I, Sekkat N, Curdy C, Naik A, Guy RH. Normalization of stratum corneum barrier function and transepidermal water loss in vivo. *Pharm Res.* 2000;17(9):1148-50. <https://doi.org/10.1023/A:1026474200575>
25. Russel LM, Wiedersberg S, Delgado-Charro MB. The determination of stratum corneum thickness: an alternative approach. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;69(3):861-70. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.02.002>
26. N'Dri-Stempfer B, Navidi WC, Guy RH, Bunge AL. Improved bioequivalence assessment of topical dermatological drug products using dermatopharmacokinetics. *Pharm Res.* 2009;26(2):316-28. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9742-9>
27. Araujo TP. Bioequivalência tópica de produtos contendo metronidazol através da dermatofarmacocinética (DPK) [dissertação]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2016.
28. Leal LB. Novos métodos para avaliação da segurança e eficácia de fármacos e ingredientes cosméticos em sistemas micro e nanoemulsionados: relatório de pesquisa. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2014.
29. Herkenne C, Naik A, Yogeshvar NK, Hadgraft J, Guy RH. Ibuprofen transport into and through skin from topical formulations: in vitro -in vivo comparison. *J Invest Dermatol.* 2007;127(1):135-42. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700491>
30. Mohammed D, Matts PJ, Hadgraft J, Lane ME. *In Vitro-In Vivo* correlation in skin permeation. *Pharm Res.* 2014;31(2):394-400. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1169-2>
31. Parfit NR, Skinner M, Bon C, Kanfer I. Bioequivalence of topical clotrimazole formulations: an improved tape stripping method. *J Pharm Pharmaceut Sci.* 2011;14(3):347-57.
32. Lehman PA, Raney SG, Franz TJ. Percutaneous absorption in man: in vitro-in vivo correlation. *Skin Pharmacol Physiol.* 2011;24(4):24-30. <https://doi.org/10.1159/000324884>
33. Klang V, Schwarz JC, Lenobel B, Nadj M, Auböck J, Wolzt M et al. In vitro vs. in vivo tape stripping: validation of the porcine ear model and penetration assessment of novel sucrose stearate emulsions. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012;80(3):604-14. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.11.009>
34. Holmgård R, Nielsen JB, Benfeldt E. Microdialysis sampling for investigations of bioavailability and bioequivalence of topically administered drugs: current state and future perspectives. *Skin Pharmacol Physiol.* 2010;23(5):225-43. <https://doi.org/10.1159/000314698>
35. Darvish AS, Carroll RT, Geldenhuys WJ, Gudelsky GA, Klein J, Meshul CK et al. In vivo brain microdialysis: advances in neuropsychopharmacology and drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2011;6(2):109-27. <https://doi.org/10.1517/17460441.2011.547189>
36. Lira EC. Efeito anticatabólico dos derivados de xantina no metabolismo de proteínas em músculo esquelético de ratos sépticos: um estudo de microdialise [dissertação]. São José do Rio Preto: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; 2006.
37. Munari, M. Avaliação do efeito de um extrato lipofílico de *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schltl sobre os níveis cerebrais de dopamina e seus metabólitos através da microdialise cerebral em ratos conscientes [dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006.
38. Norihiro S, Kazuko K, Yutaka O, Hideo M, Hitoshi Y. Microdialysis assessment of percutaneous penetration of ketoprofen after transdermal administration to hairless rats and domestic pigs. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011;78(3):415-21. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.03.005>
39. Narkar Y. Bioequivalence for topical products: an update. *Pharm Res.* 2010;27(12):2590-601. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0250-3>
40. Shukla C, Bashaw ED, Stagni G, Benfeldt E. Applications of dermal microdialysis: a review. *J Drug Deliv Sci Tech.* 2014;24(3):259-69. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(14\)50044-5](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(14)50044-5)
41. Müller M. Microdialysis in drug development. New York: Springer; 2012.
42. Lietsche J, Gorrak J, Hardta S, Karasb M, Kleina J. Self-built microdialysis probes with improved recoveries of ATP and neuropeptides. *J Neurosci Methods.* 2014;237:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.08.015>
43. Alberti I, Kalia YN, Naik A, Bonny JD, Guy RH. In vivo assessment of enhanced topical delivery of terbinafine to human stratum corneum. *J Control Release.* 2001;71(3):319-27. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00244-9](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00244-9)
44. Pershing LK, Bakhtian S, Poncelet CE, Corlett JL, Shah VP. Comparison of skin stripping, in vitro release, and skin blanching response methods to measure dose response and similarity of triamcinolone acetonide cream strengths from two manufactured sources. *J Pharm Sci.* 2002;91(5):5. <https://doi.org/10.1002/jps.10147>
45. Lodén M, Åkerström U, Lindahl K, Berne B. Bioequivalence determination of topical ketoprofen using a dermatopharmacokinetic approach and excised skin penetration. *Int J Pharmac.* 2004;284(1-2):23-30. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.07.018>
46. Benfeldt E, Hansen SH, Vølund A, Menne T, Shah VP. Bioequivalence of topical formulations in humans: evaluation by dermal microdialysis sampling and the dermatopharmacokinetic method. *J Invest Dermatol.* 2007;127(1):170-8. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700495>



47. Wiedersberg S, Leopold CS, Guy RH. Dermatopharmacokinetics of betamethasone 17-vakerate: influence of formulation viscosity and skin surface cleaning procedure. *Euro J Pharmac Biopharmac.* 2009;71(2):362-6. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.10.001>
48. Aggarwal NS, Goindi s, Khurana R. Formulation, characterization and evaluation of an optimized microemulsion formulation of griseofulvin for topical application. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2013;105:158-66. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.01.004>
49. Herkenne C, Naik A, Kalia YN, Hadgraft J, Guy RH. Ibuprofen transport into and through skin from topical formulations: *in vitro-in vivo* comparison. *J Invest Derm.* 2007;127(1):135-42. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700491>
50. Pershing LK, Corlett J, Jorgensen C. In vivo pharmacokinetics and pharmacodynamics of topical ketoconazole and miconazole in human stratum corneum. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38(1):90-5. <https://doi.org/10.1128/AAC.38.1.90>
51. Wan T, Xu T, Pan J, Qin M, Pan W, Zhang G et al. Microemulsion based gel for topical dermal delivery of pseudolaric acid B: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Int J Pharm.* 2015;493(1-2):111-20. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.07.058>
52. Nagelreiter C, Mahrhauser D, Wiatschka K, Skipiol S, Valenta C. Importance of a suitable working protocol for tape stripping experiments on porcine ear skin: influence of lipophilic formulations and strip adhesion impairment. *Int J Pharm.* 2015;491(1-2):162-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.06.031>
53. Dai W, Wang C, Yu C, Yao J, Sun F, Teng L et al. Preparation of a mixed-matrix hydrogel of vorinostat for topical administration on the rats as experimental model. *Eur J Pharm Sci.* 2015;78:255-63. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.07.019>
54. Patel NA, Patel NJ, Patel RP. Comparative development and evaluation of topical gel and cream formulations of psoralen. *Drug Discov Ther.* 2009;3(5):234-42.
55. Hathout RM, Mansour S, Geneidi AS, Mortada ND. Visualization, dermatopharmacokinetic analysis and monitoring the conformational effects of a microemulsion formulation in the skin stratum corneum. *J Colloid Interface Sci.* 2011;354(1):124-30. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.10.025>
56. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. *Diário Oficial União.* 18 maio 2012.
57. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. *Diário Oficial União.* 2 jun 2003.
58. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. RDC Nº 60, de 10 de outubro de 2014. Dispõe sobre os critérios para a concessão renovação do registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. *Diário Oficial União.* 13 out 2014.
59. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução RDC N° 73, de 7 de abril de 2016. Dispõe sobre mudanças pós-registro, cancelamento de registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos e dá outras providências. *Diário Oficial União.* 8 abr 2016.
60. Organization for Economic Co-operation and Development - OECD. Guideline for the testing of chemicals: skin absorption: *in vitro* method. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development; 2004.
61. Au WL, Skinner M, Kanfer I. Bioequivalence assessment of topical clobetasol propionate products using visual and chromametric assessment of skin blanching. *J Pharm Pharm Sci.* 2008;11(1):160-6. <https://doi.org/10.18433/J3NP48>
62. Hanson Research. Vision® Microette™: diffusion testing. Chatsworth: Hanson Research; 2016 [acesso 14 maio 2016]. Disponível em: <https://hansonresearch.com/diffusion-testing/vision-microette>

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.

Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.