

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**  
**DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO II**

**VICTÓRIA MAITO COLDEBELLA**

**AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE, BIOEQUIVALÊNCIA E  
EQUIVALÊNCIA TERAPÊUTICA DE FORMAS FARMACÊUTICAS  
SEMISSÓLIDAS TÓPICAS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

**FLORIANÓPOLIS**  
**2019**  
**VICTÓRIA MAITO COLDEBELLA**

**AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE, BIOEQUIVALÊNCIA E  
EQUIVALÊNCIA TERAPÊUTICA DE FORMAS FARMACÊUTICAS  
SEMISSÓLIDAS TÓPICAS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina apresentado à disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II como requisito parcial para a obtenção do Título de Farmacêutico.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Elenara Maria  
Teixeira Lemos Senna

FLORIANÓPOLIS

2019

Victória Maito Coldebella

**AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE, BIOEQUIVALÊNCIA E EQUIVALÊNCIA  
TERAPÊUTICA DE FORMAS FARMACÊUTICAS SEMISSÓLIDAS TÓPICAS: UMA  
REVISÃO SISTEMÁTICA**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Farmacêutico e aprovado em sua forma final na Disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II do Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 28 de Novembro de 2019

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mareni Rocha Farias  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elenara Maria Teixeira Lemos Senna  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Thiago Caon (Membro Titular)  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Dr.<sup>a</sup> Leticia Mazzarino (Membro Titular)  
NanoScoping

---

M.<sup>a</sup> Carine Zuglianello (Suplente)  
Universidade Federal de Santa Catarina

*A minha mãe, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Professora orientadora Elenara Maria Teixeira Lemos Senna pela orientação, auxílio e incentivo que teve comigo ao longo do trabalho.

Ao Professor Thiago Caon, à farmacêutica Dr.<sup>a</sup> Leticia Mazzarino pela disponibilidade em fazer parte da banca-examinadora.

À minha mãe por toda paciência, palavras de conforto e amor, por todo o suporte que sempre me foi dado. Sem ela não seria o que sou hoje e não teria chegado até aqui.

À minha família, por sempre encorajar, especialmente meu irmão, Marco Antônio Coldebella, por todas as palavras carinhosas de incentivo.

Aos meus amigos, por prestarem o apoio nas horas difíceis e compartilhar alegrias ao longo do curso.

À minha prima, Farmacêutica Paula Furlanetto, por me motivar a ingressar no curso de farmácia e ser um exemplo de profissional para mim.

*São nossas escolhas que revelam realmente quem somos, muito mais que  
nossas qualidades.*

*- Alvo Dumbledore*

## RESUMO

Os medicamentos dermatológicos tópicos consistem em sua maioria de formas farmacêuticas semissólidas, podendo ter finalidade de ação local, ação regional ou ação sistêmica. Atualmente, existe uma discussão acerca da necessidade de avaliar a biodisponibilidade e bioequivalência de formulações genéricas e similares de uso tópico, com o intuito de assegurar a eficácia e segurança do medicamento. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo realizar uma revisão de literatura acerca dos métodos disponíveis para avaliação da biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos tópicos e das exigências regulatórias para avaliação do desempenho destas formulações. Após pesquisa das palavras chaves *dermatological products*, *bioequivalence*, *pharmaceutical equivalence*, *bioavailability*, *semi-solid dosage forms*, *dermopharmacokinetics* e *regulations* nas bases de dados Portal da CAPES, Scopus e Google Acadêmico, entre o período de 2005 e 2019, foram encontrado ao todo 102.752 referências, das quais foram selecionadas 67 por atender os critérios de inclusão previamente definidos. Entre os métodos encontrados estão o método dermatofarmacocinético, a microdiálise dérmica, testes de liberação e permeação *in vitro* e métodos espectrofotométricos. Foi realizada a pesquisa e comparação das exigências regulatórias para avaliação da biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos tópicos das agências regulatórias da Europa (*European Medicines Agency – EMA*), do Reino Unido (*Medicines & Healthcare Products Regulatory Agency – MHRA*), dos Estados Unidos (*U.S. Food & Drugs Administration – FDA*), do Canadá (*Health Canada*) e do Brasil (*ANVISA*). Em outros países, estudos clínicos ou farmacodinâmicos têm sido exigidos para a comprovação da bioequivalência de produtos tópicos. No entanto, a utilização de métodos alternativos tem sido amplamente discutida e em alguns casos estes métodos são aplicáveis para fins de registro dos medicamentos. No Brasil, os medicamentos genéricos de aplicação tópica têm sido considerados bioisentos quanto aos testes de bioequivalência, segundo a RDC 37/2011. No entanto, um recente Guia publicado pela ANVISA descreve recomendações para a avaliação da qualidade e do desempenho de produtos tópicos para fins de registro, incluindo ensaios de liberação e permeação cutânea, o que pode contribuir para a regulamentação acerca dos ensaios de equivalência terapêutica destes medicamentos.

**Palavras-chave:** medicamentos dermatológicos tópicos, biodisponibilidade, bioequivalência, dermatofarmacocinética, microdiálise, liberação e permeação cutânea *in vitro*, métodos espectrofotométricos, regulamentação.

## ABSTRACT

Dermatological drugs include mostly semi-solid dosage forms and they are intended to produce local, regional or systemic effects. Currently, there is a discussion about the need to evaluate the bioavailability and bioequivalence of topical generic or similar formulations in order to ensure the efficacy and safety of these drugs. In this context, the present study aims to carry out a literature review on the available methods for evaluating the bioavailability and bioequivalence of topically administered drugs and on the rules issued by government health agencies for evaluating the performance of these formulations. The literature review was conducted by using “dermatological products”, “bioequivalence”, “pharmaceutical equivalence”, “bioavailability”, “semi-solid dosage forms”, “dermatopharmacokinetics” and “regulations” as keywords. The CAPES Portal, Scopus and Google Scholar databases were searched over the period of time ranging from between 2005 to 2019. A total of 102,752 references were found and 67 were selected, considering the previously established criteria. The methods described in the literature for evaluating the performance of topical dosage forms included the dermatopharmacokinetic method, dermal microdialysis, *in vitro* release and permeation studies, and spectrophotometric methods. The guidelines published by the regulatory agencies concerning the evaluation of the bioavailability and bioequivalence of topical medicines were analyzed and compared. The regulatory agencies included the *European Medicines Agency* (EMA, Europe), *Medicines & Healthcare Products Regulatory Agency* (MHRA, United Kingdom), *U.S. Food & Drugs Administration* (FDA, United States), *Health Canada*, and the *Brazilian Health Regulatory Agency* (ANVISA, Brazil). In general, clinical or pharmacodynamic studies are required for the regulatory agencies to prove the bioequivalence of between topical drugs. However, the use of alternative methods has been widely discussed and in some cases these methods are applied for drug registration purposes. In Brazil, generic topical drugs are considered waived regarding to the bioequivalence tests, according to the RDC 37/2011. However, a recent guideline published by ANVISA described the criteria for evaluating the quality and performance of topical products, and it may be considered an initial milestone for the regulation of generic and similar drugs intended to topical drug delivery.

**Key-words:** topical dermatological products, bioavailability, bioequivalence, dermatopharmacokinetics, microdialysis, *in vitro* release and permeation test, spectrophotometric, regulation.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação das diferentes camadas da epiderme .....	19
Figura 2 - Rotas de permeação de uma molécula pelo estrato córneo .....	19
Figura 3 – Distribuição das referências bibliográficas por (a) tipo de Instituição e (b) por local da publicação .....	27
Figura 4 - Número de artigos relacionados aos estudos de biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos tópicos nos últimos 15 anos .....	28
Figura 5 - Número de artigos encontrados com os principais métodos para avaliação da biodisponibilidade e bioequivalência de preparações semissólidas de uso tópico .....	28
Figura 6 – Sistema de difusão vertical .....	32
Figura 7 - Procedimento do DPK .....	41
Figura 8 - Implantação de sonda de MDD linear na derme .....	43
Figura 9 - Ilustração dos quatro tipos de sonda .....	44

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 - Exemplos de fármacos utilizados na aplicação tópica .....	14
Quadro 2 - Componentes utilizados em formulações tópicas semi-sólidas ....	16

## LISTA DE ABREVIACES

<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>ASC</b>	rea sob a curva
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>C<sub>máx</sub></b>	Concentração máxima
<b>CRS</b>	Espectroscopia confocal de Raman (do inglês, <i>confocal Raman Microscopic</i> )
<b>CSLM</b>	Microscopia confocal de varredura a laser (do ingls, <i>confocal laser scanning microscopy</i> )
<b>DPK</b>	Dermofarmacocintico (do ingls <i>dermatopharmacokinetics method</i> )
<b>EC</b>	Estrato crneo
<b>EMA</b>	<i>European Medicines Agency</i>
<b>EU</b>	Unio Europeia
<b>FDA</b>	<i>U.S. Food and Drugs Administration</i>
<b>IVRT</b>	Teste de liberação <i>in vitro</i> (do ingls, <i>in vitro release testing</i> )
<b>IVPT</b>	Estudo de permeação cutnea <i>in vitro</i> (do ingls, <i>in vitro permeation testing</i> )
<b>NIR</b>	Espectrometria de infravermelho prximo (do ingls, <i>near infrared spectrometry</i> )
<b>MDD</b>	Microdiálise drmica
<b>MHRA</b>	<i>Medicine &amp; Healthcare Products Regulation Agency</i>
<b>T<sub>mx</sub></b>	Tempo mximo
<b>TWEL</b>	Perda transepidrmica de água (do ingls, <i>transepidermal water loss</i> )

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E CONTEXTO TEÓRICO .....</b>	<b>13</b>
1.1. Formas Farmacêuticas Semissólidas .....	14
1.2. Pele.....	17
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
2.1. OBJETIVOS GERAIS .....	23
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>25</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>26</b>
4.1. MÉTODOS EMPREGADOS PARA AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE E BIOEQUIVALÊNCIA DE PREPARAÇÕES DE USO TÓPICO.....	29
4.1.1. TESTES DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO IN VITRO .....	29
4.1.2. TAPE STRIPPING .....	34
4.1.3. MICRODIÁLISE.....	39
4.1.4. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS.....	43
4.2. MÉTODOS PRECONIZADOS OU ACEITOS PELAS AGÊNCIAS REGULATÓRIAS PARA AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE MEDICAMENTOS DE USO TÓPICO.....	45
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>51</b>

## 1. INTRODUÇÃO E CONTEXTO TEÓRICO

O emprego de formulações de liberação tópica e transdérmica nos remete a tempos antigos e uma longa e contínua história. Há mais de 2 mil anos, médicos de diversas partes do mundo, como chineses, romanos e gregos, usavam formulações, como cataplasmas e pastas, para tratar lesões da pele e ulcerações (WILLIAMS, 2016).

Atualmente, as formulações para aplicação na pele consistem na sua maioria de formas farmacêuticas semissólidas, destinadas a liberar uma concentração de fármaco que seja eficaz terapêuticamente. A administração do fármaco através da pele é realizada a fim de se obter entrega controlada e/ou prolongada do fármaco, sendo utilizada como uma via alternativa à via oral (RUELA *et al.*, 2016). Medicamentos quando aplicados sobre a pele em formas farmacêuticas semissólidas podem ter como finalidade a ação local, regional ou sistêmica. Medicamentos de ação local são destinados a agir diretamente sobre a pele, enquanto para a ação regional é necessária a permeação do fármaco através da pele para agir em locais próximos de onde a formulação é aplicada, por exemplo, como ocorre em géis contendo anti-inflamatórios aplicados localmente para tratar condições musculoesqueléticas. A obtenção de uma ação sistêmica ocorre quando o fármaco atravessa a pele e alcança a circulação sanguínea (WILLIAMS, 2016).

Os agentes dermatológicos tópicos são aplicados diretamente na pele para tratar ou prevenir doenças que acometem este tecido. Os fármacos de aplicação tópica incluem anestésicos locais, anti-inflamatórios, antiacneicos, antivirais, antifúngicos, antipsoríase e antitumorais (Quadro 1) (CHANG *et al.*, 2012). As vantagens da liberação tópica incluem a redução dos efeitos adversos, quando comparado com a administração de medicamentos pela via oral, conveniência em termos de portabilidade, facilidade de administração e uma maior dose de fármaco aplicada onde se faz necessária. Já as desvantagens incluem a necessidade de repetitivas aplicações, uso restrito a doenças que podem ser tratadas pela via cutânea e um início de ação mais demorado do que outras formas farmacêuticas (OAKLEY, 2016).

Quadro 1 – Exemplos de fármacos utilizados na aplicação tópica.

Classe terapêutica	Fármaco
Anestésicos locais	Lidocaína, benzocaína, prilocaina
Anti-inflamatórios	Triamcinolona, tacrolimo, propionato de clobetasol, fluocinonida
Antiacneicos	Tretinoína, cloridrato de metronidazol, eritromicina, clindamicina, peróxido de benzoíla
Antivirais	Aciclovir, imiquimode, ácido salicílico
Antifúngicos	Cetoconazol, clotrimazol, terbinafina, ciclopirox, terconazol
Antipsoríase	Ácido láctico, hidrocortisona, calcipotriol
Antibacterianos	Sulfanilamida, nistatina, sulfato de neomicina

FONTE: Adaptado de CHANG *et al.*, 2012

Dependendo de características físico-químicas do fármaco, este pode agir nas camadas mais superficiais ou nas camadas mais profundas da pele. Alguns medicamentos são designados para aplicação e ação na superfície da pele, sem haver penetração no estrato córneo, como os repelentes e fármacos usados para o tratamento de pediculoses e, nestes casos, os excipientes podem auxiliar na retenção do fármaco na superfície da pele. Entretanto, muitos dos medicamentos de aplicação tópica necessitam penetrar no estrato córneo para tratar patologias que afetam as camadas mais profundas da pele. As formas farmacêuticas semissólidas estão entre as mais empregadas para uma aplicação tópica cutânea e incluem as pomadas, géis, cremes e pastas (CHANG *et al.*, 2012).

### 1.1. Formas Farmacêuticas Semissólidas

As pomadas contêm menos de 20% de água e mais do que 50% de hidrocarbonetos, ceras, ou polióis, como veículo. Geralmente são formulações gordurosas para aplicação na pele ou nas membranas mucosas. São utilizadas

mais comumente em lesões secas, indicadas como emolientes para aliviar, alisar e hidratar a pele. As bases graxas são altamente oclusivas, evitando a perda de água por transpiração e hidratando a pele por consequência. A hidratação da pele, especificamente do estrato córneo, facilita o fluxo de fármacos que, em conjunto com o longo tempo de residência na pele, oferece liberação prolongada deste (LOURENÇO, 2013; WILLIAMS, 2016).

Os géis são preparações constituídas de uma base líquida que contém uma ou mais partículas orgânicas dissolvidas (gel de fase única) ou dispersas (gel de duas fases), gerando um sistema semissólido. Possui em sua formulação um agente espessante que aumenta a viscosidade da preparação e fornece a textura porosa do gel. A base dos géis pode ser constituída de água, álcool, misturas de solventes miscíveis entre si ou de um solvente apolar (WILLIAMS, 2016).

Os cremes são as formas farmacêuticas emulsionadas mais utilizadas em formulações dermatológicas. São preparações de duas fases, uma interna (também conhecida como fase dispersa), que se encontra finamente e homogeneamente distribuída em uma fase externa (fase dispersante) (WALTERS; BRAIN, 2009). As emulsões podem ser óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O), dependendo da natureza das fases dispersa e dispersante utilizadas. Os cremes O/A são os mais empregados, visto que são menos oleosos que pomadas, mais fáceis de aplicar, podem ser lavados da superfície da pele mais facilmente e, portanto, são mais bem aceitos pelos pacientes (ASSUNÇÃO, 2017). No entanto, são menos oclusivos que as pomadas e por isso, não são tão benéficos em peles e lesões secas (WILLIAMS, 2016).

Já as pastas contêm uma alta porcentagem de partículas sólidas finamente dispersas, com uma consistência mais rígida que uma pomada. São divididas em duas classes: aquelas constituídas de um gel aquoso monofásico, e as chamadas pastas gordurosas, as quais consistem em pomadas mais espessas e rígidas que normalmente não fluem à temperatura do corpo e, portanto, atuam como um revestimento protetor sobre as áreas as quais são aplicadas. São bastante úteis na absorção de secreções, sendo utilizadas em lesões agudas com tendência para a formação de crostas, vesículas e exsudados (UEDA *et al.*, 2009; LOURENÇO, 2013).

As formas farmacêuticas semissólidas apresentadas acima são constituídas por uma ampla variedade de excipientes, que são combinados para obter uma melhor aceitação do produto pelo consumidor. Além do veículo, componentes específicos de formulação podem ser necessários, dependendo das propriedades do fármaco, como solubilidade e estabilidade, e de considerações clínicas, como estado da pele e local de aplicação. Os excipientes comumente usados em formulações tópicas são apresentados no quadro 2.

Quadro 2 – Componentes utilizados em formulações tópicas semisólidas

Função	Descrição	Exemplos
Emoliente	Principal função de aumentar a hidratação do tecido	Lanolina, parafina, ácido esteárico, polietilenoglicol.
Emulsificante	Usados para reduzir a tensão interfacial para estabilizar emulsões e melhorar a solubilidade de materiais hidrofóbicos.	Polissorbatos 20, 60 e 80, poloxamer, cera emulsificante, lauril sulfato de sódio.
Umectante	Promove a retenção de água no sistema.	Glicerina, sorbitol, propilenoglicol.
Espessante	Aumenta a viscosidade, é o principal componente dos géis.	Metilcelulose, gelatina, alginato de sódio, goma guar.
Conservante	Previne o crescimento microbiano.	Ácido benzóico, propilparabeno, metilparabeno, ácido sórbico.
Quelante	Diminui as reações de oxidação e hidrólise	Tetraacetato de etileno diamina.
Antioxidante	Minimiza a deterioração por oxidação.	Hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado.
Agente tamponante	Mantêm um pH apropriado para a forma farmacêutica.	Ácido cítrico, ácido fosfórico, hidróxido de sódio, trietanolamina.
Veículo/Solvente	Facilita a dispersão e dissolução de insumos farmacêuticos ativo.	Água purificada, propilenoglicol, óleo mineral, hexilenoglicol.

FONTE: Adaptado de Chang *et al.*, 2012.



## 1.2. Pele

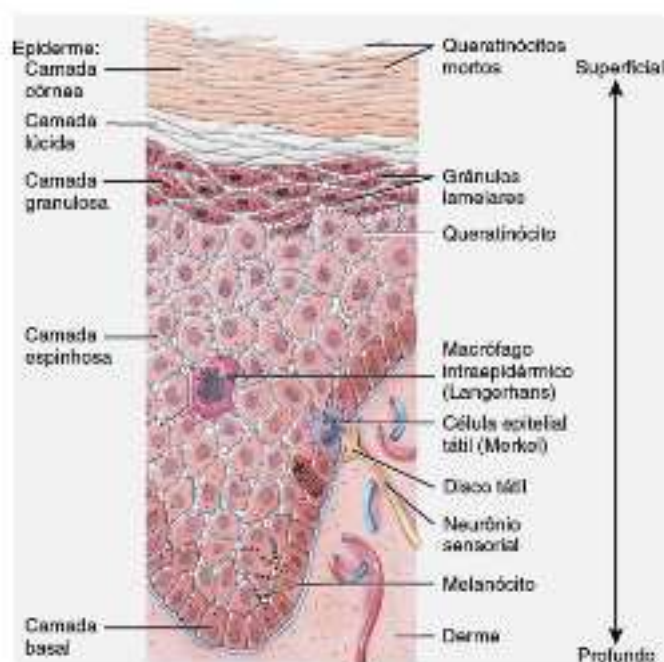
A pele é o órgão mais extenso do corpo humano, possuindo uma área entre 1,5 a 2,0 m<sup>2</sup> e possui como função primária promover uma barreira física entre o corpo e o ambiente externo. Esta barreira é muito eficaz contra a permeação de raios ultravioletas, produtos químicos e microrganismos. A pele também exerce função na homeostasia, regulando a temperatura do corpo e a pressão sanguínea. Além disso, funciona como um órgão sensorial muito importante, por estar em contato direto com o meio ambiente, sendo estimulado por diferentes temperaturas, pressões e sensações (BENSON, 2012).

Anatomicamente, a pele possui constituição heterogênea e é composta por três camadas: epiderme, derme e hipoderme. A hipoderme é a camada mais interna da pele, rica em gordura, que atua como isolante térmico, na absorção de choques e no armazenamento de energia (VOLPATO, FREITAS, STORPIRTIS, 2009). A derme, camada intermediária, tem sido definida como uma rígida matriz de tecido conjuntivo de suporte, contendo estruturas especializadas dispostas imediatamente abaixo e intimamente conectadas à epiderme. A derme contém colágeno, fibras elásticas, vasos sanguíneos, nervos, assim como folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas, sendo responsável pela nutrição da epiderme por contiguidade. Também estão presentes nesta camada as células mesenquimais primitivas e dentríticas, e os fibroblastos, macrófagos, mastócitos e linfócitos. Os fibroblastos presentes na derme são responsáveis pela síntese de colágeno, reticulina, elastina, fibronectina, glicosaminoglicanos e collagenase (BARBOSA, 2011). A camada mais externa é a epiderme, que é avascular, e os fármacos são transportados através dela apenas por difusão passiva (VOLPATO, FREITAS, STORPIRTIS, 2009).

A epiderme é constituída de cinco camadas: estrato córneo, estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinhoso e estrato basal (também conhecido como estrato germinativo) (Figura 1). A camada basal é a mais interna, que se separa da derme pela membrana basal. É constituída por células germinativas

chamadas de queratinócitos, possuem formato colunar e são alinhadas perpendicularmente à membrana basal, ancoradas por hemidesmossomos (fibras de queratina). Além dos queratinócitos, também estão presentes melanócitos que são células produtoras de melanina e, responsáveis pela pigmentação da pele; células de Langerhans que possuem função de defesa imunológica; e células de Merkel que atuam na percepção tátil (HARRIS, 2016). O estrato espinhoso consiste de duas a seis camadas de queratinócitos, logo acima do estrato basal. Nesta camada da epiderme, os queratinócitos mudam de morfologia, de colunar à poligonal e seu citoplasma contém muitas organelas e filamentos. No estrato granuloso, os queratinócitos continuam a se diferenciar, e nesta camada estão presentes muitos grânulos de queratohialina, os quais são precursores da queratina (WALTERS; BRAIN, 2009). No estrato lúcido, o núcleo e as organelas dos queratinócitos desaparecem. A queratinização aumenta e as células tornam-se achatadas e compactas, formando o estrato córneo. Essa camada está presente apenas na pele espessa como nas palmas das mãos e nas plantas dos pés (BENSON, 2012; MORAIS, 2006).

Figura 1 – Representação das diferentes camadas da epiderme.

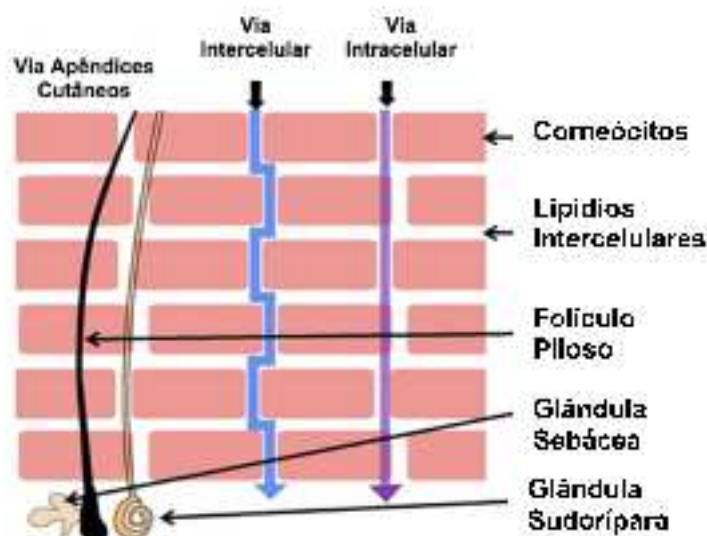


Fonte: TORTORA; DERRICKSON, 2016

O processo de diferenciação celular abrange dois fenômenos: a migração vertical das células do estrato basal para a superfície da pele e a diferenciação destas células para formar o estrato córneo (MORAIS, 2006). Esta é a camada mais externa da pele e é constituída de 10 a 20 camadas de células ricas em queratina (corneócitos) orientadas paralelamente à superfície, possuindo apenas 10 µm de espessura. O espaço intercelular é preenchido por uma matriz lipídica e, mesmo sendo formado por células queratinizadas mortas, o estrato córneo constitui uma camada dinâmica com alta quantidade de enzimas que regulam o processo de descamação e o nível de hidratação da pele (MOJUMDAR; BOUWSTRA, 2019).

O estrato córneo constitui a principal barreira a penetração e permeação de fármacos através da pele. Fármacos penetram na pele principalmente através do tortuoso caminho dos espaços intercelulares, embora a absorção percutânea também possa ocorrer pela via transcelular e apêndices cutâneos, como folículos pilosos e ductos sudoríparos (Figura 2) (CHANG *et al.*, 2012; ALKILANI; MCCRUDDEN; DONNELLY, 2015). Apesar de corresponderem apenas 0,1% da área total da pele no corpo humano, os apêndices têm sido considerados importantes vias para a penetração cutânea de fármacos, visto que a mistura do suor aquoso com o sebo lipídico forma um ambiente parecido com aquele da rota intercelular (SONI; KUMAR; GUPTA, 2009; BENSON, 2012). É importante salientar que as diferentes rotas de permeação de fármacos através da pele operam juntamente para qualquer molécula penetrante, entretanto, a proporção de moléculas que atravessam as diferentes vias varia de acordo com suas características físico químicas (WILLIAMS, 2016).

Figura 2 – Rotas de permeação de uma molécula através do estrato córneo.



Fonte: HAQUE; TALUKDER, 2018

O transporte de fármacos através da pele tem sido descrito como um processo que envolve várias etapas, incluindo a dissolução e liberação do fármaco a partir da formulação, e sucessivas etapas de partição e difusão entre e através das diferentes camadas da epiderme viável e derme, podendo alcançar os vasos capilares, o que permite a sua entrada para a circulação sistêmica (KHALIA E GUY, 2001). A penetração dos fármacos através da pele ocorre por difusão passiva, em que as moléculas se movem por um movimento aleatório de uma região para a direção decrescente de concentração. A taxa de transporte através do estrato córneo obedece a primeira lei de difusão de Fick:

$$J = -D\Delta C/\Delta x \quad \text{Equação 1}$$

onde J é o fluxo (a taxa de transferência de massa em que o material passa por unidade de área de superfície), D é o coeficiente de difusão do permeante, C é a concentração da substância difundida, e x é a espessura da membrana (VOLPATO, FREITAS, STORPIRTIS, 2009; WILIANS, 2016). Assim, segundo a primeira lei de Fick, a taxa de transporte de fármacos depende da sua solubilidade aquosa, coeficiente de partição óleo/água e concentração no veículo, bem como da área superficial da pele à qual está exposta, e é inversamente proporcional à espessura do estrato córneo. A permeação

cutânea também é influenciada por diversos outros fatores, tais como a composição e pH da formulação, local e grau de hidratação da pele, presença de enzimas e temperatura (NAIR *et al.*, 2013; MEHTA, 2019).

A Anvisa estabelece que biodisponibilidade “indica a velocidade e a extensão de absorção de um princípio ativo em uma forma de dosagem, a partir de sua curva concentração/tempo na circulação sistêmica ou sua excreção na urina” (BRASIL, 2019). Apesar do conceito de biodisponibilidade não ser tradicionalmente aplicado às formulações tópicas de ação local, o termo biodisponibilidade na pele ou tópica tem aparecido em inúmeras publicações atuais. Além disso, uma vez que a patente de um medicamento inovador expira, qualquer outra companhia farmacêutica pode fabricar e comercializar este medicamento, devendo para isto fornecer dados que demonstrem a equivalência terapêutica em relação ao medicamento de origem. Normalmente, ensaios clínicos são considerados o padrão ouro para a demonstração da equivalência terapêutica de formas farmacêuticas de uso tópico. No entanto, tais estudos são onerosos, consomem tempo e requerem um grande número de indivíduos (JAIN, 2014). Nestes casos, tem sido proposto o emprego de métodos alternativos para assegurar a biodisponibilidade e bioequivalência de produtos tópicos, incluindo estudos dermatofarmacocinéticos, estudos *in vitro*, como os que empregam células de Franz, e *ex vivo*, que empregam modelos de pele isolada (JAIN, 2014; LEAL *et al.*, 2017; SUTHAKARAN, 2017; RANEY *et al.*, 2015). No entanto, deve ser claro que não existe um teste que isoladamente permita determinar a biodisponibilidade e bioequivalência de produtos dermatológicos de uso tópico (SUTHAKARAN, 2017). Além disso, ao contrário dos estudos farmacocinéticos de formulações de administração oral que dependem apenas da absorção do fármaco, os parâmetros farmacocinéticos na pele dependem também do momento em que a administração é interrompida, além de ser um processo lento que possibilita a retirada da formulação por atrito, antes do fármaco ser absorvido completamente (FDA, 1997).

As formulações de liberação tópica são complexas em múltiplos aspectos: possuem complexas formulações, e diferentes rotas de liberação, formas de dosagem e combinações de excipientes. São considerados

bioequivalentes aqueles medicamentos que apresentam biodisponibilidade comparável ao medicamento de referência, quando submetidos ao mesmo estudo experimental, e apresentam a mesma forma farmacêutica e mesma composição qualitativa e quantitativa de princípio(s) ativo(s) (BRASIL, 1999). No entanto, conforme aumenta a complexidade da formulação, aumenta também o potencial de falha para a equivalência terapêutica uma vez que tais medicamentos podem diferir quanto à presença dos adjuvantes da formulação (PAHALA SINAMORA, 2017). Além disso, mesmo considerando que os medicamentos sejam idênticos quanto a sua composição qualitativa e quantitativa, os excipientes de diferentes fornecedores podem diferir quanto às suas propriedades físico-químicas, causando um grande impacto sobre a qualidade do produto final (CHANG *et al.*, 2012).

Atualmente, existe uma necessidade em validar métodos que assegurem a qualidade, eficácia e segurança de medicamentos genéricos e similares, através da avaliação da equivalência farmacêutica e terapêutica. Nos últimos tempos, houve um grande avanço no uso de abordagens alternativas para a avaliação da bioequivalência de formulações tópicas, incluindo estudos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* (LIONBERGER, 2010). Neste contexto, esse trabalho traz como proposta a realização de uma revisão sistemática da literatura sobre os métodos disponíveis para a avaliação da biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos aplicados topicamente. Além disso, também será realizado uma análise comparativa das exigências das agências regulatórias de diversos países para fins de registro e comercialização de medicamentos tópicos genéricos e similares. Assim, com a realização deste trabalho pretende-se contribuir para as discussões acerca da regulamentação dos ensaios de biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos uso tópico com vistas a assegurar a eficácia clínica e os resultados positivos destes medicamentos para o tratamento de doenças que acometem a pele.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVOS GERAIS

Realizar uma revisão da literatura sobre as metodologias e exigências regulatórias utilizadas para avaliação da biodisponibilidade, bioequivalência e equivalência terapêutica de medicamentos semissólidos de uso tópico.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a pesquisa e a leitura de publicações acerca dos métodos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* utilizados para avaliar a biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos de uso tópico.
- Levantar e discutir as vantagens e limitações dos diferentes métodos empregados para a avaliação da biodisponibilidade de medicamentos de uso tópico.
- Realizar a pesquisa e leitura acerca das exigências das principais agências regulatórias internacionais quanto a necessidade da avaliação da biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos de uso tópico para fins de registro.
- Relacionar e discutir os dados obtidos através da pesquisa com os métodos atuais vigentes na legislação brasileira.
- Comparar e discutir as semelhanças e diferenças nas abordagens de bioequivalência aceitas para medicamentos dermatológicos tópicos genéricos entre agências regulatórias internacionais.
- Contribuir com informações relevantes para comunidade científica sobre novos métodos que podem ser empregados para assegurar a bioequivalência, apontando caminhos para o estabelecimento de

normativas de comprovação de equivalência terapêutica de medicamentos aplicados topicamente.



### 3. METODOLOGIA

Foi elaborado uma revisão sistemática sobre os métodos existentes capazes de avaliar a biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos dermatológicos tópicos.

Para a realização desta revisão bibliográfica, foi realizada uma pesquisa na literatura, com levantamento de dados originados de artigos. Foi feita busca de informações nas bases de dados informatizadas Portal da Capes, Scopus e Google Acadêmico. Para refinamento da busca, utilizou-se os seguintes termos: *topical dermatological products*, *bioequivalence*, *pharmaceutical equivalence*, *bioavailability*, *semi-solid dosage forms*, *dermopharmacokinetics e regulation*, intercalados com os operadores booleanos AND, OR e NOT. Foram excluídos do levantamento bibliográfico os medicamentos destinados à liberação sistêmica. O período da revisão bibliográfica abrangerá os anos de 2005 a 2019.

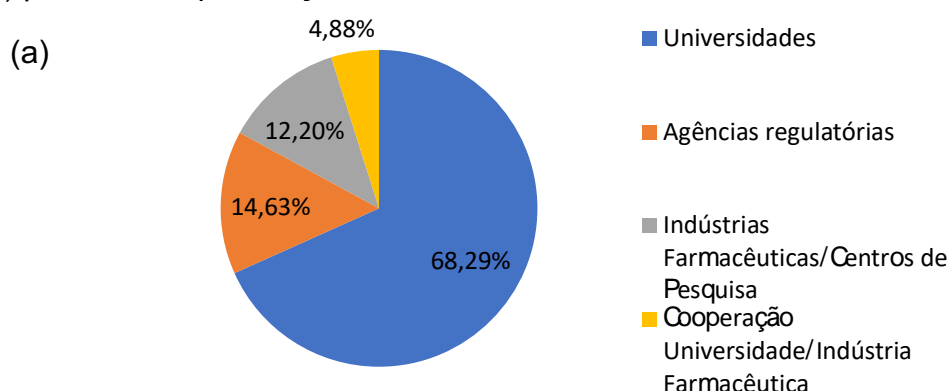
Dados de agências regulatórias foram levantados nos sites específicos e incluíram a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil), FDA (*Food and Drug Administration*, Estados Unidos), EMA (*European Medicines Agency*, Europa), MHRA (*Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency*, Reino Unido) e *Health Canadá* (Canadá).

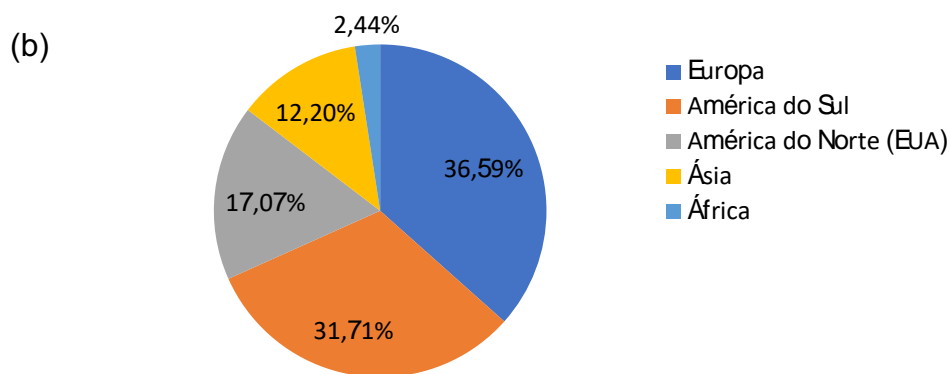
A partir da leitura e análises dos resumos, foram selecionadas as publicações mais relevantes para trabalho, organização e redação.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Empregando as palavras chaves “*dermatological products, bioequivalence, pharmaceutical equivalence, bioavailability, semi-solid dosage forms, dermopharmacokinetics e regulation*”, no período de 2005 a 2019 foram encontrados ao todo 102.752 referências, nas quais estavam distribuídas nas seguintes bases de dados: 34.939 Portal da CAPES, 49.713 Scopus e 18.100 Google Acadêmico. Dessas referências, 67 foram selecionadas e posteriormente à leitura, 26 referências foram excluídas por não se adequarem totalmente ao tema: por constar em mais de uma base de dados, ter como assunto principal liberação transdérmica ou não ter sido publicado no período pré-determinado. Dos 41 artigos elegidos, 28 (68,29%) foram publicados por instituições de ensino, 6 (14,63%) por agências regulatórias, 5 (12,20%) por indústrias farmacêuticas e centros de pesquisa e 2 (4,88%) através de uma colaboração entre indústrias e universidades (Figura 3a). Os artigos obtidos foram publicados em 18 países dos quais 15 (36,59%) eram da Europa, 13 (31,71%) dos Estados Unidos, 7 (17,07%), da América do Sul, 5 (12,20%) da Ásia e 1 (2,44%) na África (Figura 3b). A maior concentração de estudos a cerca do tema estão na Europa e nos Estados Unidos, onde a maioria das grandes indústrias farmacêuticas está instalada.

Figura 3 – Distribuição das referências bibliográficas por (a) tipo de Instituição e (b) por local da publicação.

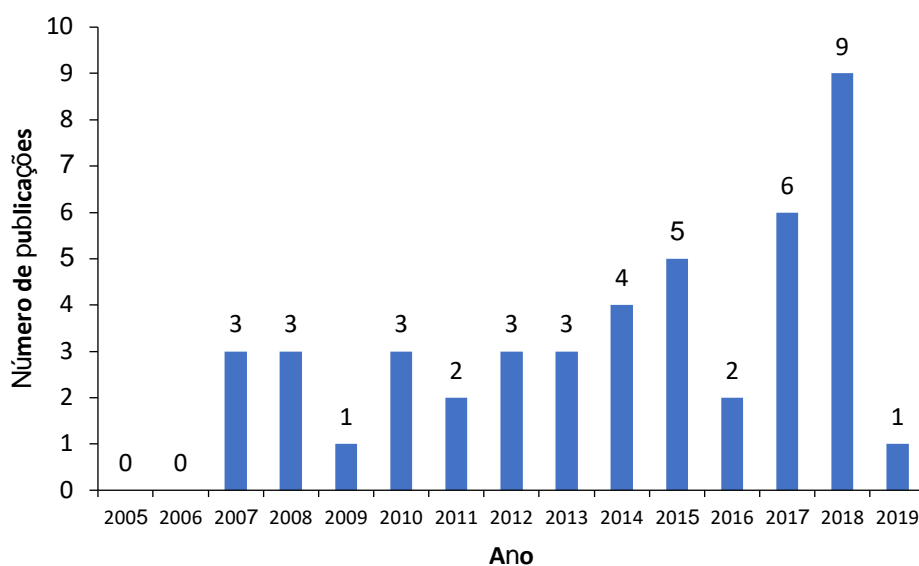




FONTE: AUTOR, 2019.

Percebe-se um aumento na quantidade de artigos publicados relacionados à biodisponibilidade e bioequivalência de produtos dermatológicos semissólidos, principalmente no ano de 2018 (Figura 4). Este resultado reflete diretamente nos esforços em pesquisar e desenvolver métodos alternativos para os estudos de bioequivalência de medicamentos dermatológicos tópicos. Um processo muito desafiador e inevitável ao mesmo tempo, visto que para medicamentos genéricos, mesmo com a expiração das patentes, a concorrência da indústria é pequena devido ao número limitado de abordagens aceitáveis para demonstrar a bioequivalência destes produtos.

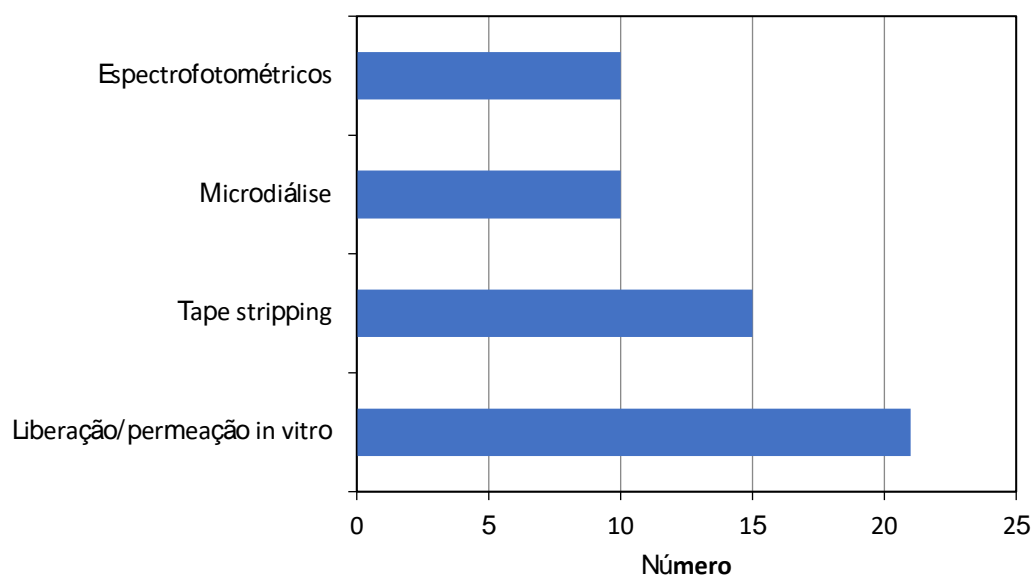
Figura 4 – Número de artigos relacionados aos estudos de biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos tópicos publicados nos últimos 15 anos.



Fonte: AUTOR, 2019

Dentre os artigos, 4 tem como tema principal as normas regulatórias sobre bioequivalência de produtos semissólidos tópicos e 37 definem, argumentam e/ou comparam os métodos existentes utilizados pelas agências regulatórias e os métodos alternativos promissores para avaliação da biodisponibilidade e bioequivalência tópica. Dos 37 artigos, 15 estão focados em um único método e 22 comparam dois ou mais métodos. O método de liberação e difusão *in vitro* é o mais citado, seguido pelo método de *tape stripping*, microdiálise e espectroscópicos (Figura 5). A abordagem *in vitro* é utilizada na indústria durante o desenvolvimento de formulações como forma de avaliar e eleger a melhor opção em termos de biodisponibilidade. Entretanto, como não apresenta uma padronização do método, cientistas estudam a melhor possibilidade de realização deste.

Figura 5 – Número de artigos encontrados com os principais métodos para avaliação da biodisponibilidade e bioequivalência de preparações semissólidas de uso tópico.



Fonte: AUTOR, 2019

A seguir será abordado as principais técnicas desenvolvidas para avaliar a biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos dermatológicos tópicos, bem como as abordagens já utilizadas pelas agências regulatórias.

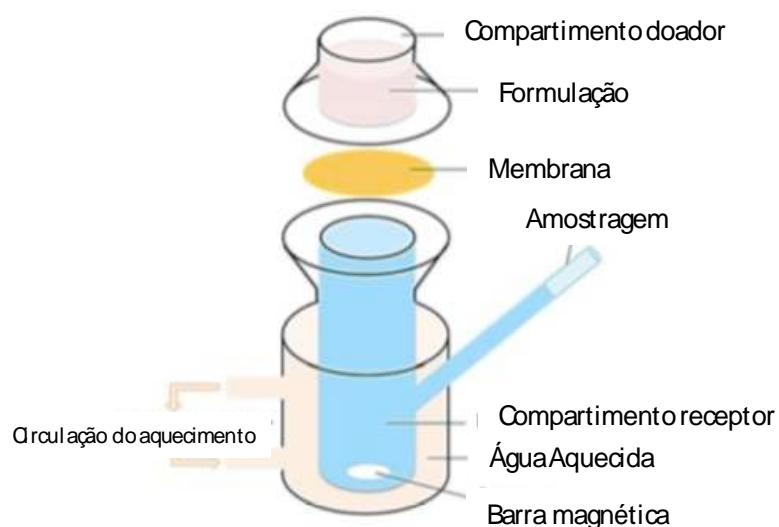
#### 4.1. MÉTODOS EMPREGADOS PARA AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE E BIOEQUIVALÊNCIA DE PREPARAÇÕES DE USO TÓPICO

##### 4.1.1. TESTES DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO IN VITRO

Ambos ensaios de liberação e permeação cutânea utilizam células de difusão bicompartimentais, também conhecidas como células de Franz, construídas com vidro de borossilicato e constituídas por dois compartimentos (doador e receptor), os quais são separados por uma membrana sintética ou pele excisada, respectivamente (Figura 8) (KLEIN; HECKART; THAKKER, 2018). Nesta técnica, uma quantidade específica da formulação semissólida é aplicada na superfície da membrana localizada entre o compartimento doador e o receptor da célula, o qual é aberto para a atmosfera, e deve simular condições típicas de aplicação. O compartimento receptor das células de Franz é preenchido com um líquido adequado simulando condições fisiológicas (normalmente utiliza-se solução salina isotônica tamponada), o qual é mantido a temperatura de 32° C, sob agitação magnética. Amostras do meio do compartimento receptor são coletadas em tempos pré-determinados e analisadas quanto à concentração do fármaco usando um método analítico adequado, normalmente a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O protocolo do ensaio deve utilizar condições apropriadas levando em consideração a formulação a ser avaliada e os objetivos propostos, incluindo o tipo de membrana (pele ou membrana sintética), aparato experimental e meio receptor. Este último é selecionado com base nas propriedades físico-químicas do fármaco, como solubilidade e coeficiente de partição óleo/água (RUELA *et al.*, 2016; SIMÕES *et al.*, 2018; YACOBI *et al.*, 2014). Como alternativa à célula de Franz, a célula de difusão de Keshary-Chien pode ser empregada para a

avaliação da permeação ou liberação de fármacos pouco solúveis em água. Apresenta configuração semelhante ao de célula de Franz, diferindo no volume do meio receptor, que é maior que 15 mL. A célula de fluxo contínuo é outro aparato semelhante indicado para avaliação do perfil de liberação de fármacos pouco solúveis em água a partir de preparações semissólidas. Neste sistema o meio é bombeado continuamente com o auxílio de uma bomba peristáltica, garantindo uma taxa de fluxo constante (RUELA *et al.*, 2016).

Figura 6 – Sistema de difusão vertical tipo Franz.



Fonte: Adaptado de BAO; BURGESS (2018)

Um longo histórico de uso da pele excisada como modelo aceitável para estudos de absorção percutânea tem sido levado em consideração como alternativa aos ensaios clínicos ou estudos farmacodinâmicos em humanos, na avaliação da biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos de uso tópico. Esta possibilidade foi explorada pelo FDA na década de 1980, mas na época foi concluído que os dados encontrados eram insuficientes para aceitar o modelo oficialmente e que eram necessários mais estudos para comprovar a sua utilização. Desde então o modelo se expandiu bastante com novos experimentos, confirmando uma grande relevância em estudos de absorção cutânea *in vitro* (LEHMAN; FRANZ, 2014)

A utilização de pele humana como membrana é considerada o padrão-ouro para avaliação de permeação. A função e integridade da barreira cutânea

são aspectos críticos, podendo ser qualificadas por medição da perda de água transepidérmica, resistência elétrica ou até por inspeção visual (SIMÕES *et al.*, 2018). Um estudo de Simonsen e Fullerton (2007) teve como objetivo desenvolver um modelo de permeação cutânea *in vitro* simulando as propriedades de barreira de uma pele com dermatite atópica, visto que os modelos baseados no uso da pele humana intacta podem não ser adequados para prever a eficácia e segurança de medicamentos, em situações clínicas em que a pele se encontra danificada. O comprometimento da barreira foi induzido pela aplicação de fitas adesivas em diferentes direções, para remoção do EC. A obtenção de uma pele semelhante àquela da dermatite atópica foi obtida pela aplicação de 25 fitas, conforme mostrado pelas medidas de perda de água transepidérmica. Os autores então avaliaram a permeação cutânea do ácido fusídico e do valerato de betametasona após aplicação do Fusicort® creme e de uma nova formulação lipídica do Fusicort®. Ao contrário do que foi encontrado para a pele intacta, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na permeação cutânea dos fármacos após aplicação das duas formulações testadas na pele danificada. Os resultados constataram a relevância de se utilizar a pele danificada para prever a biodisponibilidade, a eficácia clínica e os possíveis efeitos adversos de medicamentos de uso tópico.

Lehman e Franz (2014) compararam o estudo de permeação *in vitro* com o estudo farmacodinâmico de vasoconstrição de preparações tópicas contendo propionato de clobetasol. O ensaio de vasoconstrição ou de branqueamento da pele (*blanching skin*) está baseado na capacidade de glicocorticoides em causar a constrição dos vasos sanguíneos superficiais, e foi recomendado pelo FDA em 1995 como um método alternativo para suplantiar a realização de ensaios de bioequivalência de produtos tópicos. Ensaios de permeação cutânea foram conduzidos empregando pele de cadáver humano criopreservado e mostraram ser mais discriminatórios que o ensaio de vasoconstrição. Enquanto a permeação cutânea total do clobetasol variou cerca de 10 vezes entre os produtos testados, com coeficiente de variação de 30 a 43%, o ensaio de vasoconstrição mostrou uma diferença de menos que duas vezes entre as formulações e um coeficiente de variação de 78 a 126%.

Assim, os autores concluíram que o método de permeação cutânea é mais sensível e menos variável para a avaliação da biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos tópicos contendo glicocorticoides.

Lu *et al.* (2016) afirmaram que o uso da pele humana ou animal excisada em estudo *in vitro* fornece um perfil farmacocinético disponibilizado por meio de amostragens frequentes da solução receptora, o que não é encontrado em estudos *in vivo*. Além disso, é menos custoso e mais prático que o método DPK. O resultado encontrado por Lu *et al.* (2016) foi de que a variabilidade encontrada em pele humana é replicada em pele animal, sugerindo que uma boa correlação *in vivo/in vitro* pode ser alcançada.

A demanda pelo desenvolvimento de protocolos para métodos *in vitro* tem crescido nos últimos anos, seja para o desenvolvimento de um medicamento inovador ou para avaliação do desempenho de um medicamento genérico. O desenvolvimento de um método de liberação *in vitro* permite a otimização do processo de formulação do produto, podendo prever também parâmetros de biodisponibilidade e bioequivalência, em casos em que a correlação *in vitro/in vivo* seja demonstrada (KLEIN; HECKART; THAKKER, 2018).

No documento “*Draft Guidelines on Quality and Equivalence of Topical Products*”, a agência regulatória da Europa (*European Medicines Agency*, EMA), agrupou os testes de difusão em testes de liberação *in vitro* (IVRT, do inglês *in vitro release tests*) e estudos de permeação cutânea *in vitro* (IVPT, do inglês *in vitro permeation tests*). Segundo a EMA, nos testes de liberação *in vitro* (IVRT) são utilizadas membranas sintéticas, a dose da amostra deve ser ocluída e infinita, as quantidades detectadas então na faixa de µg a mg. Já em ensaios de permeação (IVPT), a EMA preconiza o uso de pele humana, com dose finita, e as quantidades detectadas estão na faixa de pg a ng (ZSIKÓ; CSÁNYI; KOVÁCS, 2019).

O emprego de membranas artificiais/sintética tem sido considerado uma boa alternativa para avaliação do desempenho de formulações tópicas, por serem simples e reprodutíveis, inertes. Tanto membranas sintéticas hidrofílicas, como as de acetato de celulose, polietersulfona e poliamida, e as membranas hidrofóbicas, como as de polidimetilsiloxano - muitas vezes empregadas para



simular o efeito de hidrofobicidade da pele – e de polipropileno podem ser empregadas; a escolha da membrana é baseada na lipofilicidade da molécula de fármaco (BAO; BURGESS, 2018; NG *et al.*, 2010). As vantagens de estudos empregando membranas sintéticas incluem pouca manipulação de tecidos, ausência de coleta contínua de amostra, baixa quantidade de fármaco necessário para análise, metodologia facilmente reproduzível em qualquer laboratório (SALAMANCA *et al.*, 2018). A principal limitação é o fato dos ensaios de liberação *in vitro* não reproduzirem a complexidade dos sistemas biológicos. São, portanto, empregados para a seleção da melhor formulação durante o desenvolvimento do medicamento e para avaliar o desempenho do produto ao fazer alterações pós-aprovação, mas não podem ser empregadas como substituintes na determinação da biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos tópicos. Tanto em ensaios de liberação *in vitro* (IVRT) como de permeação cutânea (IVPT), a composição do meio deve garantir as condições *sink*, ou seja, a concentração do fármaco não pode atingir valores acima de 10% de sua concentração na saturação. Assim, o fármaco precisa ser livremente solúvel no meio receptor (RUELA *et al.*, 2016)

Harrinson *et al.* (2009) avaliaram e compararam as características físico-químicas e o perfil de liberação *in vitro* de formulações alternativas de imiquimode creme com o medicamento de referência. Os autores demonstraram que, além da presença de cristais de fármaco nas formulações teste, a liberação foi mais lenta que aquela verificada para o medicamento referência. Visto que em países mais restritivos, a aprovação de medicamentos genéricos de imiquimode requer a realização de estudos de biodisponibilidade comparativa, para estes autores parece razoável que, na ausência de estudos clínicos, testes de liberação *in vitro* sejam exigidos, já que estudos de bioequivalência são de longa duração e requerem alto investimento.

Petro *et al.* (2011) avaliaram e compararam o desempenho de preparações comerciais contendo diclofenaco sódico na forma de creme, hidrogel e organogel em estudos de liberação *in vitro* e farmacológicos *in vivo*. Nos estudos *in vitro* foi avaliada e comparada a difusão do fármaco através de membranas sintéticas de acetato de celulose embebidas em miristato de isopropila, usando células de Franz. A avaliação da atividade anti-inflamatória

das formulações foi realizada empregando o modelo de edema de pata de rato induzida pela carragenina. Segundo os autores, diferenças significativas no perfil de liberação *in vitro* e na atividade anti-inflamatória *in vivo* foram encontradas entre as formulações. No entanto, foi encontrada uma correlação *in vitro/in vivo* após aplicação do creme, organogel ou hidrogel, indicando que método usando células de difusão de Franz pode ser considerado adequado para a previsão dos resultados *in vivo*. Muitos pontos críticos em relação ao ensaio de liberação *in vitro* foram observados, como a baixa quantidade do meio receptor, uso de um complicado sistema de tubos e a possibilidade de formação de bolhas, enfatizando a necessidade de validação do método. Ainda, os autores concluíram que o diclofenaco foi mais facilmente difundido através da membrana, quando presente em preparações hidrofilicas, mas uma ordem oposta foi observada nos estudos *in vivo*.

No estudo de Salamanca *et al.* (2018), o perfil de liberação do cetoprofeno a partir de duas formulações (gel e suspensão) foi avaliado usando células de Franz e dois tipos de membranas, a de celulose regenerada e um tipo que simula a liberação transdérmica (Strat-M<sup>®</sup>). A permeação do cetoprofeno mostrou ser dependente do tipo de membrana e do veículo, sendo obtidas altas eficiências de permeação do cetoprofeno a partir do gel, mas não para a formulação de suspensão. Além disso, os estudos empregando membranas Strat-M<sup>®</sup> mostraram ser reprodutíveis, podendo ser facilmente implementados em etapas de pré-formulação ou para avaliação do desempenho de produtos tópicos e transdérmicos.

#### 4.1.2. TAPE STRIPPING

O método de *tape stripping* ou *skin stripping*, muitas vezes mencionado como método dermatofarmacocinético (DPK, do inglês *dermatopharmacokinetics method*), tem se destacado na avaliação da biodisponibilidade de medicamentos topicamente administrados por meio da determinação do fármaco no estrato córneo (EC), visto que esta camada é considerada a barreira limitante para absorção na pele (INCECAYIR *et al.*, 2011). Este método foi desenvolvido na década de 1940 e examinado por

Pinkus em 1951, mas continua sendo amplamente utilizado por pesquisadores. Além dos estudos de biodisponibilidade e bioequivalência, o método tem sido empregado na determinação da função de barreira do EC e avaliação de perfis de pH, além de permitir a comparação de resultados obtidos com a utilização da pele de animais em substituição à pele humana, entre outros (HERKENNE *et al.*, 2007; NAIR *et al.*, 2013). O método é relativamente indolor e não invasivo, pois apenas os corneócitos, que são células mortas, incorporados na matriz lipídica são removidos. Além disso, mesmo que esta remoção seja uma forma de agressão à pele, uma resposta homeostática é rapidamente desencadeada, gerando uma rápida restauração na função de barreira da pele (HERKENNE *et al.*, 2007).

O emprego do DPK foi recomendado pelo U.S. Food And Drugs Administration (FDA) em 1998 para avaliação da absorção e eliminação de fármacos no EC em função do tempo, após aplicação de um medicamento na pele. Em tempos definidos, mas não especificados pelo FDA, as camadas do EC são sequencialmente removidas por 12 fitas adesivas, sendo as duas primeiras descartadas devido à possibilidade de remoção incompleta da formulação da superfície da pele. A partir de curvas de massa de fármaco encontrada do fármaco em função do tempo são avaliados os parâmetros farmacocinéticos, como área sob a curva (ASC), quantidade máxima de fármaco nas fitas ( $C_{m\acute{a}x}$ ) e o tempo decorrido para se encontrar o  $C_{m\acute{a}x}$  ( $T_{m\acute{a}x}$ ). Entretanto, um estudo dermatofarmacocinético comparativo empregando géis de tretinoína, realizado por dois diferentes laboratórios, produziu resultados conflitantes, gerando dúvidas em relação à reprodutibilidade e críticas em relação ao número de indivíduos e locais de aplicação da formulação, resultando na retirada da recomendação do uso deste método pelo FDA (WIEDERSBERG; NICOLI, 2012).

Durante o ensaio, a pesagem da fita, antes e depois da aplicação pode ser utilizada para estimar a massa de EC removida por fita, a qual é convertida em espessura do EC utilizando sua área e densidade (NAIR *et al.*, 2013). Diferentes métodos podem ser utilizados na quantificação da amostra na fita adesiva. O mais utilizado é a espectroscopia no infravermelho com refletância total atenuada (ATR), a qual é capaz de detectar inúmeras substâncias

exógenas nas camadas do EC. Entretanto, a dificuldade do método encontra-se na sobreposição das bandas de certas substâncias a serem detectadas com bandas de componentes específicos da pele. Além do ATR, são utilizados também o CLAE e a espectroscopia de absorção atômica (ZSIKÓ; CSÁNYI; KOVÁCS, 2019). Os solventes para extração da amostra são selecionados de acordo com as características de solubilidade do fármaco, então as amostras são agitadas e centrifugadas, para o fármaco ser então recuperado do sobrenadante (RUELA *et al.*, 2013).

O DPK é muito útil na avaliação de biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos que agem diretamente no EC, como antifúngicos, filtros UVA/UVB, antissépticos, entre outros. Incecayir *et al.* (2011) avaliaram a bioequivalência de duas formulações tópicas (teste e referência) de um antibiótico de amplo espectro, a oxitetraciclina, comparando o método DPK e o método de microdiálise em 12 voluntários saudáveis. O estudo indicou que o DPK é muito útil para estudo da biodisponibilidade no EC, tornando-se uma boa alternativa para avaliação da bioequivalência de agentes dermatológicos aplicados topicamente. Entretanto, diferente do método de microdiálise, com a concentração encontrada no EC não é possível prever o alcance do antibiótico na derme.

Roussel *et al.* (2015) quantificaram e avaliaram a biodisponibilidade de três filtros solares (benzofenona-2, 2-etil-hexilsalicilato e 2-etil-hexil-4-metoxicinamato) na epiderme tratada com formulações a base de vaselina e bases emulsionadas, em 4 voluntários, pela técnica de *tape-stripping*. Os autores encontraram que os coeficientes de permeação dos filtros solares foram menores nos ensaios em que foi empregada a vaselina, confirmando a importância do veículo no perfil de permeação dos filtros solares. Além disso, foi demonstrado que abordagem foi suficientemente precisa para estabelecer a equivalência cosmética das formulações.

No estudo de Cordery *et al.* (2017) o método de *tape stripping* foi utilizado juntamente com o método de permeação cutânea *in vitro* usando células de difusão, a fim de avaliar e comparar a penetração do diclofenaco na pele, a partir de três formulações de uso tópico (dois géis e uma solução). Ambos os métodos demonstraram a superioridade da solução em liberar o

fármaco para a pele. A quantificação e o subsequente *clearance* do fármaco a partir do EC de indivíduos saudáveis foram empregados como meio de avaliar a passagem do fármaco para a epiderme viável e derme. Evidências foram encontradas pelos autores que permitiram correlacionar os resultados do ensaio de *tape stripping (in vivo)* com os da permeação cutânea em células de difusão (*in vitro*). Assim, o estudo indicou a validade do método de *tape stripping* para avaliação da biodisponibilidade do diclofenaco na epiderme e derme.

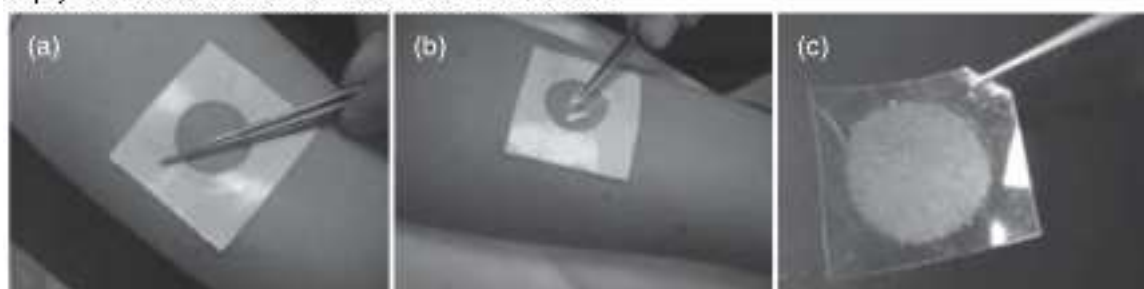
Savi *et al.* (2017) compararam o desempenho de formulações de microemulsões contendo tacrolimo com o medicamento de referência (Protopic pomada 0,1%) em ensaios de liberação em célula de difusão vertical e membrana de diálise e de *tape stripping*, usando pele de orelha de porco. Este fármaco é um potente imunossupressor muito utilizado no tratamento da dermatite atópica e sua utilização constitui um grande desafio devido a sua baixa solubilidade aquosa, elevada massa molecular (804,02 g/mol) e baixa estabilidade em pH > 7,0, o que dificulta a obtenção de formulações aquosas e limita sua penetração e permeação cutânea. Neste estudo, os autores evidenciaram a superioridade das microemulsões, em comparação à pomada, em liberar o fármaco, assim como em promover a sua penetração através do EC.

Recentemente, Nallagundla, Patnala e Kanfer (2018) avaliaram a bioequivalência de dois cremes contendo de aciclovir 5% (teste e referência) pelo método de *tape stripping*. Dados de ASC obtidos a partir de gráficos de quantidade de aciclovir na fita adesiva *versus* quantidade acumulada no EC removido foram comparados e demonstraram a bioequivalência farmacêutica entre as formulações. O *tape stripping* foi então considerado pelos autores como um método alternativo aos estudos clínicos, para avaliação de bioequivalência de produtos dermatológicos tópicos com ação local.

Alguns fatores devem ser levados em consideração na utilização do *tape-stripping* como método para avaliação da biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos aplicados topicamente. Primeiramente, o local de aplicação das fitas deve estar livre de pelos, que podem ser removidos com tesouras ou cortadores especiais, e deve ser uniforme, sem cicatrizes e

músculos subjacentes. Em segundo lugar, a aderência da fita adesiva deve ser completa a fim de evitar dobras, e a pressão aplicada deve ser constante para se remover uniformemente o EC, podendo esta ser obtida com um material de massa conhecida como um peso, pinça, espátula ou rolo padronizados (Figura 7). Finalmente, a velocidade de retirada da fita deve ser constante, quanto mais lenta a remoção, maior a adesão do EC à fita. A quantidade de EC removida por fita pode variar com o tamanho dos corneócitos, número de camadas, espessura, idade e quantidade de lipídios. As fitas mais utilizadas são as com adesivos de acrílico ou silicone, e devem ser inócuas e não causar reações alérgicas ou inflamação (NAIR *et al.*, 2013; RUELA *et al.*, 2016). Neste caso, é óbvio que a utilização de diferentes tipos de fitas e diferentes pessoas podem conduzir a remoção do EC de maneira diferenciada, o que pode dificultar as comparações inter e intra-laboratórios (HERKENNE *et al.*, 2008).

Figura 7 Procedimento do método DPK: (a) Aplicação da fita adesiva na área de aplicação do fármaco, (b) remoção da fita com um único e rápido movimento e (c) fita adesiva contendo o EC removido.



Fonte: WIEDERSBERG; NICOLI (2012)

O nível de hidratação da pele tem grande influência na penetração do fármaco. Os corneócitos e os lipídios intercelulares impedem a perda transepidermica de água, conhecida como TEWL (do inglês, *transepidermal water loss*), a qual pode ser medida e utilizada para avaliar a integridade e funcionalidade da barreira cutânea. O TEWL aumenta em razão do número de fitas e depende de alguns fatores como local anatômico, pressão, duração da pressão e remoção da fita. Este fato pode explicar as diferenças na espessura do EC, na descamação espontânea e resistência à pressão (NALLAGUNDLA; PATNALA; KANFER, 2018).

O método possui várias vantagens: possui simplicidade, é considerado minimamente invasivo, a penetração do fármaco no EC pode ser avaliada após períodos mais curtos do que quando comparados com técnicas *in vitro* e o tecido é viável ao longo do ensaio (CORDERY *et al.*, 2017). Os materiais e equipamentos que são utilizados são econômicos e as concentrações de fármacos obtidas nas amostras de fita são passíveis de quantificação e estão dentro da faixa de sensibilidade dos métodos analíticos atuais (RANEY *et al.*, 2015). Além disso, os medicamentos genérico e de referência podem ser testados no mesmo indivíduo, reduzindo a variabilidade intra-sujeito, visto que servem como um controle para si mesmo (NARKAR, 2010).

Como desvantagem, este método é aplicável somente em peles saudáveis e não é padronizado para o uso na pele doente. Segundo Raney *et al.* (2015), é possível que ocorra interações dos componentes ativos e excipientes da formulação com a anatomia estrutural da barreira cutânea desordenada, presente em pele doente, que não ocorreria na estrutura normal do EC. Por outro lado, ensaios de penetração cutânea usando pele saudável podem ser mais discriminatórios para detectar diferenças no desempenho de medicamentos genéricos e de referência do que usando pele danificada. Além disso, as inúmeras variáveis já citadas neste trabalho levam a variações inter e intra-laboratoriais, além de ser um método validado apenas para fármacos que agem superficialmente ou que possuem como local de ação o EC. Ainda, mesmo com fármacos com local de ação no EC, este método não é capaz de diferenciar a quantidade de fármaco disponível terapeuticamente e a quantidade que pode estar cristalizada na pele (INCECAYIR *et al.*, 2011; LU *et al.*, 2016; YACOBI *et al.*, 2014)

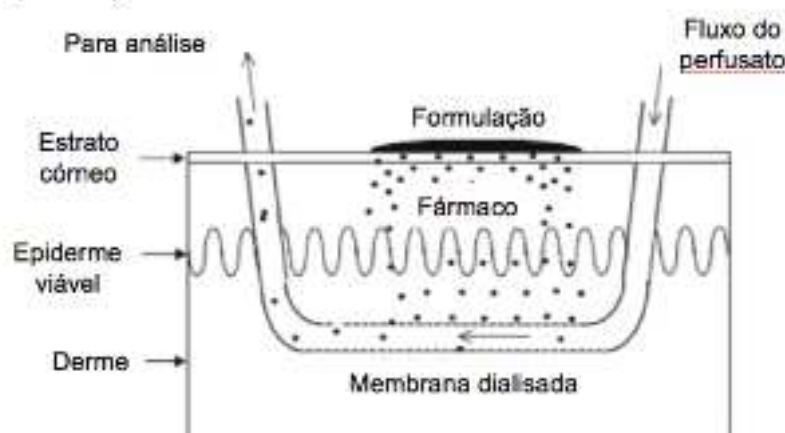
#### 4.1.3. MICRODIÁLISE

A técnica de microdiálise para avaliação da permeação cutânea, também conhecida como microdiálise dérmica (MDD), foi introduzida na última década para estudar níveis dérmicos de fármacos, após a aplicação tópica de medicamentos dermatológicos semissólidos, por Ault *et al.* (1994); Groth (1996); Cross *et al.* (1998) e Benfeldt, (1999) (BENFELDT, *et al.*, 2007). O



objetivo da MDD é mimetizar a função passiva de um vaso sanguíneo, inserindo uma sonda de diálise tubular semipermeável na pele (Figura 8). O princípio da microdiálise reside no fato que a solução bombeada através da sonda se encontra em equilíbrio com as moléculas difusíveis no fluido extracelular do tecido ao redor. Assim, sua principal característica é medir em tempo real os níveis de fármaco no tecido alvo e a extensão da penetração do fármaco, obtendo perfis farmacocinéticos completos para cada local de amostragem (INCECAYIR *et al.*, 2011; LU *et al.*, 2016). A determinação dos níveis do fármaco em um dado local é importante, por exemplo, na terapia anticâncer, visto que os tumores podem exibir uma fisiologia alterada ou limitado acesso aos fármacos, quando comparado ao tecido normal. Portanto, o conhecimento das concentrações de fármaco no tumor pode ser utilizado para uma seleção adequada da terapia medicamentosa (SCHMITD *et al.*, 2008)

Figura 8 – Implantação do sonda de MDD linear na derme.



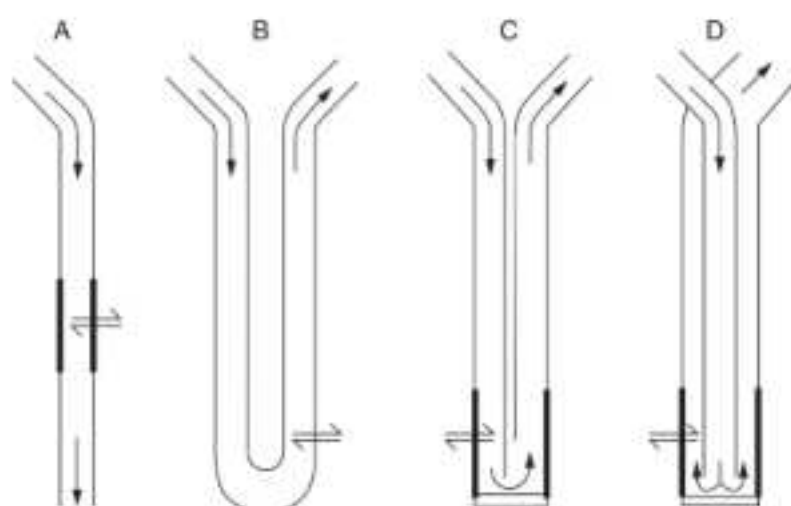
Fonte: Adaptado de HERKENNE *et al.*, 2007

As sondas disponíveis apresentam tamanhos de poros de membrana diferentes, determinando o tamanho molecular máximo dos analitos que serão analisados, e podem ser de modelos variados como linear, em loop, lado a lado e concêntrica (Figura 9). Na MDD, a sonda linear é a mais utilizada. À medida que a sonda é continuamente perfundida com fluido fresco, uma taxa de troca no estado estacionário é rapidamente atingida. A recuperação absoluta é a quantidade real de analito coletado pela sonda em um dado



período de tempo. A razão entre o analito dialisado e o fluido extracelular é conhecido como Recuperação Relativa (RR), podendo ser influenciado pelas propriedades físico-químicas do fármaco como peso molecular, lipofilicidade, capacidade de ligação às proteínas plasmáticas, temperatura do tecido, material, área de superfície, profundidade e design da sonda, e vazão de perfusão (YACOBI *et al.*, 2014). O dialisado é coletado em vários tempos e a concentração do fármaco é geralmente analisada por CLAE. Em alguns casos, em que a quantidade da amostra é de alguns microlitros, a técnica de CLAE acoplada à alta sensibilidade da espectrometria de massa, se faz necessária (RUELA, *et al.*, 2016).

Figura 9 Ilustração dos quatro tipos de sonda: (A) linear, (B) em loop, (C) lado a lado e (D) concêntrica.



Fonte: HOLMGAARD; NIELSEN; BENFELDT (2010)

A MDD possui muitas limitações. Segundo Schmidt *et al.* (2008), se a concentração do analito diminui com o aumento da taxa de fluxo, ensaios com pequenos volumes de amostra restringem as análises a métodos altamente sensíveis. Por outro lado, se o fluxo do fluido for muito baixo, a resolução temporal pode ser afetada. Por esses motivos, a taxa de fluxo e procedimentos analíticos devem ser finamente ajustados. Além disso, moléculas com alto peso molecular (acima de 20 kDa), muito lipofílicas e/ou com alta ligação às proteínas plasmáticas, não são difundidas pela sonda: somente amostras livres

de proteínas são facilmente analisadas sem tratamento analítico adicional. Uma opção para medir a concentração de moléculas lipofílicas é o uso de emulsão lipídica como fluido em vez do tampão aquoso (NAIR *et al.*, 2013; YACOBI *et al.*, 2014).

O método é vantajoso por ser útil em peles doentes. Mesmo sendo menos prático, é de extrema importância para estudos de monitoramento terapêutico de medicamentos utilizados em distúrbios epidérmicos, como psoríase e dermatite (INCECAYIR *et al.*, 2011).

Mesmo sendo mais invasivo, o método da MDD é capaz de fornecer um perfil farmacocinético de alta resolução temporal, enquanto os dados obtidos com o DPK não podem ser correlacionados com a quantidade de medicamento no local de ação. No entanto, ambas técnicas possibilitam utilizar simultaneamente o mesmo voluntário, reduzindo a variabilidade interindividual, fator de grande impacto no coeficiente de variação final, permitindo avaliar, por exemplo, o efeito de diferentes excipientes e regimes terapêuticos sobre a quantidade de fármaco que penetra na pele. (LU *et al.*, 2016; YACOBI *et al.*, 2014).

Entre as desvantagens da MDD, a grande variabilidade (em média 50%) é a mais importante. Benfeldt *et al.* (2007) compararam a absorção de duas formulações tópicas de lidocaína 5% (Xylocaine creme e Xylocaine pomada, AstraZeneca), utilizando os métodos DPK e MDD em 8 voluntários saudáveis. Em um braço, dois locais foram amostrados utilizando quatro sondas de MDD por cinco horas; em outro braço foi aplicada uma fita adesiva em dois locais diferente, 30 e 120 minutos após a aplicação do medicamento. Ambos métodos demonstraram a maior penetração do fármaco após a aplicação do creme. Entretanto, a variabilidade do método da MDD, expressa nos valores de coeficiente de variação da ASC do perfil de absorção na pele, foi de 41 a 42%, enquanto que a quantidade encontrada no EC empregando o método DPK variou entre 12 e 25%. Os autores concluíram que a barreira cutânea do estrato córneo exerce grande impacto na variabilidade da penetração de fármacos na pele. Relatórios demonstram que pesquisadores experientes com a metodologia podem inserir as sondas de MD em uma profundidade reproduzível e consistente na derme, verificados por medidas de ultrassom. E

mesmo que a inserção da sonda gere trauma nas células e tecidos, modificações na perfusão sanguínea e pequenas reações inflamatórias, geralmente são bem tolerados pelos indivíduos por várias horas (HERKENNE *et al.*, 2007; RANEY *et al.*, 2015)

#### 4.1.4. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

O infravermelho-próximo é o nome dado à região do espectro eletromagnético imediatamente superior à região visível em termos de comprimento de onda, abrangendo a faixa de 780 - 2500 nm. O princípio de análise da NIR (NIR, do inglês *near infrared spectrometry*) consiste na aplicação do IV-próximo com diferentes comprimentos de ondas que, baseado nas diferentes características de absorção e dispersão da luz, permite avaliar de forma quantitativa e qualitativa, os componentes moleculares de um tecido biológico (LIMA & BAKKER, 2011). A espectrometria de infravermelho próximo é uma abordagem *in vivo*, em que a radiação na faixa do NIR penetra na pele em vários centímetros. Neste caso, a análise do espectro de infravermelho combinada à estatística multivariada linear possibilita a quantificação da difusão do fármaco através da pele. Este método se destaca por ser um método não destrutivo, não invasivo, rápido, e simples, que não requer a preparação da amostra (LU *et al.*, 2016).

Uma importante contribuição para aplicação do NIR na verificação da bioequivalência de medicamentos genéricos é dada nos estudos de Medendorp *et al.* (2006, 2007). Nesses estudos, a NIR foi empregada para monitorar a concentração de vários fármacos na pele humana e de suínos. Primeiramente, os autores verificaram se as substâncias selecionadas apresentavam grupos funcionais passíveis de serem quantificados por NIR. Após, o perfil de permeação cutânea de composto como nitrato de econazol, estradiol e 4-cianofenol, em diferentes formas farmacêuticas e concentrações, foi determinado, evidenciando a possibilidade de utilização desta técnica em estudos de bioequivalência.

A técnica de espectroscopia Raman confocal (CRS, do inglês Confocal Raman Spectrometry) tem sido muito utilizada na determinação da

composição, espessura e teor de água do estrato córneo e na avaliação de intensificadores de penetração cutânea. Assim como o NIR, é uma abordagem não invasiva e rápida, que fornece resultados *in vivo* em tempo real para medição da penetração de moléculas na pele. Ambos os métodos exigem que a molécula de interesse esteja em concentração suficiente e que possua características espectrais suficientes para sua diferenciação na pele. A grande desvantagem é o fato de ser uma medida semiquantitativa, fornecendo somente uma concentração relativa e não absoluta do fármaco (HERKENNE *et al.*, 2007; RUELA *et al.*, 2016; YACOBI *et al.*, 2014).

Mateus *et al.* (2013) utilizaram o CRS *in vivo* para avaliar a concentração de ibuprofeno na pele, após aplicação de uma única formulação, cujos resultados obtidos com a técnica DPK já tinham sido relatados. Soluções de ibuprofeno em propilenoglicol ou propilenoglicol e água foram aplicadas no antebraço de voluntários humanos. Os autores evidenciaram que o perfil de distribuição do ibuprofeno no estrato córneo era comparável com aqueles obtidos nos estudos DPK e concluíram que o CRS é uma abordagem válida para medir a concentração de fármacos em estudos de permeação cutânea. Em outro estudo, os mesmos autores comparam a técnica de permeação *in vitro*, usando células de Franz, com a técnica de CRS *in vivo*, após aplicação de diferentes formulações de géis contendo ácido salicílico no antebraço de voluntários saudáveis. Neste estudo, os autores relataram a existência de uma boa correlação quando as quantidades acumuladas de ácido salicílico permeado foram plotadas contra a intensidade do sinal obtido por CRS na pele dos voluntários. Estes achados forneceram novas evidências da aplicabilidade do CRS em estudos de biodisponibilidade de fármacos na pele (MATHEUS *et al.*, 2014).

De modo similar, Mohammed *et al.* (2014) compararam a permeação *in vitro* da niacinamida a partir de diferentes veículos, incluindo dimetilsossorbida, propilenoglicol, monolaurato de propilenoglicol, N-metil-pirrolidina, Myglyol 812N e óleo mineral, puros ou em diferentes misturas binárias e ternárias, com resultados *in vivo* obtidos pela técnica de CRS, após aplicação em voluntários saudáveis. Os autores demonstraram que sinal de Raman da niacinamida foi diretamente proporcional a quantidade do composto permeada nos estudos *in*

*vitro*, suportando o uso desta técnica no monitoramento da permeação cutânea de fármacos.

#### 4.2. MÉTODOS PRECONIZADOS OU ACEITOS PELAS AGÊNCIAS REGULATÓRIAS PARA AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE MEDICAMENTOS DE USO TÓPICO

Para a maioria dos produtos genéricos de uso tópico, a demonstração da bioequivalência requer a avaliação da equivalência farmacêutica e terapêutica. A avaliação da equivalência terapêutica tem sido exigida pelas agências regulatórias pela realização de um dos seguintes ensaios; (a) farmacodinâmicos (p. ex., ensaio de vasoconstrição), aplicáveis unicamente para corticosteroides e (b) ensaios clínicos para avaliação dos resultados terapêuticos (MIRANDA et al., 2018). Os ensaios representam a abordagem mais regulamentada pelas agências regulatórias para demonstração da bioequivalência de produtos tópicos. Entretanto, estes ensaios possuem muitas desvantagens e limitações: são longos, custosos, necessitam de centenas de pacientes, são difíceis de conduzir, e especialmente no caso de medicamentos de aplicação tópica, por não alcançarem totalmente ou parcialmente a corrente sanguínea, possuem uma alta variabilidade interindividual e baixa sensibilidade, dificultando a reprodutibilidade do método. Devido a estas dificuldades do método, faz-se necessário o uso de abordagens adicionais para garantir a segurança, qualidade e bioequivalência do produto (CHANG *et al.*, 2012; LU *et al.*, 2016).

Em situações particulares, uma isenção dos ensaios clínicos pode ser obtida. Isto tem sido aplicável a medicamentos genéricos na forma de soluções que apresentam a mesma composição quali- e quantitativa, e os mesmos atributos funcionais (pH, tamanho de partículas, viscosidade) que o medicamento de referência. Mesmo sendo previsto para soluções tópicas, a bioisenção para formas farmacêuticas semissólidas é possível, conforme documento emitido pela EMA (*European Medicines Agency*), desde que métodos para avaliação da qualidade, eficácia e segurança sejam desenvolvidos e validados (MIRANDA et al., 2018). O desenvolvimento de

métodos substitutivos para os ensaios de bioequivalência de medicamentos tópicos também tem sido uma grande preocupação para o FDA. Recentemente, este tema foi discutido no “*Workshop on Bioequivalence Testing of Topical Drug Products*” de 2017, oportunidade onde foi levantada a importância de métodos *in vitro*, como os ensaios de permeação cutânea, como meio para avaliação do desempenho e da bioequivalência de medicamentos tópicos. Além disso, nos últimos anos, vários guias para o desenvolvimento de medicamentos genéricos têm apresentados protocolos baseados unicamente em ensaios de liberação e permeação cutânea *in vitro* (FDA, 2017).

A EMA publicou recentemente um novo Guia com recomendações para a avaliação da qualidade e equivalência de produtos tópicos, alterando a antiga diretriz a qual afirmava ser obrigatório a realização de estudos clínicos. Este guia aborda diretrizes para a avaliação da qualidade e para a realização de ensaios *in vitro* de liberação, e permeação cutânea, *tape-stripping* e de vasoconstrição de produtos tópicos. A demonstração de equivalência de um novo medicamento tópico em relação a um medicamento já existente pode ser exigida para os pedidos de autorização para comercialização e nos casos de alteração durante o desenvolvimento ou na pós-aprovação, que podem ter impactos significativos na qualidade, eficácia e segurança do produto em questão. Por outro lado, estudos citados neste Guia não podem ser aplicados nas seguintes situações: (i) o fármaco apresenta baixo índice terapêutico ou (ii) produz toxicidade sistêmica, (iii) quando o método de aplicação não é o mesmo, (iv) quando não é possível determinar a cinética de permeação ou o evento farmacodinâmico pela baixa sensibilidade dos métodos usados e (v) em produtos usados para o tratamento de ulcerações ou feridas abertas (EMA 2018).

Atualmente o Reino Unido ainda faz parte da União Europeia (UE) e, portanto, segue as normas impostas pelo EMA para avaliação da bioequivalência. A agência regulatória do Reino Unido Medicines & Healthcare Products Regulatory Agency (MHRA) publicou no site do governo britânico um guia fornecendo informações sobre medicamentos de referência e estudos de bioequivalência no caso de o Reino Unido sair da UE sem acordo. Neste guia,

o MHRA permite a comparação de um novo medicamento com um de referência de origem não britânica e afirma que a aceitação das abordagens para avaliação de bioequivalência deve ser analisada de acordo com cada produto em específico (REINO UNIDO, 2019).

No Canadá, a agência regulatória Health Canada considera os medicamentos tópicos semissólidos como categoria II – produtos complexos, e, portanto, a avaliação de parâmetros físico-químicos é insuficiente e devem ser realizados ensaios clínicos para comprovação de segurança, eficácia e bioequivalência. Além disso, medicamentos genéricos tópicos devem apresentar testes de dissolução e liberação *in vitro* e propriedades reológicas. Atualmente, o único modelo substituto aceito pela agência regulatória é o ensaio farmacodinâmico de vasoconstrição para avaliação de medicamentos corticoides (HEALTH CANADA, 1990).

Em um estudo Kollross *et al.* (2018) compararam o mercado brasileiro e americano de medicamentos antifúngicos tópicos através da análise dos produtos registrados. Sua pesquisa apontou uma diferença de 664 medicamentos registrados no Brasil contra 106 nos Estados Unidos, podendo ser explicada pelas divergências entre os requisitos regulatórios da Anvisa e FDA. Os autores concluíram que embora os EUA possuam requisitos mais rigorosos, há uma maior variedade de categorias de medicamentos, tecnologias mais recentes e formas farmacêuticas modernas. Enquanto que no Brasil, a grande quantidade de genéricos registrados não garantem a inovação dos produtos e a facilidade de registro de genéricos não é acompanhada de inovação.

No Brasil, os medicamentos de aplicação tópica são bioisentos de comprovar sua eficácia e segurança por estudos bioequivalência frente um medicamento referência, conforme disposto na RDC 37/2011 (BRASIL, 2011). Esta resolução da Anvisa preconiza que apenas ensaios físico-químicos e microbiológicos, ou seja, ensaios de equivalência farmacêutica, são necessários para o registro dos medicamentos genéricos tópicos. Estes testes estão descritos na Farmacopeia Brasileira e incluem pH, viscosidade, densidade, aspecto, teor, identificação, entre outros (BRASIL, 2019). No entanto, recentemente, a ANVISA publicou uma guia “Guia Sobre Requisitos

de Qualidade para o Registro de Produtos Tópicos e Transdérmicos (BRASIL, 2019). O guia apresenta os requisitos mínimos de tecnologia farmacêutica necessários ao registro de medicamentos tópicos e transdérmicos, expondo o posicionamento da Agência sobre os ensaios que podem ser aplicados no desenvolvimento, controle de qualidade, estudo de estabilidade e equivalência farmacêutica desses produtos. É importante relatar, que além dos atributos de qualidade mensuráveis por ensaios e específicos, o Guia aborda pela primeira vez a necessidade da avaliação do desempenho do produto, ou qual pode ser avaliado por meio de estudos de liberação ou de permeação *in vitro*, a depender do tipo de produto, via de administração e local de ação. Cabe ressaltar que no momento da realização deste trabalho. As recomendações contidas neste Guia estavam sujeitas ao recebimento de sugestões da sociedade por meio de formulário eletrônico e, portanto, pode ser considerada um marco inicial do processo de regulamentação de estudos de biodisponibilidade, bioequivalência e equivalência terapêutica de medicamentos tópicos no Brasil.



## 5. CONCLUSÃO

A realização deste trabalho permitiu identificar os métodos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* disponíveis para avaliar a biodisponibilidade, bioequivalência e equivalência terapêutica de medicamentos dermatológicos de uso tópicos, possibilitando a discussão de suas vantagens e limitações, bem como sua aplicabilidade na avaliação de diferentes formulações comerciais.

As abordagens alternativas citadas neste trabalho são de fácil implementação por serem de simples execução, acessíveis, e capazes de suportar a intercambialidade entre um medicamento genérico e um medicamento referência. Os testes de liberação e permeação *in vitro* possuem grande embasamento teórico, facilidade de implementação e boa reprodutibilidade em laboratórios de todos os portes, apresentando-se como melhor candidato para avaliação de bioequivalência. Estudos *in vivo* como a MD e o DPK despertam grande interesse e devem ser discutidos e protocolados para aperfeiçoar sua viabilidade frente à equivalência terapêutica. Já os modernos métodos espectroscópicos necessitam de mais estudos e pesquisas, mas são estratégias promissoras para avaliar a bioequivalência de medicamentos genéricos tópicos.

A pesquisa e leitura das exigências das agências regulatórias internacionais quanto a necessidade de avaliar a biodisponibilidade de medicamentos tópicos que foi realizada neste trabalho possibilitou um debate acerca das diferentes normativas. É essencial que as agências regulatórias compartilhem informações e experiências, visando o alinhamento de abordagens entre agências internacionais e a melhoria na qualidade e eficácia de formulações genéricas tópicas.

A facilidade no registro de medicamentos genéricos tópicos, gera uma grande variedade de produtos disponíveis no mercado brasileiro, mas em contra partida, a flexibilização dos métodos de avaliação de bioequivalência abre margem para entrada de medicamentos que são equivalentes farmacêuticos, mas não necessariamente bioequivalentes.

É de extrema importância e urgência que as entidades regulatórias brasileiras discutam juntamente com a comunidade científica e as indústrias

farmacêuticas a padronização de uma metodologia capaz de avaliar a bioequivalência de medicamentos tópicos, tendo em vista a viabilidade do método e sua adequação à realidade industrial brasileira, vislumbrando a segurança e eficácia do medicamento e o aprimoramento na oferta de produtos genéricos de qualidade no mercado.

## REFERÊNCIAS

- ALKILANI, A.; MCCRUDDEN, M. T.; DONNELLY, R. Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the Stratum Corneum. **Pharmaceutics**, [s.l.], v. 7, n. 4, p.438-470, 22 out. 2015.
- ASSUNÇÃO, I. L. M. de. **Desenvolvimento e avaliação in vitro de uma formulação semissólida com atividade antimicrobiana a partir do extrato seco de *Schinopsis brasilienses* engler**. 2017. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2017. Disponível em: <<http://tede.bc.uepb.edu.br/jspui/handle/tede/3063>>. Acesso em: 25 abr. 2019.
- BARBOSA, Fernanda de Souza. **Modelo de Impedância de Ordem Fracional para a Resposta Inflamatória Cutânea**. 2011. 107 f. Tese (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.
- BAO, Quanying; BURGESS, Diane J. Perspectives on Physicochemical and *In vitro* Profiling of Ophthalmic Ointments. **Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 35, n. 12, p.1-12, Oct. 2018.
- BENFELDT, Eva et al. Bioequivalence of Topical Formulations in Humans: Evaluation by Dermal Microdialysis Sampling and the Dermatopharmacokinetic Method. **Journal of Investigative Dermatology**, [s.l.], v. 127, n. 1, p.170-178, Jan. 2007.
- BENSON, Heather A.E. Skin Structure, Function, and Permeation. In: BENSON, Heather A.E.; WATKINSON, Adam C. (Ed.). *Transdermal and Topical Drug Delivery: Principles and Practice*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2012. Cap. 1. p. 3-22.
- BRASIL. PRESIDENCIA DA REPÚBLICA. Lei n. 9.787, de 10 de fev. de 1999: Altera a Lei no 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências. BRASIL, 1999. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Leis/L9787.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L9787.htm)>. Acesso em: 30 maio 2019.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. **Dispõe sobre o Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência e dá outras providências**. Brasil: Diário Oficial da União, 2011. 13 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. **Conceitos e definições de medicamentos**. 2019. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/medicamentos/conceitos-e-definicoes>>. Acesso em: 17 nov. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. **Farmacopéia Brasileira**. 6. ed. Brasil, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 37, de 03 de agosto de 2011. **Dispõe sobre o Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência e dá outras providências**. ANVISA, 2019. 13p.

CHANG, Rong-kun et al. Generic Development of Topical Dermatologic Products: Formulation Development, Process Development, and Testing of Topical Dermatologic Products. *The AAPS Journal*, [s.l.], v. 15, n. 1, p.41-52, 9 out. 2012.

CORDERY, S.f. et al. Topical Bioavailability of Diclofenac From Locally-Acting, Dermatological Formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 529, n. 1-2, p.55-64, ago. 2017.

DRUGS.COM. Dermatological agents: What are Dermatological agents? Disponível em: <<https://www.drugs.com/drug-class/dermatological-agents.html>>. Acesso em: 10 abr. 2019.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **CHMP/QWP/708282/2018**: Draft Guideline on quality and equivalence of topical products. European Union: European Medicines Agency, 2018. 36 p.

HAQUE, T.; TALUKDER, M. M. U. Chemical Enhancer: A Simplistic Way to Modulate Barrier Function of the Stratum Corneum. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, [s.l.], v. 8, n. 2, p.169-179, Jun. 2018.

HARRIS, M. I. **Pele: Do nascimento à maturidade**. São Paulo: Senac São Paulo, 2016. Disponível em: <[https://books.google.com.br/books/about/Pele.html?id=jzIWDwAAQBAJ&prints=ec=frontcover&source=kp\\_read\\_button&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.br/books/about/Pele.html?id=jzIWDwAAQBAJ&prints=ec=frontcover&source=kp_read_button&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)>. Acesso em: 26 abr. 2019.

HARRISON, Lester I. et al. A pharmaceutical comparison of different commercially available imiquimod 5% cream products. **Journal of Dermatological Treatment**, [s.l.], v. 20, n. 3, p.160-164, Jan. 2009.

HEALTH CANADA (Canada). Government of Canada. **Submissions for Generic Topical Drugs**. 1990. Disponível em: <<https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-health-products/drug-products/applications-submissions/policies/submissions-general-topical-drugs.html>>. Acesso em: 28 out. 2019.

HERKENNE, Christophe et al. In Vivo Methods for the Assessment of Topical Drug Bioavailability. **Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 25, n. 1, p.87-103, 6 Nov. 2007.

HOLMGAARD, R.; NIELSEN, J.B.; BENFELDT, E.. Microdialysis Sampling for Investigations of Bioavailability and Bioequivalence of Topically Administered Drugs: Current State and Future Perspectives. **Skin Pharmacology and Physiology**, [s.l.], v. 23, n. 5, p.225-243, 2010.

INCECAYIR, Tuba et al. Assessment of Topical Bioequivalence Using Dermal Microdialysis and Tape Stripping Methods. **Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 28, n. 9, p.2165-2175, Apr. 2011.

JAIN, P. Bioequivalence of Topical Dosage Forms. *Journal of Pharmacovigilance*, v. 2, n. 2, 1000e118, 2014. Disponível em: <https://www.longdom.org/open-access/bioequivalence-of-topical-dosage-forms-2329-6887-2-e118.pdf>. Acessado em 23 de junho de 2019.

KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Modeling transdermal drug release. **Advanced Drug Delivery Reviews**. [s.i.], p. 159-172. Jun. 2001.

KLEIN, Ryan R; HECKART, Jenna L; THAKKER, Kailas D. *In vitro* Release Testing Methodology and Variability with the Vertical Diffusion Cell (VDC). **Dissolution Technologies**, [s.l.], v. 25, n. 3, p.52-61, Aug. 2018.

KOLLROSS, Bianca et al. Regulatory Requirements and Innovation: A Comparison of the Dermatologic Antifungal Drug Product Markets in Brazil and United States. **Therapeutic Innovation & Regulatory Science**, [s.l.], v. 53, n. 5, p.661-668, 5 out. 2018.

LEHMAN, Paul A.; FRANZ, Thomas J.. Assessing Topical Bioavailability and Bioequivalence: A Comparison of the *In vitro* Permeation Test and the Vasoconstrictor Assay. **Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 31, n. 12, p.3529-3537, Jul. 2014.

LIMA, Alexandre; BAKKER, Jan. Espectroscopia no infravermelho próximo para a monitorização da perfusão tecidual. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, [s.l.], v. 23, n. 3, p.341-351, set. 2011.

LIONBERGER, R. A. FDA Critical Path Initiatives: Opportunities for Generic Drug Development. **The AAPS Journal**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.103-109, 20 fev. 2008.

LOURENÇO, A. R. N. **Administração Tópica de Fármacos - das Restrições aos Desafios**. 2013. 51f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. 2013. Disponível em:

<http://recil.ulusofona.pt/bitstream/handle/10437/4575/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20de%20ANA%20RITA%20NUNES%20LOUREN%C3%87O%202013.pdf?sequence=1>. Acessado em: 23 de junho de 2019.

LU, Mei et al. Advance in bioequivalence assessment of topical dermatological products. **Asian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 11, n. 6, p.700-707. Dec. 2016.

MATEUS, R. et al. A New Paradigm in Dermatopharmacokinetics – Confocal Raman Spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 444, n. 1-2, p.106-108, fev. 2013.

MATEUS, Rita et al. Percutaneous Absorption of Salicylic Acid – *In vitro* and In Vivo Studies. **International Journal of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 475, n. 1-2, p.471-474, Nov. 2014.

MEHTA, R.. **Topical and Transdermal Drug Delivery: What a Pharmacist Needs to Know**. Disponível em: <<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.562.7692&rep=rep1&type=pdf>>. Acesso em: May, 2019.

MEDENDORP, Joseph et al. Near-Infrared Spectrometry for the Quantification of Dermal Absorption of Econazole Nitrate and 4-Cyanophenol. **Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 23, n. 4, p.835-843, 29 mar. 2006.

MEDENDORP, Joseph P. et al. Near Infrared Spectrometry for the Quantification of Human Dermal Absorption of Econazole Nitrate and Estradiol. **Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 24, n. 1, p.186-193, 14 nov. 2007.

MIRANDA, Margarida et al. Bioequivalence of Topical Generic Products. Part 2. Paving the Qay to a Tailored Regulatory System. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 122, p.264-272, Sep. 2018.

MOJUMDAR, E. H.; BOUWSTRA, J. A. Stratum Corneum Lipid Composition and Organization. In: A BENSON, H. E. et al (Ed.). **Cosmetic Formulation: Principles and Practice**. Boca Raton: Crc Press, 2019. p. 47-60.

MORAIS, G. G. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidas de xantina para tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite)**. 2006. 181 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60137/tde-17012007-150546/pt-br.php>>. Acesso em: 25 abr. 2019.

NAIR, Anroop et al. Basic considerations in the dermatokinetics of topical formulations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. [s.l.], p. 423-434. jul. 2013.

NALLAGUNDLA, Sumalatha; PATNALA, Srinivas; KANFER, Isadore. Application of an Optimized Tape Stripping Method for the Bioequivalence Assessment of Topical Acyclovir Creams. *AAPS Pharmscitech*, [s.l.], v. 19, n. 4, p.1567-1573, Feb. 2018.

NARKAR, Yogeeta. Bioequivalence for Topical Products—An Update. *Pharmaceutical Research*, [s.l.], v. 27, n. 12, p.2590-2601, Sep. 2010.

NG, Shio-fern et al. A Comparative Study of Transmembrane Diffusion and Permeation of Ibuprofen across Synthetic Membranes Using Franz Diffusion Cells. *Pharmaceutics*, [s.l.], v. 2, n. 2, p.209-223, May, 2010.

OAKLEY, A. Topical formulations. 2016. Disponível em: <<https://www.dermnetnz.org/topics/topical-formulations/>>. Acesso em: 11 abr. 2019.

PAHALA SINAMORA. U. S. Food & Drug Administration. In vitro **Bioequivalence Data for a Topical Product: Chemistry Review Perspective**. Maryland: Fda Public Workshop, 2017. 36 slides, color. Disponível em: <<https://www.fda.gov/media/110379/download>>. Acesso em: 30 mai 2019.

PETRO, E. et al. *In vitro* and in vivo evaluation of drug release from semisolid dosage forms. *Pharmazie*, [s.l.], n. 12, p.936-941, Dec. 2011.

RANEY, Sam G. et al. Pharmacokinetics-Based Approaches for Bioequivalence Evaluation of Topical Dermatological Drug Products. *Clinical Pharmacokinetics*, [s.l.], v. 54, n. 11, p.1095-1106, 11 jun. 2015.

REINO UNIDO. Medicines & Healthcare Products Regulatory Agency. Uk Government. **Comparator Products in Bioequivalence/Therapeutic Equivalence studies after Brexit**. 2019. Disponível em: <<https://www.gov.uk/guidance/comparator-products-in-bioequivalencetherapeutic-equivalence-studies-after-brexit>>. Acesso em: 28 out. 19.

ROUSSEL, L. et al. Measurement, Analysis and Prediction of Topical UV Filter Bioavailability. *International Journal of Pharmaceutics*, [s.l.], v. 478, n. 2, p.804-810, Jan. 2015.

RUELA, André Luís Morais et al. Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, [s.l.], v. 52, n. 3, p.527-544, set. 2016.

SALAMANCA, Constain et al. Franz Diffusion Cell Approach for Pre-Formulation Characterisation of Ketoprofen Semi-Solid Dosage Forms. **Pharmaceutics**, [s.l.], v. 10, n. 3, p.148-158, Sep. 2018.

SAVI , Vedrana et al. Tacrolimus Loaded Biocompatible Lecithin-Based Microemulsions With Improved Skin Penetration: Structure Characterization and *In vitro*/*In Vivo* Performances. **International Journal of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 529, n. 1-2, p.491-505, Aug. 2017.

SCHMIDT, Stephan et al. Clinical Microdialysis in Skin and Soft Tissues: An Update. **The Journal of Clinical Pharmacology**, [s.l.], v. 48, n. 3, p.351-364, Mar. 2008.

SIMÕES, Ana et al. A Tutorial for Developing a Topical Cream Formulation Based on the Quality by Design Approach. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 107, n. 10, p.2653-2662, out. 2018.

SIMONSEN, L.; FULLERTON, A.. Development of an *In vitro* Skin Permeation Model Simulating Atopic Dermatitis Skin for the Evaluation of Dermatological Products. **Skin Pharmacology and Physiology**, [s.l.], v. 20, n. 5, p.230-236, Jun. 2007.

SONI, M.; KUMAR, S.; GUPTA, G. D. Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the stratum corneum: A Novel Approach to Skin Permeation. **Journal of Pharmacy Research**. Ropar, p. 1184-1190. ago. 2009.

SUTHAKARAN, C. Bioavailability of Topical Dosage Forms. **Modern Applications of Bioequivalence & Bioavailability**, [s.l.], v. 1, n. 5, p.001-002, 4 ago. 2017.

TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. **Princípios de Anatomia e Fisiologia**. 14. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

UEDA, C. T. et al. Topical and Transdermal Drug Products. **Dissolution Technologies**, [s.l.], v. 17, n. 4, p.12-25, 2010.

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: Center For Drug Evaluation And Research (cder), 1997. 40 p.

FDA. **Product-Specific Guidances for Generic Drug Development**. 2017. Disponível em: <<https://www.fda.gov/drugs/guidances-drugs/product-specific-guidances-generic-drug-development>>. Acesso em: 28 out. 2019.

FDA. **DRAFT GUIDANCE ON ACYCLOVIR**. United States: Guidance For Industry And Submissions, 2016. 26 p.



VOLPATO, N. M.; FREITAS, Z. M. F. de; STORPIRTIS, Sílvia. Biofarmacotécnica e Bioequivalência de Formulações Dermatológicas Semissólidas. In: STORPIRTIS, Sílvia et al. **Biofarmacotécnica**. São Paulo: Editora Guanabara, 2009. Cap. 20. p. 212-223.

WALTERS, K. A.; BRAIN, K. R. **Topical and Transdermal Delivery**. In: GIBSON, Mark (Ed.). *Pharmaceutical Preformulation and Formulation: A Practical Guide from Candidate Drug Selection to Commercial Dosage Form*. 2. ed. Loughborough: Informa Healthcare Usa, 2009. Cap. 14. p. 475-525.

WIEDERSBERG, Sandra; NICOLI, Sara. Skin Permeation Assessment: Tape Stripping. In: BENSON, Heather A.e.; WATKINSON, Adam C. (Ed.). **Transdermal and Topical Drug Delivery: Principles and Practice**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., Publication, 212. p. 109-130.

WILLIAMS, A. C. **Liberação Tópica e Transdérmica de Fármacos**. In: AULTON, Michael E.; TAYLOR, Kevin M. G. (Ed.). *Delineamento de Formas Farmacêuticas*. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. Cap. 39. p. 876-900.

YACOBI, Avraham et al. Current Challenges in Bioequivalence, Quality, and Novel Assessment Technologies for Topical Products. **Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 31, n. 4, p.837-846, 7 jan. 2014.

ZSIKÓ; CSÁNYI; KOVÁCS. Methods to Evaluate Skin Penetration *In vitro*. **Scientia Pharmaceutica**, [s.l.], v. 87, n. 3, p.19-40, Aug. 2019.