

Renata Lourenço Engelhardt

**Avaliação do Cenário Regulatório de Testes de Permeação Transdérmica de  
Fármacos**

Rio de Janeiro

2015

Renata Lourenco Engelhardt

**Avaliação do Cenário Regulatório de Testes de Permeação Transdérmica de  
Fármacos**

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos - FIOCRUZ

Orientadores: Dr. Helvécio Vinícius Antunes Rocha

Dra. Flavia Almada do Carmo

Rio de Janeiro

2015

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Medicamentos e Fitomedicamentos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ – RJ

E57a Engelhardt, Renata Lourenço

Avaliação do cenário regulatório de testes de permeação transdérmica de fármacos. /Renata Lourenço Engelhardt. – Rio de Janeiro, 2015.

xiii, 137f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Dr. Helvécio Vinícius Antunes Rocha

Co-Orientadora: Dra. Flávia Almada do Carmo

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, 2015.

Bibliografia: f. 125-137

1. Sistemas de liberação transdérmica. 2 Ensaio *in vitro* de Permeação. 3. Exigências regulatórias. 4. Registro. 5. EMA 6. FDA. 7. ANVISA. I. Título.

CDD 615.1

Renata Lourenco Engelhardt

**Avaliação do Cenário Regulatório de Testes de Permeação Transdérmica de  
Fármacos**

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos - FIOCRUZ

Aprovada em 27 de abril de 2015.

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Helvécio Vinícius Antunes Rocha  
Farmanguinhos – FIOCRUZ (Orientador – Presidente da Banca)

---

Profa. Dra. Katty Gyselle de Holanda e Silva  
Faculdade de Farmácia – UFRJ

---

Prof. Dr. Jorge Carlos Santos da Costa  
Vice Presidência de Produção e Insumos para Saúde – FIOCRUZ

---

Profa. Dra. Mariana Conceição de Souza  
Farmanguinhos – Fiocruz

Rio de Janeiro

2015

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha irmã Elaine, ao meu marido Luiz Carlos e à minha mãe Regina, pelo amor, cumplicidade e incentivo constantes.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela vida, saúde e por guiar meus passos no sentido do desenvolvimento pessoal e profissional.

À minha filha Maria Luiza, que com toda sua alegria me inspirou e fortaleceu.

À minha família e aos amigos, pelo impulso e apoio.

À Dermatus Farmácia Dermatológica pela oportunidade, especialmente à Dra. Eliane Brenner.

Aos meus orientadores, Helvécio Vinícius A. Rocha e Flávia Almada do Carmo, pelos seus valiosos ensinamentos.

Aos professores e colegas que Deus colocou no meu caminho.

“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são.”

Aristóteles

## RESUMO

ENGELHARDT, Renata Lourenço. Avaliação do Cenário Regulatório de Testes de Permeação Transdérmica de Fármacos. 2015. 137f. Dissertação de Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

Os sistemas de liberação transdérmica (SLT) representam atualmente uma via alternativa para a administração de fármacos por difusão passiva através da pele. Os SLT são capazes de contornar inconvenientes, como interações com alimentos e metabolismo de primeira passagem, e de substituir esquemas de doses repetidas, aumentando a adesão do paciente ao tratamento. Entretanto, não há pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) uma regulamentação específica que oriente quanto a exigências para pesquisa, desenvolvimento e registro desses medicamentos, contemplando ensaios e parâmetros definidos na avaliação de segurança e eficácia desses dispositivos. Sendo assim, esta dissertação objetiva realizar um levantamento e comparar as exigências regulatórias utilizadas para obtenção de registro dos SLT nas três principais agências, *European Medicines Agency* (EMA), *Food and Drug Administration* (FDA) e ANVISA. Adicionalmente, objetiva realizar uma análise das técnicas que vêm sendo mais vastamente empregadas nos ensaios *in vitro* de permeação pela comunidade científica, podendo nortear a proposta de uma metodologia harmonizada, inexistente até o momento. A definição dos parâmetros empregados na realização de tais testes é fundamental para o aumento na confiabilidade do método e simulação de biodisponibilidade *in vitro*, como alternativa aos testes *in vivo*. A partir do resultado obtido com a pesquisa concernente aos aspectos regulatórios, foi possível identificar duas diretrizes do EMA, dois guias do FDA e testes específicos para os SLT descritos na USP, como fontes suficientes na construção de uma legislação específica voltada a esses dispositivos. Com relação aos testes *in vitro* de permeação, dois guias da Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD) e a análise da prática científica nesses ensaios, possibilitaram a realização de uma proposta para a definição dos parâmetros a serem empregados.

Palavras-chave: sistemas de liberação transdérmica, ensaios *in vitro* de permeação, exigências regulatórias, registro, EMA, FDA, ANVISA.

## ABSTRACT

The transdermal drug delivery systems (TDDS) current presents an alternative for drug administration by passive diffusion throughout the skin. The TDDS are capable to avoid inconvenients, as food interactions and first pass metabolism, and to replace repetitive dose scheme, increasing patients adhesion on treatment. However, there is no specific regulation by Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) to guide for requirements regarding research, development and registration for this drugs, including assay and defined parameters on evaluation of safety and efficacy of these devices. So, the main objective of this work is to identify and to compare the regulatory requirements for TDDS regulatory approval of three most important agencies, European Medicines Agency (EMA), Food and Drug Administration (FDA) and ANVISA. In addition, this work aims to study the most employed techniques on *in vitro* permeation tests by scientific community to guide the development of an harmonized methodology, which does not exist until now. The parameters definition to be applied on these tests are essential to increase method reliability of *in vitro* bioavailability simulation, as an alternative for *in vivo* tests. With results obtained after searching about regulatory aspects, it was possible to identify two EMA guidelines, two FDA guides and specific tests related to TDDS on USP, as sufficient sources for specific regulation construction focused on these devices. About *in vitro* permeation tests, two OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*) guides and the analysis of scientific practice on these tests, allowed a proposal definition for parameters to be employed.

Keywords: transdermal drug delivery systems, *in vitro* permeation tests, specific regulation, registration, EMA, FDA, ANVISA.

## LISTA DE FIGURAS:

Figura 1. Representação esquemática da pele.....	20
Figura 2. Diferenciação epidermal.....	22
Figura 3. Curva de permeação, quantidade de fármaco permeado X tempo.....	27
Figura 4. Sistema controlado de dispersão no adesivo.....	31
Figura 5. Sistema de permeação controlada através da membrana.....	31
Figura 6. Sistema controlado em matriz difusora.....	32
Figura 7. Sistema tipo microreservatório.....	33
Figura 8. Concentrações plasmáticas de rivastigmina adesivo transdérmico seguidas de 24h de aplicação.....	37
Figura 9. Concentrações plasmáticas de rivastigmina cápsulas, duas vezes ao dia.....	37
Figura 10. Representação Célula de Franz.....	49
Figura 11. USP Aparato 5.....	63
Figura 12. USP Aparato 6.....	64
Figura 13. USP Aparato 7.....	65
Figura 14. Aparato com Célula Extratora.....	88
Figura 15. Aparatos de Franz – representação esquemática.....	105
Figura 16. Gráfico de seleção de membranas pelos pesquisadores.....	106

## LISTA DE TABELAS:

Tabela 1. Exemplos de apresentações transdérmicas comercializadas no Brasil.....	34
Tabela 2. Fármacos utilizados em sistemas transdérmicos.....	38
Tabela 3. Metodologia de busca e resultados obtidos.....	45
Tabela 4. Critérios de aceitabilidade para controle de qualidade microbiológico de SLT.....	69
Tabela 5. Parâmetros aplicados no ensaio de permeação <i>in vitro</i> .....	98
Tabela 6. Medida de espessura da pele, tamanho e densidade de folículos pilosos, de pele humana e animal.....	110
Tabela 7. Proposta de parâmetros a serem empregados no ensaio de permeação <i>in vitro</i> .....	121
Tabela 8. Resumo das ferramentas regulatórias.....	122

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS:

ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC	- área sob a curva
BD	- biodisponibilidade
BE	- bioequivalência
BNDES	- Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social
CEUAS	- Comissões de Ética no Uso de Animais
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CONCEA	- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CTD	- <i>Common Technical Document</i>
EHL	- Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo
EMA	- <i>European Medicines Agency</i>
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
ICH	- <i>International Conference on Harmonisation</i>
IF	- Índice de Flutuação
IFA	- Insumo Farmacêutico Ativo
OECD	- <i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
QbD	- <i>Quality by Design</i>
RENAMA	- Rede Nacional de Métodos Alternativos
RENAME	- Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
SLT	- Sistemas de Liberação Transdérmica
SLTM	- Sistemas de Liberação Transmucosa
SUPAC-SS CMC7	- <i>FDA Guidance for Industry, Nonsterile Semisolid Dosage Forms</i>

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 Histórico.....	19
2.2 Permeação.....	20
2.2.1 Pele.....	20
2.2.2 Permeação através da pele.....	23
2.2.3 Agentes promotores de permeação.....	27
2.2.4 Metabolismo do fármaco durante o trânsito através da pele.....	28
2.2.5 Aparato utilizado na avaliação de permeação <i>in vitro</i> .....	29
2.3 Tecnologias empregadas em dispositivos transdérmicos.....	30
2.4 Apresentações comerciais no Brasil.....	33
2.5 Fármacos utilizados em sistemas de liberação transdérmica.....	37
2.6 Oportunidades futuras.....	39
3. JUSTIFICATIVA TÉCNICO CIENTÍFICA.....	41
4. OBJETIVO.....	44
5. METODOLOGIA.....	45
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
6.1 Aspectos Regulatórios.....	47
6.1.1 FDA.....	47
6.1.1.1 SUPAC-SS / 1997.....	47
6.1.1.2 <i>Skin Irritation and Sensitization Testing of Generic Transdermal Drug Product / 1999</i> .....	53
6.1.1.3 <i>Residual Drug in Transdermal and Related Drug Delivery System</i> .....	55
6.1.1.4 <i>Bioavailability and Bioequivalence Studies Submitted in NDAs or INDs General Considerations / 2014</i> .....	57
6.1.1.5 Farmacopeia Americana – USP.....	59
6.1.1.5.1 Testes de Avaliação Geral de Atributos de Qualidade.....	60
6.1.1.5.2 Testes Específicos para Sistemas de Liberação Transdérmica.....	65
6.1.1.5.3 Testes de Adesão.....	65
6.1.1.5.4 Teste de Vazamento.....	67
6.1.1.5.5 Limite Microbiológico.....	69
6.1.1.6 Considerações FDA.....	70
6.1.2 EMA.....	71
6.1.2.1 Nota de Orientação para Liberação Oral Modificada e Sistemas Transdérmicos: Seção II – Avaliação Farmacocinética e Clínica.....	71
6.1.2.2 Guias OECD.....	78
6.1.2.2.1 OECD 428.....	79
6.1.2.2.2 OECD 427.....	80

6.1.2.2.3 Documento de Orientação para a Condução de Estudos de Absorção na Pele.....	80
6.1.2.3 Diretriz sobre Qualidade de Dispositivos Transdérmicos.....	84
6.1.2.4 Farmacopeia Européia.....	87
6.1.2.5 Farmacopeia Britânica.....	88
6.1.2.6 Considerações EMA.....	88
6.1.3 ANVISA.....	89
6.1.3.1 RDC 60 de 10 de Outubro de 2014.....	89
6.1.3.2 Lei 11.794 de 8 de Outubro de 2008.....	93
6.1.3.3 Resolução Normativa no 17 de 3 de Julho de 2014 – CONCEA.....	94
6.1.3.4 Resolução Normativa no 18 de 24 de Setembro de 2014 – CONCEA.....	94
6.1.3.5 Farmacopeia Brasileira.....	95
6.1.3.6 Considerações ANVISA.....	95
6.2 Ensaio <i>in vitro</i> de permeação.....	96
6.2.1 Aparato de difusão – célula de Franz.....	103
6.2.2 Membranas.....	106
6.2.2.1 Escolha da membrana.....	106
6.2.2.2 Membranas artificiais.....	111
6.2.2.3 Preparo da membrana.....	113
6.2.3 Solução Receptora.....	115
6.2.3.1 pH da Solução Receptora.....	116
6.2.4 Temperatura de manutenção do ensaio.....	117
6.2.5 Tempo de ensaio.....	117
6.3 Proposta de metodologia para aprovação regulatória de testes de permeação <i>in vitro</i> .....	118
6.3.1 Estabelecimento de parâmetros adotados no ensaio <i>in vitro</i> .....	118
6.3.2 Discussão geral.....	122
7 CONCLUSÃO.....	124
8 BIBLIOGRAFIA.....	125

## 1 INTRODUÇÃO

A pele é um tecido que separa e protege o organismo da presença de diversos fatores ambientais, tais como agentes químicos, bactérias, alérgenos, fungos e radiação. Possui uma estrutura complexa e desempenha várias funções fisiológicas, como metabolismo, síntese, regulação de temperatura e excreção. A camada mais externa da pele, estrato córneo, é considerada a principal barreira à absorção de substâncias exógenas (WALTERS, 2002).

A aplicação de produtos farmacêuticos sobre a pele pode ter duas finalidades: absorção tópica, tendo como objetivo uma ação no próprio local da aplicação como, por exemplo, na pele, músculos e articulações; e absorção sistêmica, quando o fármaco aplicado sobre a pele deve atingir a circulação sanguínea para alcançar o alvo terapêutico no organismo em que foi administrado. As duas possibilidades de liberação, sistêmica ou local, podem ser desejáveis e atingidas pela combinação de propriedades de soluto apropriadas para transporte através da pele. Essas propriedades envolvem solubilidade em lipídios, grau de ionização e massa molar, com formas farmacêuticas adequadas, como sistemas de liberação transdérmica, géis, cremes, pomadas (WALTERS, 2002; PAUDEL *et al.*, 2010).

Produtos vêm sendo aplicados na pele há séculos e, de fato, produtos na forma de extratos vegetais ou compostos isolados de origem animal são utilizados para alívio de uma variedade de desordens locais. Há relativamente pouco tempo, menos de 40 anos, a liberação de medicamentos através da via transdérmica levou ao desenvolvimento e comercialização com sucesso de vários fármacos na forma de adesivos, como escopolamina, nitroglicerina, clonidina, estradiol, testosterona, fentanil e nicotina (WALTERS, 2002; MARGETTS & SAWYER, 2007).

O desenvolvimento de sistemas transdérmicos tem suscitado interesse crescente nas últimas décadas, principalmente por ser uma via alternativa ao trato gastrointestinal. Estes proporcionam, de um modo geral, as seguintes vantagens (ALEXANDER *et al.*, 2012):

- evitam variações na absorção gastrointestinal do fármaco, bem como ação do pH gástrico sobre moléculas sensíveis a essa condição;
- evitam interações com alimentos;
- não sofrem efeito de primeira passagem hepática, sendo menor a susceptibilidade à inativação enzimática;
- possibilidade de tratamento por longos períodos com uma única aplicação;
- a terapia pode ser interrompida facilmente pela simples remoção do sistema transdérmico;
- permitem administração em menor dose devido ao aumento da biodisponibilidade;
- possibilitam manutenção de concentrações plasmáticas constantes;
- aumentam a adesão do paciente ao tratamento como resultado da fácil administração.

A administração transdérmica elimina o esquema de doses frequentes e oscilações, picos e depressões na concentração plasmática do fármaco, característicos da administração oral. Por este motivo, fármacos com tempos de meia-vida curtos podem ser facilmente administrados pela via transdérmica. Adicionalmente, a eliminação do efeito de primeira passagem hepática permite que a quantidade de fármaco administrado seja menor e garanta segurança a pacientes com comprometimento hepático, levando a redução de efeitos adversos. Outra vantagem é que a terapia com dispositivos transdérmicos deve apresentar um custo mensal menor quando comparado com outras apresentações, já que esses dispositivos são desenvolvidos para liberação do fármaco por 1 a 7 dias, podendo chegar até a um período maior, como no caso de sistemas contraceptivos (PAUDEL *et al.*, 2010).

Todas essas vantagens levam a uma adesão maior pelo paciente, especialmente quando é requerido um período maior de tratamento, como no tratamento de dores crônicas e terapias antitabagismo. De um modo geral, a aceitabilidade dos produtos de liberação transdérmica é alta, tornando-se evidente pelo aumento no faturamento desses dispositivos. Em 2005 o mercado global para sistemas de liberação transdérmica foi de \$12,7 bilhões de dólares e

estima-se que em 2015 o mercado global para esses dispositivos chegará a \$32 bilhões (PAUDEL *et al.*, 2010).

Os fármacos que são bons candidatos ao desenvolvimento pela via de administração transdérmica são potentes, de modo que possuam alta afinidade por seus receptores e exerçam ação terapêutica em baixas doses, não irritantes, com extensa metabolização hepática, com tempos de meia-vida curtos, que não sofrem metabolismo na pele e com coeficientes de partição até 3. Desse modo, é gerada uma condição semelhante à infusão contínua, doses baixas e frequentes, em função da velocidade de permeação ser lenta (RANG & DALE, 2001; MARTINS & VEIGA, 2002; GOODMAN & GILMAN, 2010).

Fármacos com elevada hidrofília, quando incorporados em formulações destinadas à permeação cutânea, terão dificuldade em penetrar no estrato córneo. Por outro lado, se apresentarem elevada lipofília, tenderão a ficar retidos na fórmula ou sistema de liberação. Por esse motivo, é importante que o fármaco não apresente um grau de lipofília muito elevado, mas que seu equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) permita sua partição, o que acontece quando seu coeficiente de partição octanol/água situa-se preferencialmente entre 1 e 3 (ROBERTS *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2010).

São desvantagens da administração transdérmica a possibilidade de irritação localizada e o *lag-time*, que é o intervalo de tempo entre a administração e o alcance de concentrações plasmáticas terapêuticas. Adicionalmente, ocorre dificuldade de utilização dessa via com fármacos hidrofílicos, pois devido às características lipídicas do sebo, da membrana celular e do espaço intercelular este fármaco sofrerá obstáculo à difusão passiva. A variabilidade genética entre indivíduos, raças, hidratação da pele, distribuição de pelos, atividade das glândulas sudoríparas, pH na superfície da pele e integridade do estrato córneo, podem exercer influência na permeação e metabolização de fármacos. Em função destes fatores, o controle da dose também é um desafio, levando ao desenvolvimento de promotores de permeação e sistemas de liberação controlada (MARTINS & VEIGA, 2002; SILVA *et al.*, 2010; ALEXANDER *et al.*, 2012).

Atualmente, existem no mercado nacional medicamentos importantes utilizando a via transdérmica. Apresentações com estradiol, norelgestromina e etinilestradiol, nicotina, nitroglicerina, fentanila e rivastigmina são opções nesta via de administração. Tendo em vista a relevância da via transdérmica e seu caráter promissor, o presente trabalho visa identificar qual a regulamentação aplicada a estes medicamentos e confrontar as exigências regulatórias no Brasil (ANVISA), Estados Unidos da América (FDA) e Comunidade Europeia (EMA). Pretende também investigar e comparar quais são os testes propostos pelos compêndios oficiais e, adicionalmente, procurará propor uma metodologia de análise simuladora de biodisponibilidade *in vitro*, confrontando os parâmetros variáveis da técnica de difusão passiva empregada.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Histórico

No início do século XX, o dimetilsulfóxido (DMSO) foi revelado como capaz de atingir a circulação sistêmica quando aplicado na pele, mostrando que é possível a permeação de compostos aplicados externamente (EL-KATTAN, ASBILL & HAIDAR, 2000). Altas concentrações de DMSO induzem a transição da bicamada lipídica de ordenada (gel lamelar) para desordenada (líquida), possivelmente devido à interação do DMSO com ceramida II, lipídeo predominante no estrato córneo (NOTMAN *et al.*, 2007).

O interesse na liberação transdérmica de fármacos cresceu entre as décadas de 1960 e 1980, quando muitos avanços foram feitos. Em 1979 o primeiro adesivo transdérmico (*patch*) foi desenvolvido. Era o Transderm-Scop<sup>®</sup>, à base de escopolamina, que foi desenvolvido e rapidamente seguido por Transderm-Nitro<sup>®</sup>, nitroglicerina, desenvolvidos pela Alza. Durante a década de 1980, outros sistemas de liberação transdérmica foram desenvolvidos, incluindo Nitradisc<sup>®</sup>, nitroglicerina (Searle) e Catapress-TTS<sup>®</sup>, clonidina (Boehringer Ingelheim). Vários outros adesivos transdérmicos foram introduzidos durante a década de 1990, incluindo Estraderm<sup>®</sup>, estradiol (CIBA), Duragesic<sup>®</sup>, fentanil (Janssen), Testoderm<sup>®</sup>, testosterona (Alza), Deponit<sup>®</sup>, nitroglicerina (Wyeth-Ayerst) e Minitran<sup>®</sup>, nitroglicerina (3M), além de adesivos transdérmicos de Nicotina (EL-KATTAN, ASBILL & AIDAR, 2000; PAUDEL *et al.*, 2010).

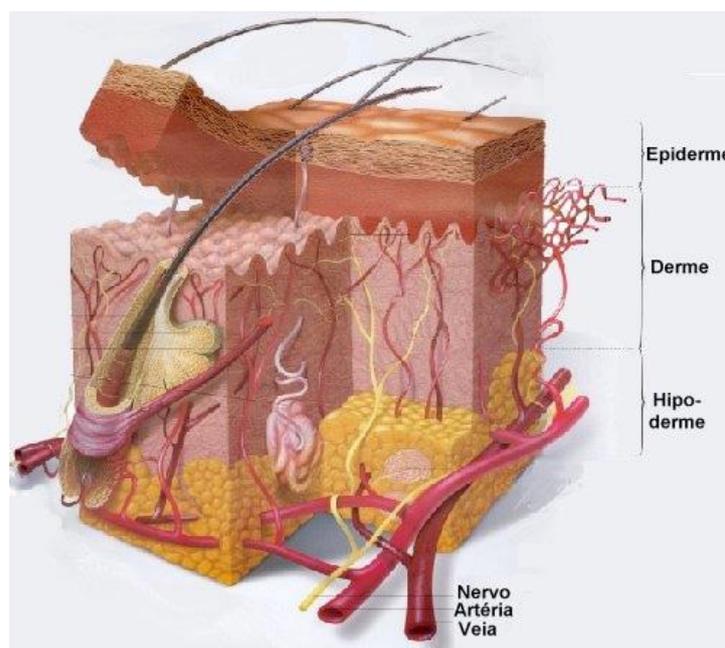
Após essas apresentações, muitas outras foram desenvolvidas utilizando tecnologias bem mais sofisticadas, com ou sem agentes promotores de permeação. São alguns exemplos de fármacos atualmente formulados em sistemas de liberação transdérmica: anlodipina base, meloxicam, tenoxicam, diltiazem, cetoprofeno, diclofenaco dietanolamina, furosemida, clonazepam, primaquina, entre outros (ALEXANDER *et al.*, 2012).

## 2.2 Permeação

### 2.2.1. Pele

A pele representa mais de 10% do peso total de um indivíduo adulto e sua área de superfície ocupa cerca de 2 m<sup>2</sup>. É um órgão multilaminado composto por várias camadas histológicas, conforme representado na Figura 1 (ALEXANDER *et al.*, 2012). A pele consiste essencialmente em três camadas: epiderme, subdividida em epiderme não viável (estrato córneo) e epiderme propriamente dita (viável), derme e tecido subcutâneo ou hipoderme. Estão também presentes na pele alguns anexos, dentre eles os mais importantes, envolvidos na permeação de fármacos, os folículos pilosos, dutos sudoríparos e glândulas sebáceas. Dentre as principais funções da pele estão a de proteção contra agentes ambientais e controle da homeostase (WALTERS, 2002).

Figura 1. Representação esquemática da pele



Fonte: Silva, 2010

A penetração de fármacos através da pele e sua distribuição percutânea são limitadas pelo estrato córneo, uma enorme estrutura organizada cumprindo função de barreira. Cada célula do estrato córneo é composta principalmente por queratinas insolúveis (~70%) e lipídeos (~20%). Sua camada menos externa é composta por corneócitos (95% das células), formando uma estrutura tipo “tijolo e

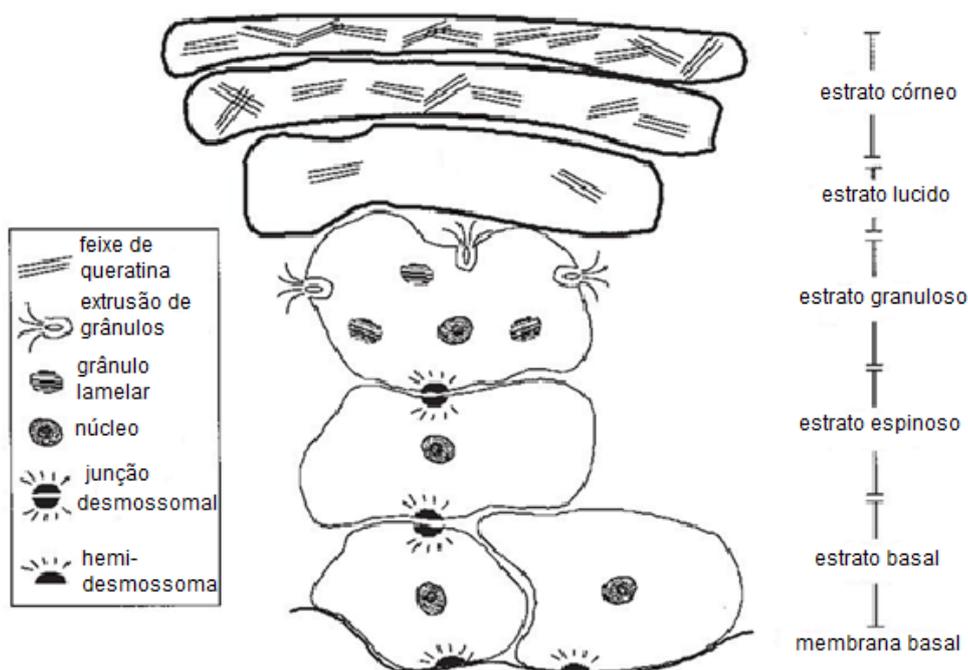
argamassa”, expressão utilizada para conceituar a propriedade de barreira da pele (MARTINS & VEIGA, 2002; SILVA *et al*, 2010; ALEXANDER *et al.*, 2012).

Na medida em que os queratinócitos proliferam na camada basal da epiderme, empurram outros queratinócitos no sentido da superfície epitelial, que se achatam e perdem seus núcleos, sofrendo diferenciação a corneócitos, culminando na formação do estrato córneo. A região intercelular consiste principalmente de lipídeos e desmossomas, filamentos de característica protéica responsáveis pela coesão das células, promovendo a junção dos corneócitos. A função de barreira é facilitada pela descamação contínua desta camada mais superficial, com um *turn over* total do estrato córneo ocorrendo a cada 2-3 semanas (WALTERS, 2002; ALEXANDER *et al.*, 2012).

Os corneócitos são ricos em queratina, proteína impermeável à água, com alto nível de resistência e elasticidade. Queratinas hidratadas comprimem os corneócitos (“tijolos”) embebidos no cimento intercelular (“argamassa”), composto por múltiplos lipídeos em bicamadas de ceramidas, ácidos graxos, colesterol e ésteres de colesterol. Essas bicamadas lipídicas formam um arranjo ordenado gel lamelar (ALEXANDER *et al.*, 2012).

As células do estrato córneo são originadas na epiderme viável e sofrem diversas alterações morfológicas antes da descamação. A maioria dos eventos inclui extrusão de corpos lamelares, perda de núcleo e aumento na quantidade de queratina no estrato córneo. A epiderme consiste em várias camadas de células epiteliais, em vários níveis de diferenciação. A Figura 2 exibe representação da diferenciação epidermal, ilustrando especialmente a diferenciação de corneócitos a queratinócitos. Suas células originam-se na camada basal, situada entre a epiderme viável e a derme. Nesta camada encontram-se melanócitos, células de Langerhans, células Merkel e duas outras classes de células queratinosas: uma possui capacidade de se dividir originando novas células e a outra promove o ancoramento da epiderme na membrana basal (WALTERS, 2002; CEVC & VIERL, 2010).

Figura 2. Diferenciação epidermal



Fonte: Modificado de Walters, 2002

Os melanócitos são células funcionais localizadas na camada basal da epiderme, também presentes no bulbo capilar e nos olhos. A principal função destas células é produzir melaninas, polímeros de indol quinona de alto peso molecular, as quais afetam pigmentação da pele, cabelos e olhos. A pigmentação visível é dependente não apenas do número, forma e tamanho dos melanossomas, organelas produtoras de melanina, mas também da natureza da melanina. O principal benefício na produção desse pigmento é a proteção contra radiação ultravioleta (WALTERS, 2002).

Outro tipo celular presente na camada basal da epiderme é a célula de Langerhans. É reconhecida como principal célula apresentadora de antígenos da pele. As células de Langerhans prendem os alérgenos, sofrem alteração na superfície e ganham volume. Estas células assim ativadas migram da epiderme para derme e de lá para o linfonodo mais próximo, onde apresentam o alérgeno aos linfócitos T na corrente linfática (WALTERS, 2002; ROMANI *et al.*, 2006).

O último tipo de célula presente na camada basal da epiderme é a célula Merkel. Essas células são associadas a terminações nervosas presentes no lado oposto da membrana basal, axônios sensoriais na derme, sugerindo que

funcionem como sensores táteis. Acredita-se que as células Merkel desempenhem também ação trófica em fibras nervosas periféricas e promovam liberação de substâncias bioativas (WALTERS, 2002).

A camada localizada abaixo da epiderme é a derme, apresentando maior matriz extracelular. Os principais componentes da derme são colágeno e fibras elásticas. Comparando com a epiderme, na derme há muito menos células e muito mais fibras. A derme contém extensa rede vascular, proporcionando nutrição da pele, reparo e respostas imunes, além de troca de calor para regulação térmica (WALTERS, 2002; CEVC & VIERL, 2010; ALEXANDER *et al.*, 2012).

A camada mais profunda da pele é o tecido subcutâneo ou hipoderme, que atua como isolante térmico, amortecedor de impacto e estoque de energia. É constituído por uma rede de células adiposas, interconectadas à derme por fibras colágenas e elásticas (WALTERS, 2002).

### **2.2.2. Permeação através da pele**

Os anexos presentes na pele, folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas, representam uma rota atraente para a permeação de fármacos. Revelam-se uma rota alternativa ao desafio do fármaco em permear através do estrato córneo. A entrada cônica através do folículo piloso, conhecida como infundíbulo, possui aproximadamente 500 µm de profundidade até o duto sebáceo, que conecta o folículo à glândula sebácea. Glândulas sebáceas são também encontradas independentemente de folículos, principalmente na face. Essas glândulas produzem sebo, substância lipofílica compreendendo triglicerídeos, ésteres cerosos, esqualeno, colesterol e ésteres de colesterol, que preenche o infundíbulo e possui diversas finalidades, como proteção contra microrganismos, controle da transpiração, perda de calor, transporte de antioxidantes à superfície e manutenção da integridade da pele (JEPPS *et al.*, 2013).

O sebo, lipofílico, proporciona uma rota natural para difusão de fármacos lipofílicos através do folículo piloso e glândula sebácea, mas representa uma barreira para fármacos hidrofílicos. Há também a possibilidade de permeação de fármacos através de glândulas sudoríparas. No entanto, mecanismos de promoção ou retardo do transporte de fármacos por esses apêndices ainda não foram elucidados, necessitando ainda de estudos experimentais (JEPPS *et al.*, 2013).

Muitos fatores afetam a penetração através da pele, como diferenças entre indivíduos, raça, espessura, temperatura, estado da pele (normal ou injuriada), tempo de contato com o dispositivo transdérmico, grau de hidratação, concentração de lipídeos, número de folículos pilosos, função das glândulas sudoríparas, pH, pre-tratamento da pele e características físicas do penetrante (WALTERS, 2002; SILVA *et al.*, 2010; ALEXANDER *et al.*, 2012).

Sendo assim, a absorção percutânea envolve difusão através do estrato córneo, das células viáveis da epiderme e, finalmente, das camadas superiores da derme até a microcirculação. E, uma vez que a permeação de fármacos ocorre por difusão passiva, o mecanismo de penetração e difusão através da pele é concentração dependente (DEGIM, 2006). Além da concentração do fármaco, estudos experimentais indicam que a permeação da maioria dos compostos através da camada córnea está relacionada também com a sua lipofilicidade e massa molar do fármaco, sendo a massa molar inferior a 1000 g/mol determinante para os atuais sistemas de liberação transdérmica (MARTINS & VEIGA, 2002; ALEXANDER *et al.*, 2012).

A integridade e o bom estado de manutenção da pele, em parte determinam a absorção, metabolismo, distribuição e excreção de compostos através da pele e do organismo como um todo. O estudo da absorção percutânea é uma realidade em dermatotoxicidade, quando compostos podem se comportar prejudicialmente à saúde, e em dermatofarmacologia, quando fármacos precisam ser distribuídos na pele e através da pele, no objetivo de tratar doenças localmente (doenças de pele) e sistemicamente (distribuição transdérmica) (WESTER & MAIBACH, 2002).

O estrato córneo, primeira barreira e passo determinante à absorção percutânea, é rico em lipídeos e funciona como uma esponja quando aplicados topicamente compostos lipofílicos. Possui capacidade de absorver certa quantidade de material, sendo esta absorção limitada pela solubilidade da molécula nos lipídeos sebáceos e epidermais. Este conceito, frequentemente denominado condição *sink*, é vastamente citado como condição básica em experimentos de avaliação *in vitro* de permeação (WESTER & MAIBACH, 2002). Ao aplicar um dispositivo transdérmico na pele, contendo o fármaco em reservatório ou disperso, um gradiente de concentração é estabelecido, com difusão do fármaco para o estrato córneo. Dessa forma, um segundo reservatório é formado, agora no estrato córneo e, na medida em que a difusão segue na epiderme e posteriormente derme, ocorre permeação do fármaco nos capilares sanguíneos presentes na derme (MARGETTS & SAWYER, 2007).

As propriedades físico-químicas do veículo e as propriedades de barreira do estrato córneo determinam a absorção inicial de compostos na pele (WESTER & MAIBACH, 2002). Existem três principais rotas de difusão passiva de compostos através da pele, até chegada à corrente sanguínea: difusão intercelular através de lipídeos lamelares; difusão transcelular através dos corneócitos e queratinócitos, e difusão através dos apêndices (MARTINS & VEIGA, 2002; DEGIM, 2006). Modelos matemáticos têm sido empregados na tentativa de prever qual a via preferencial de difusão. Tendo em vista o ambiente denso e altamente compactado por proteínas intercelulares dos corneócitos, a permeação pela via transcelular é cineticamente e termodinamicamente dificultada. Então, atualmente é consenso que a via preferencialmente utilizada na difusão de fármacos é a via intercelular (DEGIM, 2006).

Desde que o estrato córneo foi considerado barreira transponível, a permeação de fármacos através da pele pode ser descrita pela primeira lei de Fick, demonstrada resumidamente abaixo (MARTINS & VEIGA, 2002; WALTERS, 2002; JEPPS *et al.*, 2013).

$$-\frac{dc_v}{dt} = k_p \times c_v = \frac{D_B \times PC_{B/V}}{I} \times \frac{A}{V_V} \times c_V \quad (1)$$

$$J = P_B \times c_V = \frac{D_B \times PC_{B/V}}{I} \times c_V \quad (2)$$

$$PC_{B/V} = \frac{C_{SB}}{C_{SV}} \quad (3)$$

$$J = \frac{D_B \times C_{SB}}{I} \times \frac{c_V}{C_{SV}} \quad (4)$$

Em que:

$C_V$  = Concentração do fármaco no veículo.

$-dc_v/dt$  = velocidade a que a concentração de fármaco decresce no veículo.

$k_p$  = constante de permeação

$D_B$  = coeficiente de difusão do fármaco

$PC_{B/V}$  = coeficiente de partição do fármaco entre o estrato córneo e o veículo.

$A$  = área de aplicação

$V_V$  = volume do veículo

$P_B$  = permeabilidade do estrato córneo

$C_{SB}$  = solubilidade do fármaco no estrato córneo

$C_{SV}$  = solubilidade do fármaco no veículo

$J$  = fluxo do fármaco

$I$  = espessura da camada córnea

O fluxo de fármaco representa a quantidade de fármaco que permeia por unidade de tempo e por unidade de área. A velocidade de permeação e o fluxo são diretamente proporcionais à permeabilidade do fármaco na barreira cutânea ( $P_B$ ).

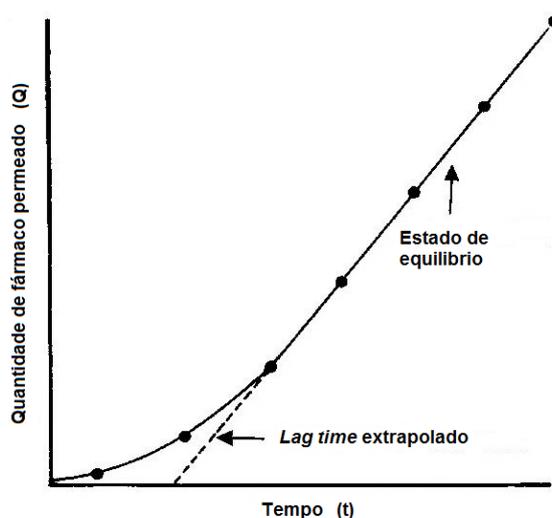
Se o coeficiente de partição ( $PC_{B/V}$ ) na equação (2) for substituído pela equação (3), obtém-se a equação (4). Assim, o fluxo de fármaco através da pele,  $J$ , aumenta com (MARTINS *et al.*, 2002):

- o incremento do coeficiente de difusão do fármaco na barreira ( $D_B$ ) e com a solubilidade do fármaco na barreira ( $C_{SB}$ );
- o aumento de concentração do fármaco no veículo ( $C_V$ ) ou com o decréscimo da sua solubilidade no veículo ( $C_{SV}$ ).

Além do uso das equações retiradas a partir da primeira lei de Fick, é possível obter, na prática, o fluxo de fármaco permeado pela plotagem de um gráfico, de quantidade de fármaco permeado através da membrana ( $Q$ ) *versus* o tempo ( $t$ ), conforme representado na Figura 3. O fluxo do fármaco no estado de equilíbrio ( $J$ ) pode ser calculado a partir da inclinação da reta obtida por regressão linear, da região linear da curva ( $dQ/dt$ ) dividida pela área ( $A$ ), conforme demonstrado na equação 5. A extrapolação da reta até o eixo X fornece o *lag time*. Essencialmente, a medida do *lag time* é a medida do tempo necessário para o gradiente de concentração do fármaco através da membrana tornar-se constante (FLYNN & STEWART, 1988; CHANTASART *et al.*, 2013).

$$J = \frac{1}{A} \times \frac{dQ}{dt} \quad (5)$$

Figura 3. Curva de Permeação, quantidade de fármaco permeado X tempo



Fonte: modificado de Flynn & Stewart, 1988

### 2.2.3 Agentes promotores de permeação

Com o objetivo de contornar variações individuais, aumentar a permeação de fármacos através do estrato córneo, e aumentar o número de fármacos candidatos ao desenvolvimento de medicamentos transdérmicos, vários métodos para remover reversivelmente a resistência desta barreira da pele têm sido investigados, entre os quais a utilização de promotores de permeação (MARTINS,

2002). Estes são incorporados à formulação com intuito de incrementar a difusão do fármaco, permitindo a penetração na epiderme viável, derme e circulação sistêmica (ALEXANDER *et al.*, 2012).

O ordenamento bioquímico dos lipídeos intercelulares do estrato córneo ou o ambiente queratinizado dos corneócitos são alterados com a utilização de promotores de permeação, de modo a permitir a penetração de compostos em um fluxo conveniente (ALEXANDER *et al.*, 2012). O promotor de permeação ideal precisa ser farmacologicamente inerte, não tóxico, de ação imediata, não irritante, de ação reversível, química e fisicamente compatível com fármaco e excipientes, acessível e com boas propriedades solventes. Alguns exemplos de agentes promotores de permeação são fosfolipídeos, pirrolidonas (como N-metil-2-pirrolidona, NMP), ácidos graxos e seus ésteres (como ácido oleico), sulfóxidos e similares (como dimetilsulfóxido, DMSO) e ciclodextrinas (MARTINS *et al.*, 2002).

#### **2.2.4 Metabolismo do fármaco durante o trânsito através da pele**

Um fator biológico que pode afetar a absorção transdérmica de determinado fármaco é o metabolismo do mesmo, à medida que se difunde através da pele. É concebível que pequenas quantidades do fármaco intacto atinjam a circulação sistêmica. No entanto, o metabolismo de primeira passagem local tem o potencial de restringir a absorção transdérmica. Todavia, experimentos realizados sugerem que esta primeira passagem local não representa obstáculo, principalmente pelo fato de que a pele possui capacidade bem menor de metabolizar fármacos que o fígado e a mucosa gastrointestinal. Adicionalmente, estudos comparativos demonstraram que a pele humana possui menor capacidade de alteração enzimática de fármacos que a pele de alguns animais, como ratos e camundongos. Particularmente, a pele humana demonstra ter baixa atividade da enzima esterase. Esterases promovem hidrólise durante a absorção percutânea, podendo influenciar não apenas a cinética de permeação, como também a ação terapêutica do fármaco e toxicidade em função dos metabólitos gerados a partir do mesmo. Outras atividades enzimáticas da pele,

humana ou não, demonstram ser substrato-específicas (FLYNN & STEWART, 1988; BARKER & CLOTHIER, 1997).

A inativação enzimática de um fármaco administrado por via transdérmica é improvável e pode ser facilmente verificada experimentalmente. A presença ou ausência de metabólitos pode ser demonstrada por testes de difusão vertical *in vitro*. Esses estudos também sugerem a extensão do metabolismo que irá ocorrer à medida que o fármaco é absorvido. Outra possibilidade é a incubação do fármaco com homogenatos de pele para checar o metabolismo na presença de cofatores enzimáticos relevantes. Se houver possibilidade de metabolismo, ele será evidenciado com estes experimentos (FLYNN & STEWART, 1988). Outra forma de determinar a perda de fármaco pelo metabolismo na pele é comparando a área sob a curva (ASC) do fármaco via administração intravenosa e via transdérmica, após este atingir fluxo constante de permeação (JEPPS *et al.*, 2013).

### **2.2.5 Aparato utilizado na avaliação de permeação *in vitro***

Conforme referenciado vastamente em literatura científica, bem como pelo SUPAC-SS (1997) e pelo Pharmacopeial Forum (2009) para ensaios de liberação, o aparato mais empregado na avaliação de permeação cutânea é o aparato de difusão vertical, também mencionado como aparato de Franz.

O aparato de Franz, descrito com mais detalhes nos itens 6.1.1.1 e 6.1.2, consiste em um aparato onde a forma farmacêutica, formulação semissólida ou dispositivo transdérmico, é posicionada no compartimento doador em íntimo contato com uma membrana natural. A membrana natural, por sua vez, faz contato com uma solução receptora, frequentemente um meio fisiológico, mantido sob agitação constante e condição *sink* assegurada para o referido fármaco. Através de amostragens em tempos determinados, este aparato permite quantificar o fármaco que ultrapassa a membrana e atinge a solução receptora.

É importante considerar que o fármaco deve ser solúvel na solução receptora para que a permeação de fato ocorra, devendo essa solubilidade ser

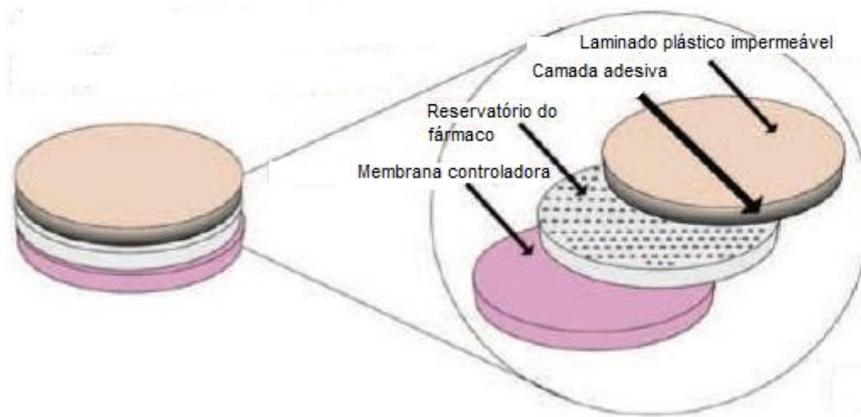
testada e a concentração de saturação definida. Há divergências na literatura científica sobre qual seria a condição *sink* ideal, variando de três a dez vezes o volume do meio de dissolução necessário para a obtenção de uma solução saturada do fármaco (STORPIRTIS *et al.*; 2009). No entanto, a definição recomendada para condição *sink* é de que a concentração do fármaco na solução receptora não ultrapasse um décimo da concentração de saturação (Pharmacopeial Forum, 2009; UEDA *et al.*, 2010).

### **2.3 Tecnologias empregadas em dispositivos transdérmicos**

Em virtude do interesse crescente pelos dispositivos de liberação transdérmica, diversas tecnologias vêm sendo desenvolvidas com sucesso para promover uma taxa de liberação controlada através do dispositivo transdérmico (TIWARY *et al.*, 2007).

Na Figura 4, é representado o sistema controlado de dispersão no adesivo. Este contém uma membrana impermeável superficial. O reservatório do fármaco é preparado por dispersão direta do fármaco em polímero adesivo e depois estendida com auxílio de solvente ou por aquecimento em uma tira impermeável, para formar uma fina camada reservatória. No topo, é disposta uma camada de polímero adesivo controlador de liberação, sem fármaco e de espessura uniforme, para produzir difusão controlada do fármaco. O material adesivo deve aderir à pele por extenso período de tempo sem desgrudar do revestimento impermeável e precisa ser compatível com o fármaco. Um exemplo de aplicação desse dispositivo é com a valsartana, bloqueador seletivo de angiotensina II, podendo substituir a medicação oral administrada uma vez ao dia (ALEXANDER *et al.*, 2012).

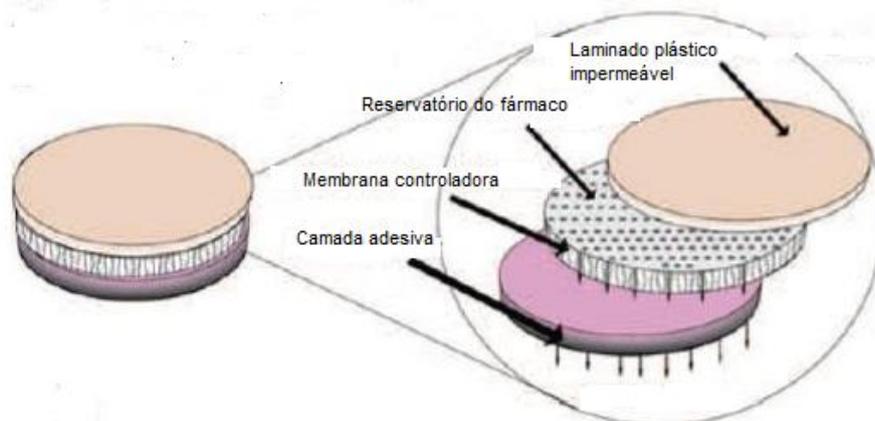
**Figura 4. Sistema controlado de dispersão no adesivo**



Fonte: modificado de Alexander *et al.*, 2012

Na Figura 5 é representado o sistema de permeação controlada através de membrana. Neste sistema, o reservatório do fármaco é totalmente embebido em compartimento moldado entre uma camada impermeável ao fármaco, lâmina mais superficial, e uma membrana polimérica controladora de liberação. Moléculas do fármaco podem atravessar a membrana interna, que pode ser microporosa ou não porosa, por processo de difusão simples através dos poros. No reservatório, fármacos sólidos são dispersos homogêneaemente em uma matriz polimérica (p.ex.: poliisobutileno) suspensa em um meio líquido viscoso (p.ex.: silicone fluido) para formar uma suspensão gelatinosa, ou dissolvida em solvente capaz de liberar o fármaco (p.ex.: álcool) para formar uma suspensão. Na camada externa dessa membrana, uma fina camada de polímero adesivo é disposta, de modo a promover íntimo contato do dispositivo com a pele. Exemplos de utilização desse dispositivo são os adesivos de escopolamina (TransdermScop<sup>®</sup>), que conferem 3 dias de proteção do mal estar por movimento, e de nitroglicerina (TransdermNitro<sup>®</sup>) que substitui medicação diária para angina de peito (ALEXANDER *et al.*, 2012).

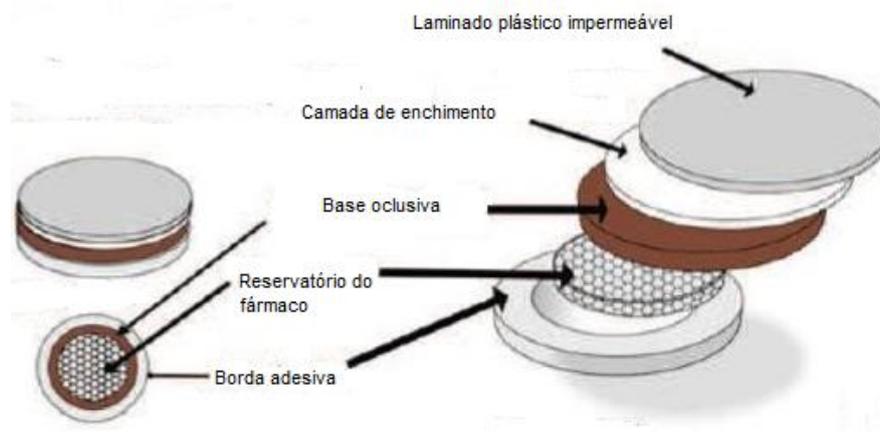
**Figura 5. Sistema de permeação controlada através de membrana**



Fonte: modificado de Alexander *et al.*, 2012

A Figura 6 representa o sistema controlado em matriz difusora. Neste sistema o reservatório do fármaco é preparado homogeneamente pela dispersão de partículas do fármaco em uma matriz polimérica lipofílica ou hidrofílica. O polímero assim preparado é então moldado em um disco com área superficial definida e adesividade controlada. O disco contendo reservatório do fármaco é fixado em uma base oclusiva com uma camada impermeável mais externa. Esse sistema é melhor exemplificado por adesivos de nitroglicerina. A vantagem dessa tecnologia de dispersão em matriz é a segurança na dose, já que o polímero não sofre ruptura (ALEXANDER *et al.*, 2012).

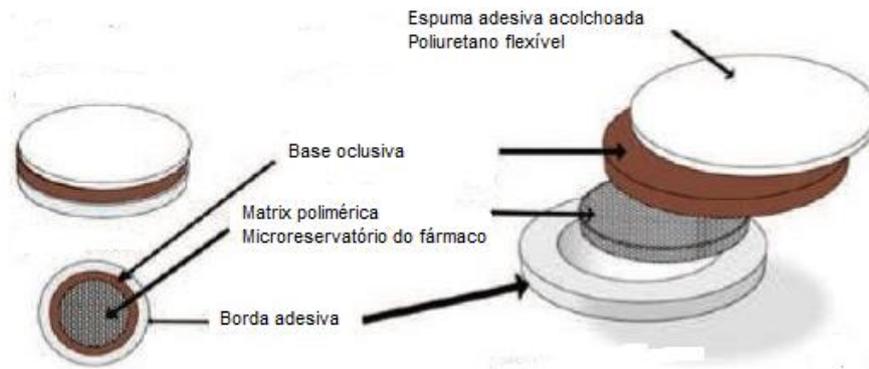
**Figura 6. Sistema controlado em matriz difusora**



Fonte: modificado de Alexander *et al.*, 2012

O sistema tipo micro reservatório é representado na Figura 7. O reservatório do fármaco é formado primeiramente suspendendo o fármaco em solução aquosa de polímero líquido e depois dispersando a suspensão do fármaco homogeneamente em polímero lipofílico, através de força mecânica, até a formação de milhares de esferas microscópicas que funcionam como reservatório do fármaco (ALEXANDER *et al.*, 2012).

**Figura 7. Sistema tipo micro reservatório**



Fonte: modificado de Alexander *et al.*, 2012

Conforme mencionado, os dispositivos que utilizam reservatório, matriz difusora para o fármaco, empregam polímeros no armazenamento do mesmo. Alguns polímeros utilizados são eudragit, etil celulose e carbopol (ALEXANDER *et al.*, 2012).

## 2.4 Apresentações Comerciais no Brasil

Ainda são poucas as apresentações transdérmicas comercializadas no mercado nacional, embora já existam opções relevantes utilizando esta via de administração. Um exemplo é o fentanil transdérmico, que proporciona comodidade no esquema terapêutico de controle da dor, vastamente empregado em oncologia (ZERNIKOW, MICHEL & ANDERSON, 2007).

Em 2011, foram anunciados investimentos do Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES) para o Laboratório Cristália, no âmbito do Programa de Apoio ao Desenvolvimento do Complexo Industrial da Saúde (Profarma – Inovação). De acordo com nota do Banco, a operação, aprovada pelo BNDES, fomentará a pesquisa e o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos, incluindo medicamentos de base biotecnológica, e permitirá a ampliação do portfólio do Cristália, com a inclusão de medicamentos mais modernos e específicos, a preços competitivos (Croma Comunica, 05/04/2011). O Laboratório Cristália já fabrica o Fentanest<sup>®</sup>, adesivo transdérmico de fentanil, e um dos projetos com o investimento do BNDES inclui a produção de

nicotina transdérmica, medicamento presente na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) 2008, substituindo importações por um equivalente nacional.

São exemplos de apresentações de medicamentos transdérmicos comercializados no Brasil aqueles relatados na Tabela 1:

**Tabela 1. Exemplos de apresentações transdérmicas comercializadas no Brasil**

<b>Medicamento</b>	<b>Fármaco</b>	<b>Finalidade Terapêutica</b>	<b>Fabricante</b>
Climaderm <sup>®</sup>	Estradiol	Terapia de reposição hormonal na menopausa	Janssen-Cilag
Durogesic <sup>®</sup>	Fentanil	Analgésico opióide	Janssen-Cilag
Estradot <sup>®</sup>	Estradiol	Terapia de reposição hormonal na menopausa	Novartis
EVRA <sup>®</sup>	Norelgestromina + Etinilestradiol	Contraceptivo	Janssen-Cilag
Exelon <sup>®</sup>	Rivastigmina	Terapia de doenças degenerativas, ↑acetilcolina, melhorando funcionamento cognitivo	Novartis
Fentanest <sup>®</sup>	Fentanil	Analgésico opióide	Cristália
Nicotinell <sup>®</sup>	Nicotina	Controle do tabagismo	Novartis
Niquitin <sup>®</sup>	Nicotina	Controle do tabagismo	GlaxoSmithKline
Nitroderm TTS <sup>®</sup>	Nitroglicerina	Antianginoso	Novartis
System <sup>®</sup>	Estradiol	Terapia de reposição hormonal na menopausa	Wyeth

A Novartis realizou estudo comparativo entre duas apresentações de rivastigmina, Exelon<sup>®</sup> cápsulas, nas apresentações 6 mg, 4,5 mg, 3 mg e 1,5 mg, administrados a cada 12 h, e Exelon<sup>®</sup> patch, nas apresentações patch 20, com

liberação de 19 mg / 24 h, patch 15, com liberação de 13,3 mg / 24 h, patch 10, com liberação de 9,5 mg / 24 h e patch 5, com liberação de 4,6 mg / 24 h, administrados a cada 24 h (WO 2007/064407 A1).

A rivastigmina interage seletivamente com suas enzimas-alvo, acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE), pela formação de uma ligação covalente temporária. Conseqüentemente, ocorre aumento na concentração de acetilcolina no córtex cerebral e hipocampo, melhorando funções cognitivas como atenção, aprendizado e memória. É um fármaco utilizado na terapia da doença de Alzheimer e de Parkinson (LIMA, 2008).

O estudo demonstra perfis cinéticos bem diferentes entre as duas apresentações. A absorção de rivastigmina do Exelon<sup>®</sup> *patch* é lenta. Após a primeira dose, concentrações detectáveis no plasma são observadas após um intervalo de tempo de 0,5–1 hora, atingindo níveis próximos ao máximo após 8 horas. Após o pico, as concentrações plasmáticas diminuem lentamente pelo tempo restante do período de aplicação de 24 horas. Com a dose múltipla, após o adesivo anterior ter sido trocado pelo novo, as concentrações plasmáticas no início decrescem lentamente por aproximadamente 40 minutos em média, até a absorção de a nova aplicação tornar-se mais rápida que a eliminação, e os níveis plasmáticos comecem a aumentar novamente e alcançar um novo pico em aproximadamente 8 horas. No estado de equilíbrio, os níveis de depressão são aproximadamente 50% dos níveis de pico, ao contrário da dose oral, cujas concentrações são reduzidas para virtualmente zero entre as doses. Esta informação pode ser observada nas Figuras 8 e 9.

A rivastigmina foi rápida e extensivamente metabolizada com uma meia vida de eliminação de aproximadamente 3,4 horas após a remoção do sistema transdérmico. A eliminação foi limitada pela absorção (cinética *flip-flop*, quando a velocidade de eliminação é limitada pela velocidade de absorção, que neste caso é lenta), o que explica o  $t_{1/2}$  mais longo após administração transdérmica *versus* o  $t_{1/2}$  oral de 1,4 horas.

Embora menos pronunciada que a formulação oral, a exposição à rivastigmina ( $C_{\text{máx}}$  e ASC) aumentou proporcionalmente com o aumento de doses

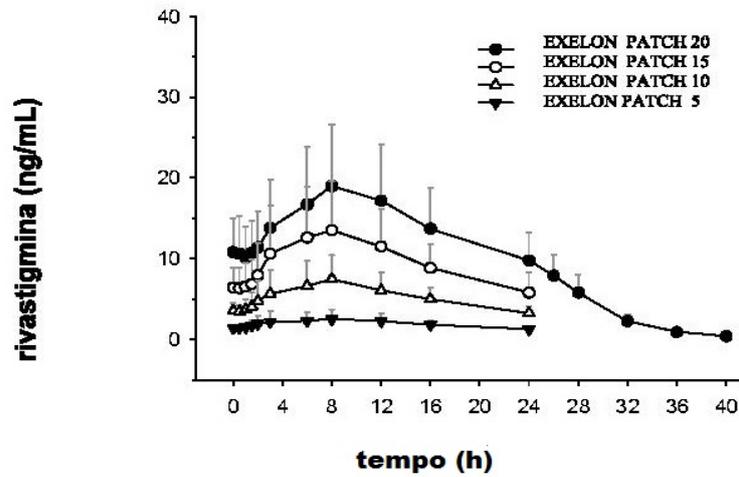
do adesivo. O aumento na ASC de rivastigmina em relação à menor dose de Exelon<sup>®</sup> patch 5 foi de 2,6; 4,9 e 7,8 vezes, para Exelon<sup>®</sup> patch 10, 15 e 20, respectivamente. Analisando os gráficos das Figuras 8 e 9, é possível comparar as três maiores doses com a menor dose de cada apresentação, e observar que na apresentação oral, a exposição à rivastigmina foi realmente mais pronunciada com o aumento nas doses, levando também em consideração a administração de 12 em 12 horas.

O índice de flutuação (IF), medida da diferença relativa entre concentrações de pico e depressão  $[(C_{\text{máx}} - C_{\text{mín}})/C_{\text{avg}}]$ , ficou na faixa de 0,57 a 0,77 para o adesivo, demonstrando assim uma flutuação bem menor entre as concentrações de pico e depressão do que a formulação oral (IF = 3,96 a 6,24).

Conforme determinado pela modelagem compartimental, o Exelon<sup>®</sup> patch 20 exibiu exposição ( $ASC_{24h}$ ) em um paciente típico equivalente àquela que seria proporcionada por uma dose oral de cerca de 9 a 10mg, duas vezes ao dia (isto é, 18 a 20mg/dia), enquanto que o Exelon<sup>®</sup> patch 10 exibiu uma exposição equivalente àquela proporcionada por uma dose oral de cerca de 6mg, duas vezes ao dia (isto é, 12mg/dia) maior dosagem da apresentação em cápsulas.

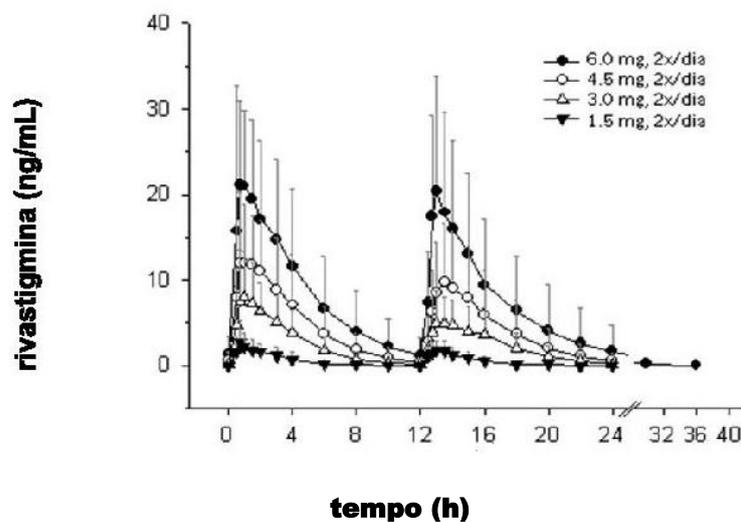
Em um estudo de dose simples que compara diretamente os adesivos com a forma oral, a variabilidade interindivíduos (indivíduos saudáveis) nos parâmetros farmacocinéticos da rivastigmina (ajustada para dose/kg de peso corpóreo) foi de 43% ( $C_{\text{máx}}$ ) e 49% ( $ASC_{0-24h}$ ) após o adesivo, versus 74% e 103%, respectivamente, após a cápsula oral. Similarmente, a variabilidade interindivíduos nos parâmetros farmacocinéticos de rivastigmina foi menor após o adesivo do que a cápsula no estado de equilíbrio em pacientes portadores da doença de Alzheimer que receberam doses repetidas. A variabilidade interpacientes (portadores de Alzheimer) foi no máximo 45% ( $C_{\text{máx}}$ ) e 43% ( $ASC_{0-24h}$ ) após o adesivo, enquanto que para a forma oral foi de 71% e 73%, respectivamente. Estes dados parecem confirmar autores que citam serem mais acentuadas variações individuais na extensão do metabolismo de primeira passagem do que na permeação cutânea (FLYNN & STEWART, 1988; MARTINS & VEIGA, 2002).

Figura 8. Concentrações plasmáticas de rivastigmina adesivo transdérmico seguidas 24h de aplicação



Fonte: modificado da patente do Excelon® Patch, número de publicação internacional WO 2007/064407 A1

Figura 9. Concentrações plasmáticas de rivastigmina cápsulas, duas vezes ao dia



Fonte: modificado da patente do Excelon® Patch, número de publicação internacional WO 2007/064407 A1

## 2.5 Fármacos utilizados em sistemas de liberação transdérmica

Em seu estudo de revisão, Alexander e colaboradores (2012) relacionaram alguns fármacos atualmente aprovados nos Estados Unidos e Europa em sistemas transdérmicos, conforme a Tabela 2.

**Tabela 2. Fármacos utilizados em sistemas transdérmicos**

<b>Fármaco</b>	<b>Categoria</b>	<b>Fármaco</b>	<b>Categoria</b>
Etinilestradiol +medroxiprogesterona	Hormônio	Tenoxicam	Antiinflamatório não esteroidal
Anastrozol	Inibidor Aromatase	Meloxicam	Antiinflamatório não esteroidal
Amlodipina base	Antagonista canal de cálcio	Avobenzona	Fotoproteção
Diltiazem	Antihipertensivo	Nortriptilina	Antipsicótico
Benzotropina	Antagonista de receptor muscarínico	Cetoprofeno	Antiinflamatório não esteroidal
Diclofenaco dietanolamina	Anti-inflamatório não esteroidal	Indometacina	Antiinflamatório não esteroidal
Teofilina	Broncodilatador	Glipizida	Antidiabético
Naloxona	Antagonista opióide	Tretinoína	Vitamínico
Dexametasona	Antiinflamatório	Nicotina	Antitabagismo
Propranolol	Antihipertensivo	Estradiol	Hormônio
Furosemida	Diurético	Pinacidil Monohidratado	Vasodilatador
Clonazepam	Anticonvulsivante	Triclosan	Anti-malária
Indapamida	Antihipertensivo	Primaquina	Anti-malária
Tacrina	Inibidor colinesterase	Metilfenidato	Estimulante SNC

---

Fonte: Alexander *et al.*, 2012

Os fármacos compreendidos nessa relação atenderam aos pré-requisitos para o desenvolvimento de seus respectivos sistemas de liberação transdérmica. A distribuição transdérmica é limitada então a fármacos potentes, que exercem ação farmacológica em baixas doses. Fármacos com massa molar inferior a

1000g/mol, solubilidade adequada ao veículo, coeficiente de partição ( $\log P$ ) < 3, ponto de fusão inferior a 200°C e lipofilicidade apropriada de modo a percorrer o espaço intercelular, que demonstra ser a principal via de acesso à derme, são considerados bons candidatos para liberação através dessa via. Os sistemas de liberação transdérmica (SLT) estão ganhando popularidade no mercado global e, com a gama de produtos aprovados pelo FDA, já são considerados uma tecnologia madura (ALEXANDER *et al.*, 2012).

## 2.6 Oportunidades futuras

Os SLT vêm proporcionando importantes contribuições, mas ainda não atingiram completamente seu potencial como alternativa à administração oral e injeções hipodérmicas. A primeira geração de SLT continua em crescimento na dispensação de fármacos pequenos, lipofílicos e em baixas doses. No entanto, possibilidades ainda mais inovadoras estão por vir, associando processos físicos aos dispositivos (PAUDEL *et al.*, 2010).

A segunda geração de SLT emprega seletivamente agentes promotores de permeação, visto que há uma dificuldade em focalizar seus efeitos no estrato córneo para evitar irritação ou toxicidade na medida em que atingem camadas mais profundas da pele. Além dos agentes promotores de permeação, utilizam também ultrassom não cavitacional e iontoforese. A iontoforese facilita o movimento de íons através da membrana celular com a diferença de potencial elétrico aplicada externamente, aumentando a permeação de fármacos, inclusive fármacos iônicos. Esta geração de SLT demonstra esforço no balanço entre aumentar a liberação do fármaco através do estrato córneo e proteger de dano camadas mais profundas da pele. Como resultado, esta geração avançou na liberação de moléculas pequenas, mas fez poucos avanços na liberação de macromoléculas e compostos hidrofílicos (PRAUSNITZ & LANGER, 2008).

A terceira geração de SLT libera seus fármacos através do estrato córneo utilizando micro agulhas, termoablação, microdermabrasão, eletroporação e ultrassom cavitacional. Micro agulhas e termoablação estão em fase experimental para liberação transdérmica de macromoléculas e vacinas, como insulina,

hormônios paratireoides e vacina contra influenza. A terceira geração de SLT possivelmente terá maior impacto porque será capaz de restringir melhor como seu alvo o estrato córneo. Novos agentes promotores de permeação, físicos, vêm demonstrando bons resultados com macromoléculas, incluindo proteínas e vacinas. A liberação subcutânea de peptídeos, como a insulina, é ideal pela elevada degradação enzimática e baixa absorção que ocorreria pelo trato gastrointestinal. Estudos recentes avaliando permeação de insulina com aplicação de dispositivos contendo micro agulhas vêm demonstrando excelentes resultados, sem danos sérios à pele e com ação hipoglicêmica muito similar às injeções subcutâneas (PRAUSNITZ & LANGER, 2008; ALEXANDER *et al.*, 2012).

Os SLT oferecem então oportunidades de terapia para diversos fármacos com baixa biodisponibilidade oral, dor e inconveniência de injetáveis. Outro diferencial dos SLT é a possibilidade de liberação controlada, muitas vezes limitante para apresentações orais e injetáveis. Avanços científicos e tecnológicos empregados no desenvolvimento de medicamentos transdérmicos podem levar estas apresentações a representarem real impacto na medicina (PRAUSNITZ & LANGER, 2008).

### 3 JUSTIFICATIVA TÉCNICO CIENTÍFICA

A indústria farmacêutica e o setor acadêmico em todo o mundo realizam pesquisas com o intuito de possibilitar condutas terapêuticas eficientes, com resultados clínicos rápidos e seguros (SILVA *et al.*, 2010). No setor farmacêutico nacional, faz-se necessário maior incentivo à inovação de modo a estimular o desenvolvimento de soluções em saúde de forma acessível a todos os segmentos da sociedade. O estudo e o debate de novas tecnologias, levando em consideração a relação custo/benefício da população e a segurança desde a aquisição até o descarte, auxiliam no aprimoramento de ferramentas regulatórias envolvidas no controle dos medicamentos disponibilizados. Nesse contexto, os dispositivos de liberação transdérmica são apresentados como alternativa a médicos e pacientes.

A permeação de substâncias através da pele depende, principalmente, de suas propriedades físico-químicas e do seu comportamento quando colocadas em um sistema transdérmico apropriado. Em razão disso, cada combinação fármaco / forma farmacêutica deve ser examinada individualmente com rigoroso critério de avaliação na etapa que precede o desenvolvimento farmacotécnico (etapa de pré-formulação) para, somente após isso, realizar os estudos de permeação cutânea e eficácia (SILVA *et al.*, 2010).

Atualmente, são recomendados testes *in vitro* de permeação cutânea para estimar permeação *in vivo*, mas justamente estes são ensaios não farmacopéicos. O teste de permeação *in vitro* avalia não apenas a liberação do fármaco a partir do dispositivo, como também o potencial de difusão por gradiente de concentração através da pele até uma solução receptora, onde é determinada a quantidade de fármaco permeado (BRONAUGH, 2002). Já o ensaio de liberação consiste em avaliar a liberação do fármaco a partir de sua forma farmacêutica, de modo a tornar-se disponível para ser absorvido e é descrito pela Farmacopeia Europeia e pela USP como *Dissolution Test for Transdermal Patches* (FARMACOPEIA EUROPÉIA 8.3, 2015; USP 37, 2015).

A ausência de padronizações analíticas para os parâmetros de ensaio de permeação, como membranas empregadas, aparato e suas dimensões, meios

receptores e tempo de ensaio, pode prejudicar a interpretação de segurança e eficácia dos testes *in vitro*. Sendo assim, a análise das técnicas que vêm sendo mais vastamente empregadas pela comunidade científica pode nortear a realização de uma metodologia harmonizada para testes *in vitro* de permeação, e não apenas de liberação. A existência de uma metodologia harmonizada de permeação é fundamental não apenas para avaliação do dispositivo na etapa de desenvolvimento farmacotécnico, como também na avaliação de qualidade e segurança do sistema de liberação transdérmica disponibilizado, já que permite estimar a quantidade de fármaco retida na membrana (no caso dos testes de permeação, uma membrana natural, pele) e a quantidade de fármaco permeada até uma solução receptora (LEWIS *et al.*, 1997; WALTERS *et al.*, 1998).

Com relação à segurança dos medicamentos transdérmicos, dados clínicos de dispositivos atualmente disponíveis, revelam que há riscos de toxicidade pelo mau uso, tanto decorrente de excesso na dose ou ingestão do gel reservatório, bem como riscos pelo descarte inapropriado ou falha na aderência do dispositivo, podendo este fixar-se acidentalmente em outro indivíduo que não o paciente (WOKOVICH *et al.*, 2006; ORAZIO & FISCHER, 2012). Em 2005, o FDA anunciou uma investigação a respeito de mortes e outros eventos adversos sérios decorrentes de superdosagem envolvendo pacientes que utilizavam Duragesic<sup>®</sup>, dispositivo transdérmico de fentanil. Os primeiros dispositivos deste medicamento consistiam em um reservatório contendo o fármaco, uma membrana controladora de liberação e uma camada adesiva para assegurar íntimo contato do dispositivo com a pele. Relatos específicos a respeito de falha da membrana controladora de liberação, com subsequente escape do gel contido no reservatório, levaram a recolhimentos do produto em 2004 e 2008. Um avanço na tecnologia levou ao desenvolvimento de dispositivo contendo o fármaco em matriz adesiva, onde a camada adesiva realiza não apenas íntimo contato com a pele, como também liberação controlada do fármaco. Em 2007 o Daytrana<sup>®</sup>, dispositivo transdérmico de metilfenidato utilizado no transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, atualmente produzido por Noven Pharmaceuticals, teve um recolhimento voluntário de vários lotes em decorrência de separação do dispositivo e sua película protetora. Em 2009, o FDA anunciou uma recomendação em virtude do

risco de queimaduras durante realização de exames de ressonância magnética de imagem em usuários de dispositivos transdérmicos contendo revestimento externo metalizado. Em virtude de alguns casos de queimaduras, os pacientes deveriam ser orientados a remover o dispositivo antes e reaplicar um novo após o término da ressonância magnética de imagem (OLIVEIRA *et al.*, 2012; PATEL *et al.*, 2012).

Considerando o mercado nacional de medicamentos, é missão da ANVISA promover e proteger a saúde da população e intervir nos riscos decorrentes da produção e do uso de produtos e serviços sujeitos à vigilância sanitária. Ademais, a julgar pela importância dos medicamentos prescritos e disponíveis no mercado, bem como os que se encontram em fase de pesquisa e desenvolvimento como oportunidades terapêuticas, o estudo do cenário regulatório torna-se indispensável na garantia de segurança e eficácia das diversas terapias a que se propõem as apresentações transdérmicas.

## 4. OBJETIVO

### Objetivos gerais

Confrontar as metodologias de ensaios de liberação/permeação descritas na literatura científica, bem como as exigências regulatórias para medicamentos transdérmicos das três agências regulatórias de interesse, FDA, EMA e ANVISA, analisando tópicos pertinentes, que assegurem qualidade e segurança a esses medicamentos.

### Objetivos específicos

- Analisar, individualmente, abordagens descritas na garantia de qualidade e segurança pelas três agências regulatórias, FDA, EMA e ANVISA.
- Comparar ensaios sugeridos para sistemas transdérmicos em compêndios oficiais, citados pelas referidas agências regulatórias, Farmacopeia Americana, Farmacopeia Britânica, Farmacopeia Europeia e Farmacopeia Brasileira.
- Levantar parâmetros variáveis no ensaio com células de difusão vertical, células de Franz, utilizadas para avaliação *in vitro* no desenvolvimento e elaboração de dossiês de registro para sistemas transdérmicos.
- Realizar levantamento bibliográfico a partir de literatura científica, de modo a identificar quais desses parâmetros são críticos na realização do ensaio de permeação *in vitro*.
- Respalhada pela literatura científica, desenvolver uma proposta consistente para aprovação regulatória de testes *in vitro* de permeação.

## 5. METODOLOGIA

No desenvolvimento do presente estudo, foi realizada pesquisa bibliográfica em bases de dados científicas, a citar: Scielo, ScienceDirect, Web of Knowledge, Capes, Pubmed e Scopus. A Tabela 3 resume as palavras-chave empregadas e o material selecionado para revisão bibliográfica e aspectos regulatórios. A seleção dos artigos foi feita utilizando como critério a relevância com o tema, o número de citações dos referidos artigos e definição de período para busca bibliográfica preferencialmente não anterior ao ano de 2000.

O levantamento de legislações pertinentes foi extraído das três agências regulatórias de interesse, FDA, EMA e ANVISA: [www.fda.gov](http://www.fda.gov), [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu), [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br).

A pesquisa de testes propostos para dispositivos transdérmicos em compêndios oficiais, sendo eles USP, Farmacopeia Europeia, Farmacopeia Britânica e Farmacopeia Brasileira, foi realizada no período de dezembro/2013 a janeiro/2015, incluindo as seguintes edições: USP 37, Farmacopeia Europeia 8.3, Farmacopeia Britânica 2014 e Farmacopeia Brasileira 5ª edição.

A pesquisa de patentes foi realizada no período até maio/2014, utilizando as palavras-chave *transdermal* / transdérmico, nas seguintes páginas eletrônicas: [www.inpi.gov.br](http://www.inpi.gov.br), [www.wipo.int](http://www.wipo.int), [www.google.com/patents](http://www.google.com/patents) e [www.epo.org](http://www.epo.org).

**Tabela 3. Metodologia de busca e resultados obtidos.**

<b>Palavras-chave</b>	<b>Material selecionado</b>
<i>Transdermal</i> / transdérmico	2 Livros: Bronaugh 2002; Walters 2002.
<i>Transdermal delivery systems</i> / sistemas de liberação transdérmica	13 Artigos: Alexander <i>et al.</i> , 2012; Barker & Clothier, 1997; Cevc & Vierl 2010; El-Kattan, Asbill & Haidar 2000; Flynn e Stewart 1988; Margetts e Sawyer 2007; Prausnitz e Langer 2008; Patel <i>et al.</i> , 2012; Paudel <i>et al.</i> , 2010; Roberts <i>et al.</i> , 2002; Silva <i>et al.</i> , 2010; Tiwary <i>et al.</i> , 2007; Walters <i>et al.</i> , 1998.
<i>Pharmacology</i> / farmacologia	2 Livros: Rang e Dale 2001; Goodman and Gilman 2010. 1 Artigo: Lima, 2008.
<i>Skin permeation (permeability)</i> / permeação (permeabilidade) cutânea	9 Artigos: Chantasart <i>et al.</i> , 2013; Jepps <i>et al.</i> , 2013; Martins <i>et al.</i> , 2002; Martins e Veiga 2002; Notman <i>et al.</i> , 2007; Degim 2006; Romani <i>et al.</i> , 2006; Wester & Maibach 2002; Ueda <i>et al.</i> , 2010. 1 Livro: Storpirtis <i>et al.</i> , 2009.

<b>Palavras-chave</b>	<b>Material selecionado</b>
<i>Transdermal toxicity</i> / toxicidade transdérmicos	4 Artigos: Oliveira <i>et al.</i> , 2012; Orazio e Fischel 2012; Wokovich <i>et al.</i> , 2006; Zernikow Michel & Anderson 2007.
<i>Franz cell</i> / células de Franz	5 Artigos: Baert <i>et al.</i> , 2009; Lewis <i>et al.</i> , 1997; Liebenberg <i>et al.</i> , 2004; Ng <i>et al.</i> , 2010; Pharmacopeial Forum 2009.
<i>Transdermal / Regulatory approval (registration)</i>	7 Guias: <i>Guideline</i> (EMA) 2012; <i>Guidances</i> (FDA) 1995, 1997, 1999, 2009, 2011, 2014.
Transdérmico / Aprovação (registro) regulatória (o)	Legislação: Decreto 79.094/1977; Lei 6360/1976; RDC 136/2003; RDC 60/2014.
Testes <i>in vitro</i> ANVISA	Lei 11.794/2008; Resolução Normativa 17/2014; Resolução Normativa 18/2014.
<i>Dermatopharmacokinetic study</i> / estudo dermatofarmacocinético	1 Artigo: Andrade <i>et al.</i> , 2013.
<i>Quality by Design and transdermal</i>	Jana <i>et al</i> 2014; Mennini <i>et al.</i> , 2012; Krishnaiah <i>et al.</i> , 2014.

O levantamento dos parâmetros empregados pela comunidade científica no ensaio de permeação em células de Franz foi realizado via pesquisa no sitio *Web of Knowledge*, até setembro de 2014, usando como critério o número de citações dos referidos estudos em outros artigos científicos. O termo empregado na busca pelo tópico foi *transdermal in vitro permeation test* e os resultados obtidos foram relatados por ordem decrescente de citações na tabela 5.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão do presente estudo serão apresentados concomitantemente, de forma a tornar a leitura fluente. Dentro do primeiro item, 6.1, serão primeiro expostas as exigências regulatórias tomando como base o que é praticado pelo FDA. Na sequência, serão apresentadas as exigências regulatórias do EMA e da ANVISA, fazendo automaticamente um paralelo entre as três agências. No segundo item, 6.2, serão apresentados os parâmetros empregados nos ensaios *in vitro* de permeação, com discussão subsequente dos aspectos relevantes de cada parâmetro. E, por fim, no item 6.3 será feita uma proposta de padronização para o ensaio *in vitro* de permeação e discussão geral sobre o levantamento nas três agências regulatórias.

### 6.1 Aspectos Regulatórios

#### 6.1.1 FDA

**6.1.1.1 *Nonsterile Semisolid Dosage Forms. Scale-Up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing and Controls; In Vitro Release Testing and In Vivo Bioequivalence Documentation - SUPAC-SS / 1997* (Formas farmacêuticas semissólidas não estéreis. Escalonamento e alterações pós-aprovação: química, fabricação e controles; teste de liberação *in vitro* e documentação de bioequivalência *in vivo*).**

Na ausência de um guia específico para aprovação de medicamentos transdérmicos, vem sendo ainda utilizado o *Guidance for Industry, Nonsterile Semisolid Dosage Forms*, de Maio de 1997 (SUPAC-SS CMC7). Trata de exigências para produção de formas farmacêuticas semissólidas não estéreis em escala e alteração pós-registro, abrangendo composição, fabricação e controles. Neste guia, são recomendados testes de liberação *in vitro* e testes de bioequivalência (LIEBENBERG *et al*, 2004; BAERT *et al*, 2009).

Segundo o SUPAC-SS, a variedade de testes físico-químicos comumente realizados em produtos semissólidos e seus componentes, como solubilidade, tamanho de partícula e forma cristalina do componente ativo, viscosidade e homogeneidade do produto, historicamente proporcionaram evidências razoáveis de desempenho consistente. Mais recentemente, testes de liberação *in vitro* vêm demonstrando liberação do componente ativo através da forma semissólida.

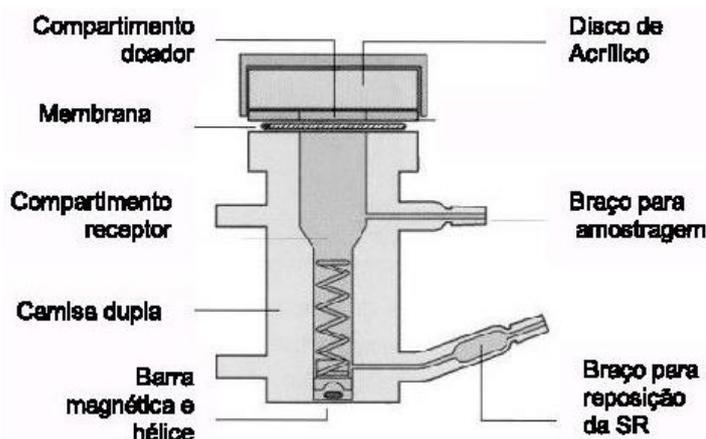
O guia complementa ainda que a taxa de liberação *in vitro* do fármaco pode refletir o efeito combinado de vários parâmetros físico-químicos, incluindo solubilidade e tamanho de partícula do fármaco e propriedades reológicas da forma farmacêutica. Na maioria dos casos, a avaliação de liberação *in vitro* pode ser empregada em testes de uniformidade, antes e depois de alterações em produtos. Sendo assim, a avaliação de liberação é recomendada pelo FDA para determinação de equivalência entre duas formulações após mudanças específicas, como fornecedor do fármaco, composição de excipientes e equipamentos empregados. Sua aplicação na determinação de uniformidade entre lotes e no desenvolvimento de formulações também é amplamente aceita.

No entanto, o SUPAC-SS expõe que, com as evidências disponíveis até o momento, a correlação de testes de liberação *in vitro* para o comportamento esperado *in vivo* para formas semissólidas não é ainda tão convincente quanto é o teste de dissolução *in vitro* em substituição à biodisponibilidade *in vivo* para sólidos orais. Sendo assim, para formas farmacêuticas semissólidas, além de testes de liberação *in vitro*, são indicados testes *in vivo* que demonstrem biodisponibilidade ou bioequivalência.

Teste de liberação *in vitro*, como este guia define, é um teste padrão que pode ser utilizado na caracterização de desempenho da forma semissólida em análise. Alterações na formulação ou nas propriedades termodinâmicas do fármaco possivelmente demonstram resultados diferentes em ensaios de liberação. O SUPAC-SS recomenda que os testes de liberação *in vitro* sejam realizados em sistemas de difusão como células verticais do tipo *Franz*, acomodando uma membrana artificial. O produto teste é acomodado na parte superior da membrana, no compartimento doador da célula de difusão, e um meio receptor é acomodado no compartimento receptor. A difusão do fármaco através

da membrana, a partir do produto semissólido, é monitorada por coletas sequenciais de amostras do meio receptor. A metodologia de análise *in vitro* do produto deve ser validada e a coleta de amostras pode ser automatizada. A figura 10 expõe representação do aparato da célula de *Franz*.

Figura 10: Representação Célula de *Franz*



Fonte: Pharmacopeial Forum, 2009

Torna-se importante salientar que, embora o SUPAC-SS recomende a utilização de células de *Franz* para avaliação de liberação, este teste foi introduzido na Farmacopeia Americana apenas em 2015, na USP 37. Até a USP 36 eram recomendados os aparatos 5, 6 e 7, aparatos estes pouco utilizados. Considerando toda literatura consultada até o momento, em nenhuma foram citados os aparatos 5 a 7 da USP, sendo vastamente citada a célula de *Franz*. Os aparatos 5 a 7 da USP estimam a liberação do fármaco sem utilização de membrana sintética, o dispositivo transdérmico deve ser apenas acomodado no referido aparato. Adicionalmente, o posicionamento do SLT no aparato 5, por exemplo, não é prático. Com a agitação do meio receptor ocorre o deslocamento do SLT a partir do disco e, desse modo, a face adesiva que deveria ficar plana durante o ensaio pode dobrar-se ou mesmo aderir nas paredes do recipiente.

O SLT deve ser acomodado sobre a membrana e este conjunto é acondicionado no compartimento doador, com usualmente 15 mm de diâmetro. O compartimento receptor deve ser preenchido com solução compatível com as condições fisiológicas, ficando os dois compartimentos, doador e receptor,

separados pela membrana. O experimento de liberação é conduzido em temperatura de  $32 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 4 a 5 horas. Para manter a condição *sink*, o meio receptor precisa possuir alta capacidade de dissolver e carrear o fármaco e não deve exceder 10% da concentração padrão para o fármaco ao final do teste (Pharmacopeial Forum, 2009).

Alíquotas amostradas do meio receptor podem ser analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou por outra metodologia analítica adequada. O gráfico gerado através da quantidade de fármaco liberado por unidade de área ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) contra a raiz quadrada do tempo deve produzir uma linha reta e sua inclinação representa a taxa de liberação do fármaco. Essa medida da taxa de liberação é formulação-específica e pode ser usada para monitorar a qualidade do produto (SUPAC-SS 1997).

O SUPAC-SS sugere alguns parâmetros a serem seguidos nos testes de liberação com as células de Franz, deixando claro que o fabricante tem possibilidade de livre busca a outras referências. Três referências do SUPAC-SS para ensaios com células de Franz são CORBO e colaboradores (1993), LI e RAHN (1993) e ZATZ (1995). Os parâmetros sugeridos pelo guia são os seguintes:

- a) sistema de difusão: célula de difusão, com compartimento de 15mm de diâmetro para amostra e 25mm de diâmetro total.
- b) Membrana sintética: membrana sintética inerte disponível comercialmente como polissulfona, acetato de celulose / ésteres de nitrato ou politetrafluoroetileno com 70  $\mu\text{m}$  espessura e com diâmetro apropriado, de modo que caiba no compartimento de amostra.
- c) Meio receptor: meio receptor apropriado, como tampão aquoso para fármacos hidrossolúveis ou meio hidro alcoólico para fármacos menos solúveis em água, ou outro meio com a devida justificativa.
- d) Número de amostras: replicadas, são recomendadas seis amostras, para determinar perfil de liberação de produtos dermatológicos.
- e) Aplicação das amostras: aproximadamente 300 mg de amostra a ser aplicada uniformemente na membrana e manter oclusão para prevenir

evaporação e mudanças de composição. Isso corresponde a uma condição de dose infinita.

- f) Tempo de amostragem: múltiplas amostragens (no mínimo cinco vezes) após determinado período de tempo, para gerar um adequado perfil de liberação. Os tempos de amostragem devem variar de acordo com a formulação. Uma alíquota da fase receptora é removida a cada intervalo de amostragem e substituída por outra alíquota de fase receptora, de modo que a superfície abaixo da membrana permaneça em contato com a fase receptora por todo o período do experimento.
- g) Análise da amostra: um procedimento analítico apropriado específico e validado deve ser utilizado para analisar as amostras e determinar a concentração do fármaco e a quantidade liberada.
- h) Avaliação de liberação *in vitro*: um gráfico da quantidade de fármaco liberado por unidade de área da membrana ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) *versus* a raiz quadrada do tempo deve produzir uma linha reta. A inclinação dessa reta (regressão) representa a proporção de liberação do produto. Uma típica interceptação do eixo X correspondendo a uma pequena fração de hora é uma característica normal dessas plotagens.

Um típico aparato de liberação *in vitro* possui seis células. O Pharmacopeial Forum e a USP 37, recomendam duas corridas com as seis células, e o resultado obtido com as doze células é utilizado na documentação de taxa de liberação. O método analítico escolhido para avaliação de liberação deve garantir especificidade, acuracidade, precisão, linearidade de curvas padrão, além de sensibilidade adequada, reprodutibilidade, estabilidade das amostras e boas condições de manuseio associadas ao método analítico (SUPAC-SS 1997).

De acordo com o SUPAC-SS, o projeto de estudo de bioequivalência é dependente da natureza do fármaco. Pode ser estudo comparativo em branco (Guidance for Industry, Topical Dermatologic Corticosteroids, 1995), ou experiência clínica comparativa, ou qualquer outro estudo de bioequivalência validado (por exemplo, estudo dermatofarmacocinético). Estudo clínico comparativo, normalmente multicêntrico, visa comparar a resposta de um grupo-teste de pacientes que recebem um novo tratamento (A) com a de um grupo-

controle que recebe um tratamento “padrão” já existente (B) ou placebo (RANG & DALE, 2001; FRIEDMAN & DIXON, 2012). A técnica da dermatofarmacocinética utiliza a concentração do fármaco no estrato córneo e folículo piloso como indicativo de permeação. A utilização desta abordagem como medida de bioequivalência ocorre pela observação de que o estrato córneo pode atuar como reservatório e que a concentração de fármaco nessa camada pode predizer a quantidade absorvida (ANDRADE *et al.*, 2013).

De acordo com o SUPAC-SS, o delineamento de testes de bioequivalência *in vivo* de formas farmacêuticas semissólidas depende da atividade farmacológica do fármaco e da forma farmacêutica. Embora mencione referência para avaliação de bioequivalência, este guia não faz referência a ensaios para avaliação de biodisponibilidade, mesmo avaliando-os como necessários para complementação dos resultados de liberação *in vitro*. Ao mesmo tempo, a referência fornecida para testes de bioequivalência (FDA, 1995) é de um produto tópico, ficando sem parâmetros os medicamentos transdérmicos.

#### **6.1.1.2 Skin Irritation and Sensitization Testing of Generic Transdermal Drug Product / 1999 (Irritação cutânea e testes de sensibilização de produtos transdérmicos genéricos)**

Este guia do FDA recomenda estudos que podem ser utilizados para testar irritação ou sensibilização da pele, durante o desenvolvimento de produtos transdérmicos. Esclarece que para avaliar de fato a equivalência de um medicamento transdérmico frente a um de referência, irritação e sensibilização da pele precisam ser determinados porque sua integridade afeta a absorção do fármaco a partir do sistema transdérmico.

Conforme o próprio guia esclarece, medicamentos transdérmicos têm propriedades que levam à irritação ou sensibilização da pele. No desenvolvimento desses produtos, eventos dermatológicos adversos são avaliados primeiramente em animais e, em seguida, são submetidos a avaliações seguras no contexto de estudos clínicos em larga escala. Os testes propostos visam detectar irritação e sensibilização sob condições de estresse máximo.

Os testes recomendados por este guia são relatados abaixo.

I. Recomendações para estudo de irritação cumulativa.

Realizado com 30 voluntários. O critério de exclusão é enfermidade dermatológica que possa interferir na avaliação e a duração do estudo é de 22 dias.

Delineamento: estudo controlado, randômico, repetitivo na aplicação do dispositivo transdérmico, comparando o dispositivo em teste com o inovador. Sistemas transdérmicos placebo e/ou alto e baixo controles de irritação (por exemplo, lauril sulfato de sódio 0,1% e solução salina 0,9%) podem ser incluídos.

Aplicação: o local de aplicação deve ser randomizado entre os pacientes. O sistema transdérmico deve ser aplicado por 23 horas +/- 1 hora, diariamente, por 21 dias, no mesmo local. A cada remoção do adesivo, o local deve ser avaliado para reação e o adesivo deve ser reaplicado.

A aplicação de um adesivo teste deve ser descontinuada em um determinado local, na ocorrência de uma reação séria predefinida. Nesse caso deve ser iniciada aplicação em outro local.

Avaliação: relata-se uma pontuação das reações cutâneas e da aderência do dispositivo por um observador a cada remoção do adesivo, usando uma escala apropriada.

Reações dermatológicas devem ser pontuadas utilizando uma escala que descreve intensidade de eritema, edema e outras condições indicativas de irritação. O percentual de aderência do dispositivo transdérmico deve ser relatado utilizando-se uma escala de 1 a 5 pontos.

Observações individuais diárias devem ser feitas, bem como tabulação apresentando percentuais de voluntários em cada estágio de reação cutânea e condição de aderência. Uma análise estatística dos resultados deve ser realizada.

## II. Recomendações para estudo de sensibilização.

Realizado com 200 voluntários. O critério de exclusão é enfermidade dermatológica que possa interferir na avaliação e a duração do estudo é de 6 semanas.

Delineamento: estudo controlado, randômico, com três produtos teste: o medicamento transdérmico teste, o inovador e o placebo.

Aplicação: o local de aplicação deve ser randomizado entre os pacientes. O estudo é dividido em três períodos sequenciais, conforme relatado abaixo.

- Fase de indução: a aplicação do adesivo deve ser realizada no mesmo local, três vezes na semana por três semanas, em um total de nove aplicações. Os adesivos devem permanecer no local por um total de 48 horas durante semana e por 72 horas nos finais de semana. Pontuações de reações cutâneas e aderência do adesivo devem ser realizadas a cada remoção do adesivo, utilizando escala apropriada. As mesmas escalas do teste anterior são empregadas.
- Fase de descanso: a fase de indução é seguida por uma fase de descanso de duas semanas, quando nenhuma aplicação é feita.
- Fase desafio: adesivos transdérmicos devem ser aplicados a novos locais por 48 horas. Avaliações de reações cutâneas são feitas com 30 minutos e 24, 48 e 72 horas após remoção do adesivo.

Observações individuais diárias devem ser realizadas, bem como tabulação apresentando percentuais de voluntários em cada estágio de reação cutânea e condição de aderência. Uma análise estatística dos resultados deve ser realizada.

Uma descrição de cada reação na fase desafio deve ser realizada, juntamente com a opinião do avaliador se tais reações são indicativos de sensibilização.

### III. Estudo Combinado.

Alternativamente, esses dois estudos podem ser combinados em um único. O estudo desenvolvido será idêntico ao relatado no item II, com exceção de que a aplicação do adesivo durante a fase de indução será realizada diariamente por 23 horas +/- 1 hora, durante 21 dias.

#### **6.1.1.3 *Residual Drug in Transdermal and Related Drug Delivery Systems / 2011* (Fármaco residual em Sistemas de Liberação Transdérmica e sistemas de liberação relacionados ao mesmo)**

Este terceiro guia do FDA fornece recomendações aos fabricantes de sistemas de liberação transdérmica, transmucosa e tópica no sentido de garantir menor impacto de resíduo gerado.

Os SLT, sistemas de liberação transmucosa (SLTM) e adesivos tópicos contêm uma quantidade de fármaco bem maior que aquela realmente disponível ao paciente. Esse excesso é necessário para facilitar a liberação a uma taxa constante para o paciente e, como consequência, leva a uma quantidade residual no sistema após término do uso.

De acordo com este guia do FDA, frequentemente as apresentações tópicas, transmucosas e transdérmicas retêm de 10 a 95% da quantidade inicial do fármaco após o final do período de uso. Isso leva a um risco potencial à segurança não apenas do paciente, mas também de outros membros da família, cuidadores e animais domésticos. Por exemplo, eventos adversos em pacientes que não removeram o dispositivo no período correto de tempo foram reportados, e são geralmente relativos a efeitos farmacológicos aumentados ou prolongados. Relatos de intoxicações e mortes são citados não apenas pelo guia, mas também por diversas literaturas científicas (WOKOVICH, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2012; ORAZIO & FISCHER, 2012).

Com o objetivo de reduzir tais riscos, este guia recomenda que seja realizado um projeto robusto do produto e desenvolvimento também focado no

cuidado a essa questão. Cita como exemplo para essa abordagem o *Quality by Design* (QbD), como descrito no guia ICH Q8(R2), *Pharmaceutical Development*.

O sistema QbD fornece uma abordagem científica, proativa e baseada em risco para processos farmacêuticos e desenvolvimento de produtos. Contem tópicos como objetivo de qualidade, atributos críticos de qualidade e estratégias de controle. Pode levar a um maior entendimento de melhoria contínua do produto através do seu ciclo de vida. Uma abordagem de QbD pode facilitar o desenvolvimento de SLT tanto para melhor utilização do paciente como nos cuidados pós-uso. Em particular, pode levar ao desenvolvimento de um produto capaz de dispensar a quantidade ideal de fármaco através da pele e ao mesmo tempo minimizar a quantidade remanescente. É aplicável tanto a novos produtos como na reformulação de produtos já existentes. Outro benefício da abordagem QbD é que o maior entendimento do produto e do processo de fabricação levará a uma melhor avaliação do impacto dos insumos e do processo de manufatura na qualidade do medicamento. Isso envolve atributos de qualidade e características de desempenho, como fluxo de permeação, adesão, reação no local de aplicação e características de segurança (fármaco residual, escoamento, rompimento do compartimento reservatório do fármaco) (Guidance for Industry, Q8 (R2), ICH 2009; MENNINI *et al.*, 2012; JANA *et al.*, 2014; KRISHNAIAH, *et al.*, 2014).

Um exemplo da aplicação do QbD é o estudo de Jana e colaboradores (2014) no desenvolvimento de uma formulação em gel de alta permeação de aceclofenaco. O polímero escolhido para formulação do gel foi o carbopol porque além de apresentar boas propriedades reológicas, oferece boas alternativas na incorporação de componente lipofílico. Como o aceclofenaco possui baixa solubilidade aquosa, a migração do mesmo através de uma base hidrofílica representa um desafio. A opção dos pesquisadores foi empregar crospovidona, frequentemente utilizado como desintegrante em comprimidos, como um carreador, de modo a incrementar o perfil de permeação do aceclofenaco, utilizando a abordagem do QbD. De acordo com os pesquisadores, um componente muito útil do QbD é o entendimento das variáveis envolvidas e de suas interações através de um conjunto de experimentos utilizando ferramentas estatísticas. No estudo em questão, a proposta de formulação de gel de carbopol

contendo uma dispersão sólida de aceclofenaco-crospovidona foi otimizada com a escolha ideal na quantidade de três componentes: crospovidona, trietanolamina e etanol. A estratégia do QbD permitiu uma seleção eficiente da melhor composição na formulação, empregando menor tempo e número de experimentos e, posteriormente, a melhor formulação seguiu para avaliação do desempenho farmacodinâmico *in vivo*.

Este guia do FDA recomenda que sejam incluídas justificativas científicas suficientes para a quantidade de fármaco residual no momento do registro. A justificativa deve incluir uma avaliação de segurança. O nível de informações na justificativa deve ser suficiente para demonstrar entendimento do produto e processo, e garantir que uma abordagem científica e baseada em risco foi realizada para minimizar a quantidade de fármaco ao menor nível possível após o uso.

#### **6.1.1.4 Bioavailability and Bioequivalence Studies Submitted in NDAs or INDs — General Considerations / 2014 (Estudos de biodisponibilidade e bioequivalência para novas aplicações de fármacos ou novos fármacos submetidos, considerações gerais)**

Este guia fornece recomendações a fabricantes e requerentes de registro que planejam incluir informações de biodisponibilidade e bioequivalência para produtos em desenvolvimento (*INDs, investigational new drug application*), no registro de produto com nova indicação terapêutica para determinado fármaco (*NDAs, new drug applications*), ou na renovação do registro de produtos, sendo também aplicável a medicamentos não orais capazes de atingir a corrente sanguínea. Logo, inclui sistemas transdérmicos e produtos aplicados em mucosas.

Este guia cita como fontes as regulamentações 21 CFR 320.24 a 21 CFR 320.29 do FDA, as quais indicam que os requerentes a registro devem utilizar os mais acurados, sensíveis e reprodutíveis métodos disponíveis para demonstração de biodisponibilidade (BD) e bioequivalência (BE) de um produto. Como mencionado em 21 CFR 320.24, métodos *in vitro* e *in vivo* podem ser utilizados

para avaliação de BD e para estabelecimento de BE. Isso inclui testes sequenciais do produto, como estudo farmacocinético, testes *in vitro* para prever biodisponibilidade *in vivo* (correlação *in vitro-in vivo*), estudo farmacodinâmico e apresentações de benefícios clínicos. Quando dados *in vivo* são indicados para demonstração de biodisponibilidade, é referenciado neste guia a regulamentação 21 CFR.25.

Conforme a regulamentação 21 CFR.25, o princípio básico de um estudo de biodisponibilidade é que nenhuma pesquisa desnecessária em indivíduos seja realizada. O estudo de BD é geralmente realizado em população adulta sadia, sob condições padronizadas. Em algumas situações, um estudo de biodisponibilidade em humanos pode ser realizado em indivíduos acometidos pela patologia a que se propõe o medicamento teste. Pacientes em estado crítico não devem ser incluídos em estudo de biodisponibilidade, a não ser que haja potenciais benefícios para o paciente.

Na avaliação de BD, devem ser avaliadas características farmacocinéticas essenciais do fármaco, como taxa e extensão da absorção, tempo de meia vida e taxa de excreção e/ou metabolismo. A proporcionalidade de dose deve ser estabelecida após administração de dose única e, em determinadas circunstâncias, após múltiplas doses. Como os dispositivos transdérmicos são produtos de liberação estendida, o propósito do estudo de BD é determinar se algumas condições são atendidas, como:

- atendimento à reivindicação de liberação estendida;
- estabelecimento do perfil de biodisponibilidade para o produto sem ocorrência de sobredosagem;
- avaliação se o desempenho do produto no estado de equilíbrio é equivalente ao obtido com o produto de liberação imediata disponível comercialmente;
- apresentação de desempenho farmacocinético consistente entre as doses.

De acordo com esse guia, para determinação de BE, testes de biodisponibilidade *in vivo* do produto devem ser comparados ao de referência, a

não ser que outra abordagem seja mais apropriada para razões científicas válidas.

Este guia faz uma observação que reitera a necessidade de uma metodologia harmonizada para avaliação *in vitro* de SLT, no sentido em que menciona que a correlação *in vitro-in vivo* é uma abordagem para descrever a relação entre atributos *in vitro* da forma farmacêutica (por exemplo, taxa ou extensão da liberação do fármaco) e uma resposta relevante *in vivo* (por exemplo, concentração plasmática ou quantidade de fármaco absorvido). Acrescenta que essa inter-relação facilita o desenvolvimento racional e avaliação da extensão de liberação da forma farmacêutica e, uma vez validada uma correlação *in vitro-in vivo*, o teste *in vitro* serve como substituto para testes de BD e BE, de ferramenta na etapa de formulação e é aceito como ensaio de dissolução/liberação do fármaco. No entanto, nesse contexto, o guia refere-se à correlação *in vitro-in vivo* estabelecida para sólidos orais com o teste de dissolução, e referencia outro guia do FDA para maiores esclarecimentos, *Guidance for Industry - Extended Release Oral Dosage Forms: Development, Evaluation, and Application of In Vitro/In Vivo Correlations - 1997*. Fica claro, portanto, a ausência de parâmetros para correlação *in vitro-in vivo* para os dispositivos transdérmicos.

Como parâmetro na elaboração de uma proposta regulatória para ANVISA, através do endereço eletrônico do FDA é possível acessar por fármaco e forma farmacêutica o modelo de relatório a ser gerado no teste de bioequivalência de determinado fármaco. Em tais relatórios nota-se o enfoque na avaliação farmacocinética, na avaliação de adesividade e na avaliação de irritação e sensibilização cutânea do produto.

#### **6.1.1.5 Farmacopeia Americana - USP**

Conforme definição da Farmacopeia Americana, USP 37, produtos aplicados topicamente são classificados em duas categorias gerais: aqueles aplicados com objetivo de ação local e aqueles aplicados para atingir efeitos sistêmicos após absorção através da pele até a circulação sanguínea. Ação local

pode ocorrer na superfície de aplicação (p.ex. estrato córneo, epiderme, derme, epitélio ocular) ou sob a mesma (p.ex. músculo, articulações).

De acordo com a USP, produtos aplicados topicamente podem incluir, entre outros, cremes, géis, linimentos, pastas, suspensões, loções, espumas, *sprays*, aerossóis, soluções e SLT, também mencionados como *patches*.

Procedimentos e critérios de aceitabilidade para testes de produtos de aplicação tópica podem ser divididos (1) naqueles de avaliação geral de atributos de qualidade e (2) naqueles de avaliação de desempenho.

#### **6.1.1.5.1 Testes de Avaliação Geral de Atributos de Qualidade e de Avaliação de Desempenho**

Primeiramente, testes de avaliação geral de atributos de qualidade incluem: descrição, identificação, doseamento, impurezas, propriedades físico-químicas, uniformidade de dose unitária, conteúdo de água, pH, viscosidade aparente, limite microbiano, conteúdo de agentes conservantes, conteúdo de antioxidante, esterilidade (se aplicável), e outros testes que podem ser específicos para determinado produto. Teste de desempenho também é requerido, de modo a assegurar liberação do fármaco e avaliar outros atributos que podem afetar a liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica.

Um teste de desempenho para produtos de aplicação tópica deve ser capaz de avaliar e medir a liberação do fármaco através da forma farmacêutica. Deve ser reprodutível e confiável e, embora não seja uma avaliação de biodisponibilidade, o teste de desempenho deve ser capaz de detectar alterações nas características de liberação do fármaco, que possuem potencial para alterar o efeito farmacológico esperado do ingrediente ativo.

Tais alterações podem estar relacionadas aos ingredientes ativo ou inertes da formulação, ao componente físico, a atributos físico-químicos da preparação final, variáveis do processo produtivo, transporte e estocagem, tempo e outras características que são críticas para qualidade (Pharmacopeial Forum, 2009).

Embora a maioria dos medicamentos para uso tópico esteja disponível na forma semissólida, líquida ou na forma de suspensão, SLT são dispositivos físicos aplicados na pele e variam em composição e método de fabricação. SLT liberam seus ingredientes farmacologicamente ativos através de diferentes mecanismos, podendo ser passivos ou ativos.

O dispositivo transdérmico promove liberação passiva quando esta ocorre exclusivamente em função do gradiente de concentração do fármaco, utilizando ou não agente promotor de permeação. A liberação ativa do fármaco ocorre com a utilização de novas tecnologias focadas na diminuição do efeito de barreira exercido pelo estrato córneo. Tais tecnologias são promissoras para o desenvolvimento de SLT contendo fármacos menos lipofílicos e com maior massa molar (PRAUSNITZ & LANGER, 2008; ALEXANDER *et al.*, 2012).

Exemplos de SLT ativos incluiriam, dentre outros, (PRAUSNITZ & LANGER, 2008; ALEXANDER *et al.*, 2012):

- iontoforese, quando se aplica pequena diferença de potencial elétrico (0,5 mA/cm<sup>3</sup> ou menos) de modo a facilitar movimentação de íons através da pele;
- sonoforese, quando a aplicação de ultrassom é capaz de aumentar a permeação de moléculas ativas, normalmente por cavitação (vaporização de um líquido devido à redução de pressão durante seu movimento a pressão constante), aumento de temperatura ou efeito mecânico (ocorrência de estresse devido à variação de pressão induzida pelo ultrassom);
- eletroporação, perturbação estrutural momentânea das bicamadas lipídicas da membrana pela aplicação de pulsos de alta voltagem por micro ou milissegundos, de modo a aumentar permeação cutânea;
- microagulhas, quando aplicadas na pele rompem o estrato córneo criando micro canais, aumentando acessibilidade ao fármaco.

A USP, bem como as demais farmacopeias, discorrem sobre testes relacionados a SLT passivos. Quando baseados em princípios científicos, testes de desempenho de produtos podem ser utilizados para propósitos pré e pós-

fabricação, como durante fase de pesquisa e desenvolvimento, controle de qualidade, demonstração de similaridade entre produtos ou demonstração de conformidade com guias FDA (por exemplo, aprovação e alterações pós-aprovação na forma farmacêutica).

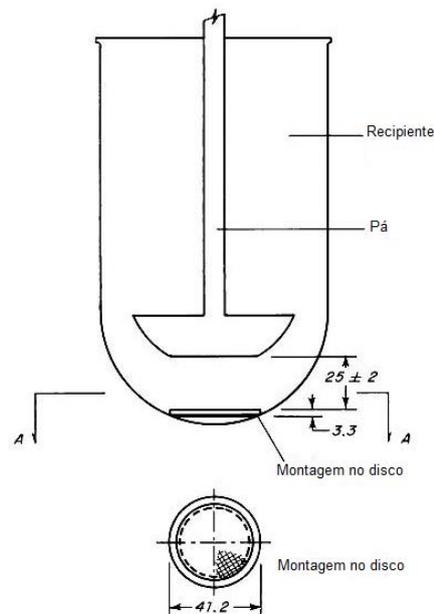
De acordo com a USP, testes de liberação *in vitro* de SLT podem ser conduzidos utilizando USP Aparatos 5, 6 ou 7. O Aparato 5, também conhecido como método das pás modificado, é mais simples e aplicável à maioria dos tipos, tamanhos e formas de sistemas de liberação transdérmica. A partir da USP 37 de 2015, após longo período no Pharmacopeial Forum (desde 2009), a célula de difusão vertical (aparato de Franz) passou a ser incluída como um teste de desempenho, também em capítulos gerais, a parte dos demais aparatos. A redação dos ensaios difere no sentido em que os aparatos 5, 6 e 7 são indicados na observância de um padrão de liberação conforme monografias individuais para os SLT, devendo ser empregado o aparato especificado na referida monografia. Já a célula de difusão vertical, conforme a USP 37, fornece informações a respeito do desempenho do produto e referencia o SUPAC-SS, já descrito. Essa atualização é consideravelmente importante, visto que os aparatos USP 5, 6 e 7 não são empregados na prática, mas sim o aparato de Franz, desde a etapa de desenvolvimento.

a) USP Aparato 5 - Método da pá sobre disco

Este método utiliza dispositivo semelhante ao aparato 2 descrito em dissolução, com adição de um disco de aço inox utilizado para manter o sistema transdérmico no fundo do recipiente. Outro dispositivo semelhante pode ser usado, contanto que não absorva, reaja ou interfira com o objeto a ser testado. A temperatura deve ser mantida em  $32 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Durante o teste, deve ser mantida distância de  $25 \pm 2\text{mm}$  entre a hélice da pá e a superfície do disco. O recipiente deve ser tampado durante o teste de modo a minimizar evaporação. A montagem do disco para segurar o sistema transdérmico tem o objetivo de minimizar qualquer volume morto entre o disco e o fundo do recipiente. A montagem do

disco mantém o sistema transdérnico plano e é posicionado de forma que a superfície fique paralela à extremidade da hélice.

Figura 11. USP Aparato 5



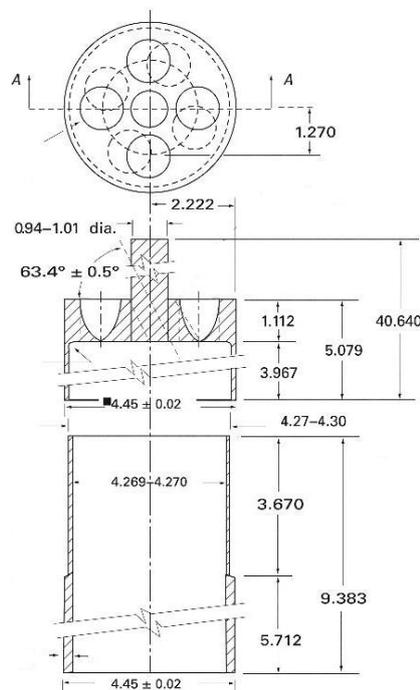
Fonte: USP 37

O volume apropriado do meio de dissolução é acondicionado no recipiente sem o disco e equilibrado a  $32 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . O sistema transdérnico é aplicado ao disco, garantindo que a superfície de liberação esteja a mais esticada possível. O sistema pode ser fixado ao disco com um adesivo adequado. Caso uma membrada seja utilizada para dar suporte ao sistema, deve ser aplicada de modo que não produza bolhas de ar entre a membrana e a superfície de liberação do fármaco. O disco deve ser posicionado montado com a amostra no fundo do recipiente, com a superfície de liberação do fármaco voltada para cima e paralela à hélice da pá e superfície do meio de dissolução. Em cada intervalo de tempo especificado, deve ser feita amostragem de uma zona intermediária entre a superfície do meio de dissolução e a hélice, não menos de a 1cm da parede do recipiente.

b) Aparato 6 – Método do cilindro rotatório

Este método utiliza o recipiente do Aparato 1, mas a haste e o cesto são substituídos por um cilindro rotatório de aço inox e a temperatura é mantida a  $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$  durante o teste. O SLT é acondicionado no cilindro, e este no aparato. Imediatamente inicia-se a rotação do cilindro à taxa descrita na monografia e, no intervalo de tempo especificado, uma quantidade do meio de dissolução é recolhida para análise.

Figura 12. USP Aparato 6

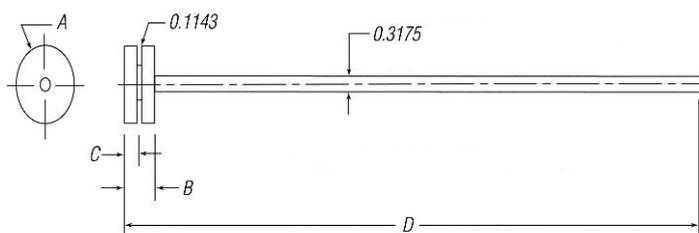


Fonte: USP 37

c) Aparato 7 – Método do suporte de retribuição

Este aparato consiste em um recipiente calibrado de vidro ou outro material inerte, um motor e um dispositivo montado para retornar o sistema verticalmente e para indicar horizontalmente. O reservatório com a solução fica parcialmente submerso em banho-maria, com temperatura controlada em  $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Nem o aparato nem o ambiente devem contribuir com movimento, agitação ou vibração ao suave trabalho vertical realizado pelo suporte com a amostra. O tamanho do compartimento para a amostra deve ser o indicado pela monografia.

**Figura 13. USP Aparato 7**



**Fonte: USP 37**

#### **6.1.1.5.2 Testes Específicos para Sistemas de Liberação Transdérmica**

De acordo com a USP 37, SLT são formulados com uma camada adesiva de modo a garantir íntimo contato com a pele e liberar a dose desejada de fármaco. Adesivos em SLT devem permitir fácil remoção da película protetora antes do uso, devem aderir apropriadamente à pele durante aplicação, manter adesão durante o tempo prescrito de uso e deve permitir fácil remoção do SLT no final do uso sem deixar resíduo, injuriar a pele ou causar outro efeito desagradável. Adicionalmente, adesivos devem ser capazes de manter o desempenho do SLT através do tempo de vida do produto.

#### **6.1.1.5.3 Testes de Adesão**

Três tipos de testes de adesão são geralmente utilizados: teste de remoção do adesivo, teste de remoção da película e teste de fixação. Critérios de aceitação são específicos de cada produto e definidos para garantir que a adesividade de cada lote do SLT esteja de acordo com o padrão definido e sejam consistentes com demais lotes, baseado em especificações de desenvolvimento ou avaliação estatística de múltiplos lotes durante tempo de vida do produto.

##### **A. Teste de remoção do adesivo.**

Esse teste mede a força requerida para remover um SLT aderido a uma superfície padrão, por exemplo aço inoxidável polido. O SLT é aplicado conforme orientação do fabricante e mantido a temperatura e tempo especificados. Posteriormente, o SLT é removido com instrumento que permita controle de ângulo (90 ou 180°), taxa de remoção (mm/min), e

registro da força de remoção. Esse procedimento é repetido utilizando no mínimo cinco amostras. O produto falha no teste se a força média de remoção ficar fora do limite aceitável determinado durante desenvolvimento e/ou baseado em dados estatísticos de múltiplos lotes durante tempo de vida do produto.

#### B. Teste de remoção da película.

Esse teste mede a força requerida para separar a película protetora da camada adesiva do SLT. O teste é realizado com amostra do produto final. A amostra é acondicionada utilizando procedimentos específicos (temperatura e tempo). Posteriormente a película é removida do SLT com instrumento que permita controle de ângulo (90 ou 180°), taxa de remoção (mm/min), e registro da força de remoção. O procedimento é repetido também utilizando no mínimo cinco amostras. O produto falha no teste se a força média de remoção ficar fora do limite aceitável determinado durante desenvolvimento e/ou baseado em dados estatísticos de múltiplos lotes durante tempo de vida do produto.

#### C. Teste de fixação.

Vários métodos de testes de fixação foram desenvolvidos, dentre os quais os dois seguintes. Caberá ao fabricante do SLT decidir qual é mais apropriado para cada produto.

1. Método da sonda de fixação. Este teste mede a força requerida para separar a ponta de uma sonda da camada adesiva do SLT. Esse teste utiliza um instrumento desenvolvido para criar uma ligação entre a ponta de uma sonda de aço inox de geometria definida e o SLT usando uma força controlada (baixa pressão) e condições específicas (taxa, tempo de contato, pressão no contato, temperatura). Posteriormente, enquanto controla a taxa de remoção da sonda, o teste avalia o perfil da força requerida para separar a ponta da sonda do SLT e a força máxima requerida para quebrar a ligação, fixação. Esse procedimento é repetido utilizando no mínimo cinco amostras. O produto falha no teste se o perfil de força e/ou fixação médio ficar fora do limite aceitável determinado durante

desenvolvimento e/ou baseado em dados estatísticos de múltiplos lotes durante tempo de vida do produto.

2. Método de rolagem da bola. Este teste avalia a distância percorrida por uma bola na superfície adesiva do SLT, sob condições definidas de temperatura, pressão, como um parâmetro dependente das propriedades de fixação da camada adesiva. Utiliza aparato desenvolvido para rolar uma bola, de material, peso, tamanho e superfície definidos, através de uma rampa em determinado ângulo e extensão, sobre a camada adesiva. A distância percorrida pela bola na camada adesiva é medida. O procedimento é repetido com no mínimo cinco amostras. O produto falha no teste se a distância média percorrida ficar fora de padrões aceitáveis determinados durante o desenvolvimento do produto e/ou baseado em dados estatísticos de múltiplos lotes durante tempo de vida do produto.

#### **6.1.1.5.4 Teste de Vazamento**

Esse teste é aplicável apenas em dispositivos do tipo reservatório, onde a tolerância a vazamentos é zero, em virtude do risco potencial de sobredosagem. Métodos de controle em processo para vazamentos ou potenciais vazamentos são necessários e requerem desenvolvimento considerável por parte dos fabricantes de SLT. A redação desse tópico na USP 37 pode significar a necessidade de um aprimoramento nas técnicas de controle em processo com foco em prevenção de vazamentos nesse tipo de dispositivo. No entanto, alguns testes em processo são sugeridos.

#### **Testes em Processo.**

Durante o processo de fabricação, a ocorrência de vazamentos ou escape do fármaco, bem como o potencial a essas ocorrências em virtude de perfuração ou corte, deve ser verificada. Falha na selagem também pode prejudicar o desempenho do dispositivo pela formação de bolhas de ar, escape de gel reservatório ou desalinhamento da camada protetora oclusiva e membrana

controladora de liberação. Não havendo implementada uma tecnologia analítica em processo automatizada, a USP 37 relaciona três testes em processo a serem realizados para identificação desses defeitos. Nesses três testes, o número de dispositivos transdérmicos examinados é definido de acordo com o tamanho do lote e as amostras devem ser escolhidas aleatoriamente.

#### A. Inspeção Visual.

Cada amostra deve ser meticulosamente examinada, visualizando possíveis cortes ou perfurações. Caso um dispositivo seja detectado com vazamento, o produto falha no teste.

#### B. Integridade da Selagem.

A selagem dos dispositivos transdérmicos deve ser testada ao estresse, para garantir que a aplicação de força não leva à abertura, o que pode ocasionar vazamento. Inicialmente, cada amostra deve ser meticulosamente inspecionada na procura por possíveis vazamentos. Posteriormente, deve ser acomodada em superfície plana e rígida, e submetida a um peso de 13,6kg, que deve permanecer no lugar por 2 minutos. Após remoção do peso, a amostra deve ser visualmente inspecionada novamente e o produto falha no teste se o número de dispositivos detectados com vazamento for superior ao limite determinado pelo fabricante.

#### C. Produto Embalado.

Os dispositivos transdérmicos podem sofrer injúria após acondicionamento em embalagem primária, como resultado da própria operação ou no processo de abertura da embalagem. Por isso, os dispositivos devem ser testados quanto à possibilidade de vazamento após acondicionados na embalagem primária. Após a remoção da embalagem, o dispositivo deve ser meticulosamente inspecionado. Cada amostra, tanto a camada protetora externa como a película protetora, deve ser uniformemente limpa com um swab umedecido em solvente. A superfície interna do sachê deve

também ser limpa com o swab. É realizada então análise do swab, tendo em vista detecção do fármaco. O produto falha no teste caso a quantidade total de fármaco detectado no dispositivo e no sachê for superior ao limite determinado pelo fabricante.

#### 6.1.1.5.5 Limite Microbiológico

De acordo com a USP, o limite microbiológico para SLT segue o de produtos não estéreis, bem como o limite microbiológico das substâncias utilizadas na formulação dos mesmos. Os critérios de aceitabilidade são baseados na contagem de microrganismos aeróbicos e contagem de fungos e leveduras. Quando um critério de aceitabilidade para qualidade microbiológica de SLT é recomendado, é interpretado da seguinte forma:

- $10^1$  UFC: contagem máxima aceitável = 20;
- $10^2$  UFC: contagem máxima aceitável = 200;
- $10^3$  UFC: contagem máxima aceitável = 2000, e assim por diante.

**Tabela 4. Critérios de aceitabilidade para controle de qualidade microbiológico de SLT.**

Administração	Contagem de microrganismos aeróbicos totais (cfu/g ou cfu/mL)	Contagem de fungos e leveduras totais (cfu/g or cfu/mL)	Microrganismo específico
SLT (limites para 1 patch, incluindo camada adesiva e camada protetora externa)	$10^2$	$10^1$	Ausência de <i>Staphylococcus aureus</i> (1 patch)
			Ausência de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 patch)

Fonte: USP 37

Já o critério de aceitabilidade para qualidade microbiológica das substâncias empregadas na fabricação de produtos farmacêuticos não estéreis, como os SLT, é:

- contagem de microrganismos aeróbicos totais (UFC/g ou UFC/mL) =  $10^3$ ,
- contagem de fungos e leveduras totais (UFC/g or UFC/mL) =  $10^2$ .

#### 6.1.1.6 Considerações FDA

Até o momento, o SUPAC SS é a fonte mais citada para regulamentação de SLT pelo FDA, citado inclusive pela USP 37. Embora possua uma abordagem generalizada para formas farmacêuticas semissólidas, juntamente com os outros guias do FDA e testes de qualidade abordados pela USP, fornece subsídios para o desenvolvimento de SLT. Falta ainda, no entanto, um enfoque no sentido de regulamentar testes *in vitro* de permeação, para que esses possam ser alternativas futuras na correlação *in vitro-in vivo*, possibilidade mencionada pelo guia sobre Estudos de Biodisponibilidade e Bioequivalência de 2014, com uma abordagem que pode ser complementar ao SUPAC SS sobre essas questões, mas ainda sem especificidade principalmente na avaliação de BE para SLT. A aplicabilidade dos testes *in vitro* de permeação seria não apenas para avaliação dos dispositivos transdérmicos, mas para formas farmacêuticas semissólidas, podendo avaliar toxicidade de produtos de ação local, já que o FDA opta por essa amplitude na abordagem.

Com relação ao que é recomendado para BE pelo FDA, realizando uma busca no sítio do FDA por “bioequivalence”, é possível obter uma tabela organizada por fármaco e forma farmacêutica do modelo de relatório a ser elaborado. Para SLT são sugeridos dois testes: 1º avaliação dos parâmetros farmacocinéticos e estudos de adesão; 2º estudos de irritação e sensibilização cutânea.

Além dessas duas referências regulatórias já mencionadas, SUPAC SS e guia sobre estudos de BD e BE, o FDA disponibiliza também um guia sobre Irritação Cutânea e Testes de Sensibilização para genéricos (1999) e um guia para Avaliação de Fármaco Residual (2011), que apresenta uma proposta de desenvolvimento baseado e no QbD, com o objetivo de alcançar a melhor formulação, em menor tempo e com maior segurança de utilização pelo usuário do dispositivo. Estes dois guias do FDA são específicos para os dispositivos transdérmicos e possuem uma abordagem detalhada sobre seus respectivos temas.

## 6.1.2 EMA

Dentro desse tópico, além dos textos de orientação regulatória do EMA, serão descritos também os guias da Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD). Os guias da OECD foram elaborados por especialistas após anos de discussão e contribuíram para o desenvolvimento e disseminação da técnica *in vitro* utilizada pela comunidade europeia, bem como pela comunidade científica de um modo geral. Os guias do EMA e da OECD serão apresentados juntos, na ordem cronológica em que foram elaborados.

### **6.1.2.1 EMA Note for Guidance on Modified Release Oral and Transdermal Dosage Forms: Section II - Pharmacokinetic and Clinical Evaluation, 1999 (Nota de Orientação para Liberação Oral Modificada e Sistemas Transdérmicos: Seção II – Avaliação Farmacocinética e Clínica)**

Em 1999 foi publicado pela Agência Europeia para Avaliação de Produtos Medicinais (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) uma nota de orientação para avaliação de medicamentos de liberação modificada, incluindo dispositivos transdérmicos, que deveria ser lida juntamente com a Diretiva 75/318/EEC (referente a padrões analíticos, fármaco-toxicológicos e clínicos, e protocolos relacionados a testes em produtos medicinais), bem como com outras diretrizes ICH. Enfim, um documento de cunho regulatório com abrangência a sistemas transdérmicos, um avanço no posicionamento dos SLT como alternativa às terapias orais tradicionais, principalmente comparando com a abordagem inespecífica do SUPAC-SS / 1997 (FDA).

O principal propósito dessa Nota de Orientação é a definição de estudos necessários à investigação de propriedades e efeitos do sistema de liberação no homem, e o estabelecimento de princípios gerais para o desenho, condução e avaliação desses estudos. Todavia, testes específicos a serem realizados devem ser definidos caso a caso, levando em consideração as propriedades intrínsecas do princípio ativo, a rota de administração, o tipo de sistema de liberação e a indicação terapêutica pretendida. Seguem adiante tópicos relevantes, não

identificados equivalentes nos guias do FDA, embora haja, mesmo que de forma inespecífica, abordagem equivalente na regulamentação sobre biodisponibilidade, 21 CFR.25.

- Como considerações gerais, dois itens são mencionados. Primeiro deve ser realizada uma análise racional para o desenvolvimento de formulação de liberação prolongada e de liberação retardada. O desenvolvimento dessas formulações deve ser baseado em uma necessidade clínica bem definida e em considerações fisiológicas, farmacodinâmicas e farmacocinéticas integradas. Em segundo lugar deve ser considerada a base da ação terapêutica prolongada, flutuações reduzidas nas concentrações plasmáticas do fármaco, o que possivelmente resulta em efeito mais contínuo e redução na incidência e/ou intensidade de eventos adversos.
- Aplicações para formas de liberação modificada de nova entidade química: se uma nova entidade química é desenvolvida em uma formulação de liberação modificada como produto inovador, o dossiê de submissão deve conter informações químicas e farmacêuticas, todos os dados necessários provenientes dos estudos pré-clínicos, bem como dados do estudo clínico completo.
- Aplicações para formulação de liberação modificada de um fármaco autorizado para formulações de liberação imediata: nesse caso, o requerente deve validar a nova formulação através da realização de testes químicos e farmacêuticos necessários, bem como estudos farmacocinéticos, farmacodinâmicos e clínicos apropriados. São requeridos biodisponibilidade, taxa e extensão da absorção (ASC,  $C_{máx}$  e  $C_{mín}$ ), flutuação, variabilidade interindividual e proporcionalidade de dose. Quando a taxa de absorção, juntamente com a concentração do fármaco, determina a resposta farmacológica, uma investigação dos efeitos farmacodinâmicos ligados à eficácia é recomendada.

- Testes toxicológicos, farmacológicos ou clínicos para definição de propriedades intrínsecas do fármaco não são requeridos, assumindo uma exposição total sistêmica similar para fármaco e metabólitos, considerando formulações de liberação modificada e liberação imediata. Caso nova indicação terapêutica do fármaco seja reivindicada para a formulação de liberação modificada, estudos clínicos para a nova indicação terapêutica devem ser conduzidos. No caso de novo componente não ativo, estudos de segurança em animais devem ser realizados ou a falta dos mesmos deve ser justificada.

O objetivo da formulação de liberação modificada é, em vários casos, atingir uma exposição total similar (área sob a curva) do fármaco/metabólito da formulação de liberação imediata. Isso não significa que deva ser administrada a mesma dose. Formulações de liberação modificada possuem uma biodisponibilidade diferente daquela exibida na formulação de liberação imediata.

#### A. Estudos de biodisponibilidade.

O propósito desses estudos é o de caracterizar a formulação de liberação modificada *in vivo* pela investigação:

- da taxa e extensão da absorção;
- flutuações na concentração do fármaco;
- variabilidade na farmacocinética a partir da formulação;
- proporcionalidade da dose;
- fatores que influenciam o desempenho da formulação de liberação modificada;
- o risco de características de liberação inesperadas (p.ex. sobredosagem, *dose dumping*).

Os estudos são baseados nas avaliações da concentração do fármaco e/ou metabólito, ou, ocasionalmente, em conjunção com a determinação de um preciso efeito farmacodinâmico. O produto de liberação imediata do mesmo fármaco

(mesmo sal) comercializado deve servir como produto de referência e os estudos devem ser conduzidos em voluntários sadios ou em pacientes. Sempre que doses múltiplas são aplicadas, deve ser demonstrado que a concentração plasmática constante foi obtida.

#### A.1) Taxa e extensão da absorção, flutuação.

A taxa e extensão da absorção a partir de uma forma de liberação modificada deve ser avaliada pela comparação com a formulação de liberação imediata, seguindo dose única e doses repetidas. Flutuações na concentração do fármaco devem ser estudadas através da administração de doses repetidas. Deve ser demonstrado que a formulação de liberação modificada possui as características de liberação reivindicadas, produz flutuação menor ou similar e exposição sistêmica total comparável ao produto de liberação imediata. Os parâmetros farmacocinéticos de interesse são ASC,  $C_{max}$  e  $C_{min}$  ou outros que reflitam a flutuação.

#### A.2) Variabilidade.

A variabilidade interindividual dos parâmetros farmacocinéticos de interesse deve ser comparada entre as formulações de liberação modificada e de liberação imediata. A variabilidade demonstrada para a liberação modificada não deve exceder a da liberação imediata. Com relação ao local de aplicação, como no caso de dispositivos transdérmicos pode ocorrer diferença na absorção em diferentes áreas de aplicação, a investigação da absorção do fármaco não deve ser limitada a uma área do corpo.

#### A.3) Proporcionalidade de dose.

Sempre que houver várias concentrações, algumas investigações sobre a proporcionalidade devem ser feitas. A documentação requerida deve ser baseada nas propriedades farmacocinéticas intrínsecas do fármaco. Caso o fármaco demonstre farmacocinética linear, será necessário estabelecer exposição total similar entre a formulação de liberação modificada e a formulação de liberação

imediate após administração de múltiplas doses. Caso o fármaco demonstre farmacocinética não linear (na faixa de concentração plasmática terapêutica), será necessário comparar a formulação de liberação modificada e a formulação de liberação imediata com a maior e a menor dose, após múltiplas doses. Adicionalmente, em ambos os casos, a proporcionalidade de dose para diferentes concentrações da formulação de liberação modificada deve ser adequadamente posicionada.

#### A.4) Estudos farmacodinâmicos.

Quando a taxa de absorção, juntamente com a concentração plasmática do fármaco, determina a resposta farmacológica, uma investigação dos efeitos farmacodinâmicos ligados à eficácia terapêutica é recomendado, um estudo farmacocinético/farmacodinâmico é empregado.

#### B. Estudos terapêuticos.

Em geral será necessária a condução de estudos clínicos controlados. No entanto, em casos raros, se a avaliação da relação dose-efeito indicar que existe uma relação bem definida entre concentração plasmática do fármaco e do metabólito ativo, os ensaios clínicos podem ser considerados desnecessários.

##### B.1) Objetivo e princípios.

Estudos terapêuticos são necessários na maioria dos casos quando:

- a existência de níveis equivalentes do efeito obtido com a formulação de liberação imediata não pode ser assumida da base de dados farmacocinéticos, ou dados farmacocinético-farmacodinâmicos sozinhos;
- existem complicações, como tolerância farmacodinâmica;
- há diferente atividade terapêutica e/ou diferentes reações adversas possíveis;

Estudos comparativos devem ser adequadamente desenhados e conduzidos para avaliar a intensidade e duração do efeito terapêutico, reações

adversas e possivelmente posicionar a nova terapia entre as outras já disponíveis no mercado para a mesma indicação. Na avaliação de segurança e eficácia de certas classes terapêuticas é necessário medir os efeitos da formulação durante um período de 24 horas e, particularmente, no intervalo entre as doses.

#### B.2) Estudos relacionados com a eficácia.

Ensaio para revelar a não inferioridade (equivalência): estudos clínicos que comparam a formulação de liberação modificada e a formulação de liberação imediata, baseado na mesma exposição ao fármaco, podem ser planejados para demonstrar a não inferioridade na eficácia terapêutica.

Ensaio que revela superioridade: quando superioridade é requerida, deve ser provada com estudos clínicos.

#### B.3) Estudos específicos relacionados à segurança.

Caso um requerimento seja feito por menores reações adversas da formulação de liberação modificada, esse fato deve ser fundamentado. Esses ensaios devem ser planejados e conduzidos como estudos comparativos, onde o produto de liberação imediata deve ser fornecido utilizando a mesma quantidade total do tratamento controle. No caso de estudos com sistemas de liberação transdérmica, é necessária a investigação de tolerabilidade cutânea, irritação e sensibilização, bem como potencial de produzir reação fototóxica.

- Aplicações para uma formulação de liberação modificada essencialmente similar a outro já comercializado. Esta Nota de Orientação ressalta e recomendação para estudos de bioequivalência de similares para as seguintes condições:
  - para produtos de administração oral, para comparação de duas formulações (teste x referência) da mesma forma farmacêutica;
  - para sistemas de liberação transdérmica.

Caso dois produtos difiram em excipientes controladores de liberação ou mecanismo, mas mostrem perfis de dissolução similares *in vitro*, utilizando testes

discriminatórios e com as mesmas características de liberação, esses produtos podem ser considerados como pertencentes à mesma categoria de forma farmacêutica e são considerados similares após estabelecimento de bioequivalência.

Caso dois produtos difiram em seus excipientes controladores de liberação ou mecanismo, e mostrem diferentes perfis de dissolução *in vitro*, então testes clínicos devem ser considerados, com exceção de raros casos em que a bioequivalência pode ser demonstrada.

No caso de dispositivos transdérmicos, alguns aspectos devem ser considerados.

- A bioequivalência de um sistema de liberação transdérmica em comparação com o produto inovador deve ser avaliada após única dose, bem como após doses múltiplas.
- O local de aplicação para o estudo de bioequivalência deve ser o mesmo local para ambos os produtos, teste e referência.
- Quando a autorização comercial para múltiplas doses é requerida, o estudo de bioequivalência pode ser desenvolvido com a dose mais alta, contanto que haja exata proporcionalidade nas doses (quando a dose é proporcional à área efetiva do adesivo e se a menor dose pode ser considerada como área parcial da maior dose) e mesma composição; e se houver um teste de liberação *in vitro* aceitável.
- Como os SLT são frequentemente produtos variáveis, é recomendado avaliar a variabilidade intraindividual e, em particular, determinar a influência do desempenho biofarmacêutico nessa variabilidade pela condução de um estudo replicado.
- Caso sejam comparados SLT com diferentes mecanismos (reservatório x matriz adesiva), um estudo replicado é requerido para investigar essa característica pela interação da formulação.
- O produto deve demonstrar o mesmo ou menor grau de irritação local, adesividade na pele, fototoxicidade potencial, sensibilização, e efeitos adversos sistêmicos similares, comparado ao produto de referência.

- A bioequivalência é avaliada utilizando as mesmas características principais (ASC,  $C_{max}$  e  $C_{min}$ ) e procedimentos estatísticos das formulações de liberação prolongada.

### 6.1.2.2 Guias OECD

A Comissão Europeia de Proteção à Saúde e ao Consumidor publicou em 2000 um documento de orientação sobre absorção dérmica, o *Guidance Document on Dermal Absorption*, cuja última revisão é de 2004. O foco foi a orientação quanto à avaliação de toxicidade provocada por produtos agroquímicos, uma vez que considera que a via tópica é a principal via exposta pelos usuários desses produtos. Este documento revisado faz referência aos Guias OECD 428 (métodos *in vitro* de absorção) e OECD 427 (métodos *in vivo* de absorção) como ferramentas a serem utilizadas na avaliação de segurança dos pesticidas (EUROPEAN COMMISSION, 2004). De fato, a partir de 2004, esses guias passaram a ser mais citados de um modo geral em trabalhos científicos que abordam permeação. Em estudos *in vitro* realizados na Comunidade Europeia é possível verificar referências aos guias OECD (ESCRIBANO *et al.*, 2003; VAN DE SANDT *et al.*, 2004; SCHREIBER *et al.*, 2005; WILLIAMS, 2006; BOONEN *et al.*, 2012; PINEAU *et al.*, 2012).

Os guias OECD não possuem efeitos legais. O guia OECD 428 para testes *in vitro* propõe em sua introdução que pode ser combinado com o Guia OECD 427 ou pode ser conduzido sozinho. Recomenda também que o Guia OECD para Condução de Estudos de Absorção em Pele (*OECD Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies*) seja consultado para orientar o projeto de estudo baseado no OECD 428. O objetivo do OECD 428 foi facilitar a escolha de procedimentos apropriados para garantir a confiança dos resultados obtidos (OECD 428, 2004; OECD 427, 2004; OECD Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies, 2004).

### 6.1.2.2.1 OECD 428

Este guia foi elaborado a fim de fornecer informações sobre absorção de uma substância teste aplicada sobre pele excisada. Alega que métodos *in vitro* avaliam a difusão de compostos químicos na pele e através da pele até um fluido reservatório, e pode utilizar pele não viável para medir apenas difusão e pele fresca e metabolicamente ativa para medir difusão e metabolismo cutâneo. É admitido que estudos formais de validação para métodos *in vitro* não foram realizados, tendo os especialistas da OECD considerado em 1999 que já havia dados suficientes que amparassem a proposta do guia. Segundo a OECD, as propriedades de permeabilidade da pele são preservadas após a excisão do corpo porque a principal barreira à permeação é o estrato córneo, camada de células não viáveis, e o transporte ativo através da pele não foi identificado.

O guia 428 descreve basicamente em que consiste o ensaio de permeação e relaciona em linhas gerais os parâmetros empregados, como aparato de difusão, pré-requisitos para o fluido receptor, escolha da pele (admitindo utilização de pele humana e animal), aplicação na pele, temperatura da solução receptora e tempo de ensaio. Para maior detalhamento dos parâmetros este guia faz referência ao Guia OECD para Condução de Estudos de Absorção em Pele (*OECD Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies, 2004*), como mencionado anteriormente.

O relatório do teste deve abranger requerimentos estipulados em protocolos, incluindo uma justificativa para o teste, e precisariam abordar os seguintes aspectos:

- características da substância teste;
- características da formulação;
- parâmetros adotados para o ensaio;
- resultados;
- discussão dos resultados;
- conclusões.

#### **6.1.2.2.2 OECD 427**

Este guia foi elaborado porque, embora a absorção cutânea *in vitro* possa ser apropriada em diversas circunstâncias, há situações em que apenas um estudo *in vivo* pode fornecer os dados necessários. A substância teste, marcada radioativamente de preferência, é aplicada na pele do animal teste em uma ou mais doses, de modo a gerar uma condição representativa da condição de uso em humanos.

Cada estudo envolverá normalmente vários grupos de animais (usualmente ratos ou camundongos) a serem expostos à preparação teste. Um grupo é morto logo após o período de exposição. Outros grupos serão mortos em determinados intervalos após término da exposição à preparação. Ao final do tempo de amostragem, os animais remanescentes serão mortos, o sangue será coletado para análise, a área de aplicação será removida e a carcaça será analisada para detecção de material não excretado.

Com relação à extrapolação dos resultados em animais para o esperado em humanos, Williams (2006) fez uma observação pertinente. Caso estudos *in vitro* com pele de rato sejam bem desenhados e bem padronizados, poderão prever a absorção através da pele de rato *in vivo*. Similarmente, utilizando pele humana nos ensaios *in vitro*, estes poderão prever a absorção através da pele humana após exposição *in vivo* e a aceitação de dados *in vitro* pela OECD sob tais condições seriam bem vindas.

#### **6.1.2.2.3 OECD *Guidance Document for the conduct of Skin Absorption Studies, 2004* (Documento de Orientação para a Condução de Estudos de Absorção na Pele).**

Este documento de orientação foi elaborado a fim de detalhar os procedimentos para a condução de ensaios *in vivo* e *in vitro* de permeação mencionados pelos Guias OECD 427 e OECD 428, respectivamente. É

interessante observar que nenhum dos Guias OECD fazem referência a ensaios de liberação.

Salienta que ensaios *in vivo* em animais vêm sendo tradicionalmente usados para avaliar absorção cutânea com propósitos regulatórios porque possuem algumas vantagens com relação aos testes *in vitro*, incluindo informações a respeito da cinética do fármaco, bem como de seu metabolismo. As desvantagens dos ensaios *in vivo* incluem a utilização de animais vivos, a necessidade de utilização do material radioativo para a confiabilidade dos resultados, a dificuldade em determinar os primeiros estágios da absorção e diferenças na permeabilidade da pele do animal mais utilizado (rato) e da pele humana. Sendo a pele animal mais permeável, pode superestimar a absorção percutânea humana. As vantagens dos ensaios *in vitro* seriam que podem ser aplicados igualmente bem com pele de origem humana ou de outras espécies, avaliações em replicada podem ser mais facilmente conduzidas, animais vivos não são usados, condições pretendidas de exposição são estudadas e o impacto da pele danificada na absorção pode ser avaliado evitando questões éticas. Adicionalmente, o método *in vitro* pode ser realizado para materiais não radioativos, que são extensivamente metabolizados. Uma limitação associada à técnica *in vitro* é que as condições *sink* do fluxo sanguíneo periférico não podem ser reproduzidas completamente. No entanto, a absorção através da pele é principalmente um processo passivo e estudos conduzidos utilizando condições experimentais apropriadas produziram dados para diversas substâncias químicas, demonstrando a utilidade desse método.

Este Guia comenta que autoridades regulatórias nacionais podem ter preferências diferentes para estudos *in vivo* e/ou *in vitro* de absorção, e que então a escolha de qual(is) método(s) utilizar deve estar alinhada com os requerimentos da entidade regulatória em questão. O uso de métodos *in vivo* e/ou *in vitro* dependerá da situação. Dados *in vivo* podem ser utilizados sozinhos. Entretanto, pode ser possível, dependendo da intenção de uso da substância teste, a condução apenas de estudo *in vitro* para uma primeira avaliação de penetração na pele. Quando uma avaliação mais detalhada da absorção dérmica é requerida, dados *in vitro* e *in vivo* são fornecidos juntos. Recomenda ainda contactar a

autoridade regulatória apropriada para confirmar o protocolo mais relevante e adequado antes de conduzir os estudos de permeação.

Para demonstrar o desempenho e confiança do sistema teste de determinado laboratório, este guia recomenda que sejam comparados os resultados de permeação obtidos com agentes químicos de referência do laboratório em questão e da literatura. Essa questão pode ser satisfeita testando uma substância referência apropriada (preferencialmente de lipofilicidade próxima a da substância teste) ou fornecendo dados compatíveis com os da literatura de referência para determinado número de substâncias de diferentes lipofilicidades. Seriam exemplos típicos que foram extensivamente estudados *in vivo* e *in vitro*, como cafeína ( $\log P_{OA}$  0,01), ácido benzoico ( $\log P_{OA}$  1,83) e testosterona ( $\log P_{OA}$  3,32).

Embora este Guia da OECD seja elucidativo sobre a condução dos ensaios de permeação, fazendo inclusive um paralelo entre ensaios *in vivo* e *in vitro*, não é ainda um protocolo fechado e harmonizado. Sugere as opções mais apropriadas para os parâmetros empregados e relaciona da seguinte forma os critérios a serem observados nos ensaios de permeação:

- ❖ princípio do teste (condução do ensaio *in vivo* e/ou *in vitro*);
- ❖ descrição dos métodos:
  - ♦ seleção da espécie animal (*in vivo* e *in vitro*);
  - ♦ condições de alimentação (*in vivo*);
  - ♦ preparo dos animais (*in vivo*);
  - ♦ aparato de difusão (*in vitro*);
  - ♦ escolha do fluido receptor (*in vitro*);
  - ♦ manutenção da atividade metabólica (*in vitro*);
  - ♦ preparo da pele (*in vitro*);
  - ♦ preparo da formulação (*in vivo* e *in vitro*);
  - ♦ aplicação sobre a pele (*in vivo* e *in vitro*);
  - ♦ condições de oclusão (*in vivo* e *in vitro*);
  - ♦ temperatura (*in vitro*);
  - ♦ duração da exposição e amostragem (*in vivo* e *in vitro*);

- ♦ análise (*in vivo* e *in vitro*).

A respeito dos ensaios *in vitro*, as considerações mais relevantes do Guia são as relacionadas a seguir.

- Pele utilizada: pele de algumas espécies de mamíferos pode ser empregada, incluindo pele humana. Modelos de pele humana reconstituída podem ser utilizados se dados obtidos com substâncias químicas de referência forem consistentes com os disponíveis na literatura. Em todo caso, a pele mais relevante é a pele humana. Com relação ao tipo de membrana preparada (membrana de estrato córneo, epiderme, epiderme + derme) não há definição de melhor escolha, devendo ser demonstrada a integridade da membrana. É sugerido o congelamento da pele a uma temperatura limite de -20°C.
- Aparato de difusão: aparato de difusão vertical ou de fluxo através da célula. Ele deve possuir um compartimento doador e um receptor entre os quais é posicionada a membrana e o compartimento receptor deve permitir controle de temperatura, homogeneização da solução receptora e fácil amostragem.
- Fluido receptor: deve ser compatível com a membrana e permitir solubilidade da substância teste. Para compostos solúveis em água, utilização usual de soluções salinas de pH 7,4. Para estudos com substâncias lipofílicas, a solução receptora pode conter solvente orgânico, como etanol ou polietilenoglicol. Outra possibilidade seria a adição de albumina sérica bovina.
- Temperatura: 32±1°C, temperatura da membrana.
- Tempo de exposição: deve refletir as condições normais de uso, permitindo a quantificação da substância permeada que seria obtida na exposição humana. Preferencialmente não exceder 24h, de modo a não comprometer a viabilidade da membrana, com a possibilidade de estimar a permeação posterior quantificando o fármaco retido no estrato córneo.

### **6.1.2.3 EMA *Guideline on Quality of Transdermal Patches, 2012* (Diretriz sobre Qualidade de Dispositivos Transdérmicos, 2012).**

Esta instrução do EMA de 2012 define os requisitos para autorização de comercialização de dispositivos transdérmicos, incluindo medicamentos genéricos. É fornecido um guia sobre requerimentos de qualidade para descrição, desenvolvimento, manufatura, caracterização de excipientes, controle de qualidade, embalagem e estabilidade de SLT. Em particular, testes de desempenho *in vitro* com respeito à liberação do fármaco, adesão e permeação na pele são discutidos, juntamente com sua relação com o desempenho clínico e *in vivo*. Portanto, pela sua abrangência, demonstra ser equivalente ao SUPAC-SS do FDA, que aborda química, fabricação e controles. A diferença é que, por fornecer diretrizes específicas aos dispositivos transdérmicos, abrange também requisitos inerentes apenas aos mesmos, como propriedades adesivas. Este requisito de qualidade pode influenciar diretamente a permeação do fármaco e segurança do dispositivo e não é mencionado no SUPAC-SS, embora esteja presente como teste na USP.

É exposto nesta instrução que o desenvolvimento do SLT deve fornecer respostas relacionadas aos atributos críticos de qualidade, como liberação *in vitro*, permeação *in vitro*, propriedades de adesão/coesão e propriedades viscoelásticas, bem como fatores que influenciam a facilidade de aplicação e duração do uso. Deve ser demonstrada concordância com os requerimentos presentes na Farmacopeia Européia para adesivos transdérmicos. Caso seja apropriado e haja um método alternativo de melhor poder discriminativo comparado a Farmacopeia, este pode ser empregado.

Com relação à liberação *in vitro*, é citado que o objetivo do teste é a avaliação da taxa e extensão da liberação do fármaco a partir do dispositivo e, que, embora não seja um modelo para desempenho *in vivo*, é um atributo crítico de qualidade a ser especificado para o produto. O perfil de liberação do fármaco a partir do produto deve ser caracterizado e estabelecido a partir de lotes clínicos para os quais foram demonstrados eficácia satisfatória. Esses resultados devem ser utilizados no suporte de especificações dos limites de liberação *in vitro* do

produto e, portanto, fornecer garantia de que lotes futuros serão de qualidade similar aos lotes dos estudos clínicos.

Uma diferença de abordagem entre este documento regulatório do EMA e o SUPAC-SS para ensaios de liberação *in vitro* é que o segundo sugere alguns parâmetros a serem seguidos nos testes de liberação com as células de Franz (por exemplo, sistema de difusão, temperatura, meio receptor), embora deixe claro que o fabricante tem possibilidade de livre busca a outras referências. Já o EMA solicita que seja fornecido um sumário de desenvolvimento do teste de dissolução para determinado produto, em que o dispositivo transdérmico foi testado sob várias condições (meio receptor, pH, aparato, agitação, etc). Deve ser escolhida a condição teste adequada e mais discriminatória. No caso da escolha de um tampão com baixa capacidade de tamponamento, o pH deve ser controlado durante o teste de modo a evitar a influência do fármaco dissolvido e/ou excipiente nas condições de dissolução durante o período de teste.

Já com relação aos estudos de permeação *in vitro*, não mencionados pelo SUPAC-SS, essa diretriz do EMA esclarece que não se correlacionam diretamente com a permeação *in vivo*, mas são considerados uma medida valiosa para a qualidade, refletindo a atividade termodinâmica do fármaco no produto. Menciona que os estudos de permeação *in vitro* devem ser empregados principalmente no direcionamento e avaliação na etapa de desenvolvimento do produto e otimização da formulação, não sendo atualmente adequado na rotina de controle de qualidade de lotes. No entanto, sugere que estudos de permeação *in vitro* podem ser incluídos em protocolos de estudo de estabilidade, mesmo que em frequência reduzida, para fornecer dados de desempenho do produto sob as condições de armazenagem indicadas. Orientações a respeito da condução do teste *in vitro* de permeação são dadas no anexo I da diretriz e seguem as recomendações dos Guias OECD.

A avaliação das propriedades adesivas deve ser realizada com testes *in vitro* e *in vivo*. O teste *in vitro* deve ser conduzido de modo a avaliar a remoção da película adesiva e a adesão e remoção do produto a partir de uma superfície definida (similarmente ao relatado pela USP). No caso de testes *in vivo*, um

estudo deve ser conduzido tendo como referência o período de uso proposto. Desempenho de adesão satisfatória dos lotes de estudos clínicos seriam um requerimento para qualquer conclusão clínica válida que atinja um número representativo de voluntários (sadios e pacientes).

O foco desse estudo de adesão *in vivo* é diferente daquele abordado pelo Guia *Skin Irritation and Sensitization Testing of Generic Transdermal Drug Product* (FDA, 1999 - Irritação cutânea e testes de sensibilização de produtos transdérmicos genéricos), cujo objetivo é a avaliação da sensibilização induzida pelo dispositivo, muitas vezes provocada pelo material adesivo. Conforme o anexo II da diretriz do EMA, a investigação do desempenho adesivo deve ser incluída como um componente dos estudos clínicos farmacocinéticos e de eficácia do produto (dose única e múltiplas doses), ou pode ser um estudo independente com voluntários sadios e pacientes. Caso o produto apresente várias doses, no mínimo o maior e o menor dispositivo devem ser testados. Os elementos de avaliação devem incluir:

- locais de aplicação;
- aplicação do dispositivo transdérmico;
- formação de resíduo na película protetora após remoção da mesma e na pele após remoção do dispositivo;
- o percentual de dispositivos transdérmicos aderidos a pele (mais de 95%, mais de 90%, mais de 85%, mais de 80% e mais de 75%);
- fluxo frio, como formação de anel escuro em torno do dispositivo durante o uso, movimentação ou deslocamento do dispositivo na pele, enrugamento;
- robustez do produto em rotinas humanas usuais, como resistência a lavagem na superfície, duchas, saunas, uso de hidratantes, riscos de remoção durante exercícios físicos ou sono, possibilidade de transferência a pessoas próximas.

Com relação aos dados farmacocinéticos do produto, deve ser fornecido um sumário dos estudos, bem como dados de biodisponibilidade. Com relação às estratégias de controle, o laboratório de desenvolvimento deve estabelecer correlações entre as propriedades farmacocinéticas do produto e eficácia clínica

(incluindo adesão *in vivo*), com taxa de liberação *in vitro*, permeação *in vitro* e estudos de adesão *in vitro*, sempre que possível.

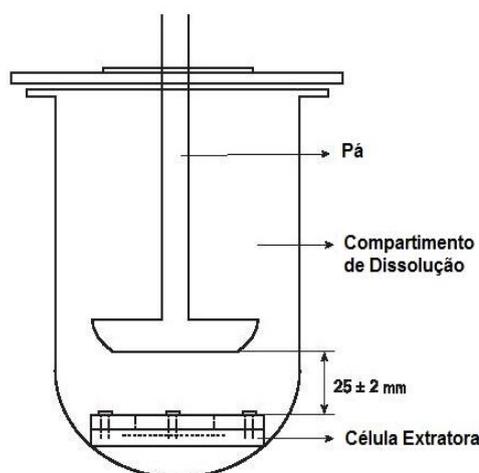
Esta diretriz do EMA também abrange requerimentos necessários ao desenvolvimento e fabricação de dispositivos genéricos, não diferindo muito do que é aplicado ao produto de referência, devendo o genérico apresentar dados clínicos e de qualidade comparativos aos do medicamento de referência. Essa abordagem é similar à do primeiro guia de orientação descrito sobre o EMA na página 69 desta dissertação, *Note for Guidance on Modified Release Oral and Transdermal Dosage Forms: Section II (Pharmacokinetic and Clinical Evaluation, 1999)*.

#### **6.1.2.4 Farmacopeia Européia**

Comparando a Farmacopeia Européia 8.3 de 2015 com a USP 37 de 2015, nenhum teste adicional é referido. Ao contrário, faltam na Farmacopéia Européia testes específicos para sistemas de liberação transdérmica, como os testes de adesão e testes em processo relacionados pela USP.

Mesmo o teste de desempenho, que na USP 37 é o teste de liberação sugerido no aparato de difusão vertical, na Farmacopéia Européia ainda não é incluído o Aparato de Franz para avaliação de liberação do fármaco. Pela Farmacopeia Européia, são indicados os aparatos: Pá sobre Disco, equivalente ao Aparato 5 da USP; Célula Extratora, aparato fechado inerte contendo o dispositivo aplicado sobre uma membrana (de material sintético poroso e inerte, por exemplo, celulose ou silicones) e acondicionado dentro do aparato da Pá sobre Disco; e o Cilindro Rotatório, equivalente ao Aparato 6 da USP. O aparato contendo a célula extratora é representado abaixo e os parâmetros empregados são semelhantes aos do Aparato 5 USP.

**Figura 14. Aparato com Célula Extratora**



**Fonte: Farmacopeia Europeia 8.3**

### **6.1.2.5 Farmacopeia Britânica**

Para dispositivos transdérmicos, a Farmacopéia Britânica segue a Farmacopéia Europeia.

### **6.1.2.6 Considerações EMA**

Comparando as duas diretrizes do EMA, a Nota de Orientação para Liberação Oral Modificada e Sistemas Transdérmicos (1999) e a Diretriz sobre Qualidade de Dispositivos Transdérmicos (2012), é possível observar que a segunda complementa a primeira. A Nota de Orientação representa um passo importante no sentido em que oferece uma base de comparação com o produto de liberação imediata e fornece parâmetros para condução de estudos clínicos. Uma consideração importante dessa Nota de Orientação é a constatação de que sempre que a taxa de absorção do fármaco juntamente com a concentração plasmática do mesmo forem determinantes para a resposta farmacológica, o estudo farmacodinâmico é necessário juntamente com o farmacocinético. O FDA menciona apenas avaliação farmacocinética para os SLT.

A Diretriz sobre Qualidade abrange exigências regulatórias desde o desenvolvimento do SLT, aborda quanto a requisitos básicos de qualidade e

relaciona parâmetros para avaliação nos ensaios clínicos que não incluem apenas dados farmacocinéticos e farmacodinâmicos do dispositivo, mas também informações inerentes à adesividade, robustez e sensibilidade induzida. Paralelamente, na Diretriz sobre Qualidade, é possível notar a contribuição dos guias OECD quanto ao posicionamento dos ensaios *in vitro* de permeação nos aspectos regulatórios de avaliação do dispositivo. Portanto, a conjunção dessas duas ferramentas do EMA demonstra englobar aspectos fundamentais na avaliação dos SLT.

### **6.1.3 ANVISA**

No Brasil, não há ainda uma legislação específica que atenda a exigências de fabricação para dispositivos transdérmicos. Mais surpreendente ainda é que, mesmo para medicamentos de uso tópico, semissólidos não estéreis, ainda não há uma regulamentação específica que norteie sua avaliação de segurança e eficácia.

Esse fato contrasta com a legislação nacional vigente para cosméticos, produtos também aplicados topicamente e com ampla abordagem regulatória, além de um Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos, de 2012. Este Guia é bastante didático e faz referência aos Guias oficiais da OECD. (RDC 79/2000; RDC 162/2001; RDC 215/2005; RDC 211/2005; RDC 332/2005; RDC 48/2013).

Portanto, na ausência de uma legislação específica para SLT detectada após buscas em “Visa Legis” e, posteriormente, em “Saúde Legis”, dentro do portal eletrônico da ANVISA, para tais medicamentos não há outro caminho para registro a seguir senão a observância da legislação relatada a seguir.

#### **6.1.3.1 RDC 60 de 10 de Outubro de 2014**

Esta norma atualiza e harmoniza os critérios técnicos de qualidade, segurança e eficácia para o registro de medicamentos classificados como novos,

genéricos e similares. Substitui as Resoluções RDC nº 136/2003, a RDC nº 16/2007 e a RDC nº 17/2007, que tratam dos regulamentos técnicos para o registro de medicamentos novos, genéricos e similares respectivamente, e reestrutura o relatório técnico a ser apresentado segundo o *Common Technical Document (CTD)* do *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)* (ANVISA.GOV.BR). Este Regulamento aplica-se a todos os medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, com exceção dos regidos por legislação específica vigente.

Quanto aos requisitos específicos para o registro de medicamento, são descritas as exigências para registro de nova forma farmacêutica, sendo, portanto, os dispositivos transdérmicos enquadrados nesta resolução quando na ocasião da solicitação de registro, por não possuírem ainda uma legislação específica e por ser invariavelmente o SLT uma nova forma farmacêutica de um fármaco que muito provavelmente já possui uma apresentação oral e/ou injetável.

Com relação a medidas antecedentes ao registro, a RDC 60/2014 esclarece que os estudos clínicos devem ser conduzidos conforme a legislação vigente e a aprovação prévia do desenvolvimento clínico em território nacional é obrigatória para a utilização dos resultados para fins de registro. Essa redação para medidas antecedentes ao registro ficou bastante suscinta quando comparada a RDC 136, vigente até outubro de 2014, que dizia o seguinte:

- no caso de produto novo nacional, apresentar protocolos de pesquisas clínicas e resultados do andamento destas pesquisas de acordo com a legislação vigente;
- no caso de produto novo importado que venha a fazer estudo clínico fase III no Brasil, apresentar protocolo de pesquisa e resultado de seu andamento de acordo com a legislação vigente;
- no caso em que a fase III venha a ser realizada com produto novo fabricado no País, apresentar previamente notificação para a produção de

## lotes piloto de acordo com o GUIA PARA A NOTIFICAÇÃO DE LOTES PILOTO DE MEDICAMENTOS.

Desde 2003, com a publicação da Resolução RDC 134/2003 e Resolução RDC 133/2003, os medicamentos similares deveriam apresentar testes de biodisponibilidade relativa e equivalência farmacêutica para obtenção do registro, de modo a comprovar que o medicamento similar possui o mesmo comportamento no organismo (*in vivo*), como possui as mesmas características de qualidade (*in vitro*) do medicamento de referência. Portanto, tomando como base a tabela 1 da página 32, que relaciona os medicamentos transdérmicos atualmente comercializados no Brasil, sendo o Fentanest<sup>®</sup> do Laboratório Cristália um medicamento similar, necessitou realizar os testes de biodisponibilidade relativa e equivalência farmacêutica. Já as multinacionais, com tão poucos dispositivos no mercado brasileiro, difícil imaginar que invistam em plantas nas suas respectivas fábricas aqui localizadas. Possivelmente realizaram a fase III do estudo clínico no Brasil e importam em embalagem primária, para atender ao segundo item acima.

Como requisitos gerais da atual resolução em vigor, a RDC 60/2014, são exigidos itens referentes à documentação administrativa, como cópia do Certificado de Boas Práticas de Fabricação (CBPF), e de documentação técnica da qualidade, harmonizado com ICH, inerente ao insumo farmacêutico ativo (IFA), desenvolvimento da formulação, produto acabado e embalagem. Quanto ao desenvolvimento da formulação, deve ser fornecido um resumo sobre o mesmo, levando em consideração a via de administração, bem como sistema de embalagem. Ainda com relação ao desenvolvimento, devem ser também fornecidos documentos com os detalhes de fabricação, caracterização e controles, com referência bibliográfica para suportar os dados de segurança para excipientes usados pela primeira vez em um medicamento ou em uma nova via de administração. No caso de excesso de ativo, este deve ser justificado. Como avaliação de desempenho do produto acabado, é mencionado gráfico do perfil de dissolução, quando aplicável. Transpondo para a realidade dos dispositivos transdérmicos, pode-se interpretar como gráfico do perfil de liberação.

Com relação aos itens específicos exigidos para concessão de registro, no caso de SLT é importante fazer uma leitura conjunta da seção para nova forma farmacêutica e da seção para nova concentração. Sendo assim, são necessários:

- ♦ justificativa técnica;
- ♦ relatório de segurança e eficácia, contendo os resultados de estudos clínicos de fase III (e fase I e II, se aplicável), e;
- ♦ Plano de Farmacovigilância adequado à nova forma farmacêutica/concentração.

Em cumprimento ao segundo item relatado acima, os estudos clínicos de fase II e III podem ser substituídos por prova de biodisponibilidade relativa quando o medicamento proposto estiver dentro da faixa terapêutica aprovada.

A RDC 60/2014 menciona que em situações específicas relacionadas a segurança, um Plano de Minimização de Risco poderá ser exigido de forma adicional ao Plano de Farmacovigilância. Esse texto não estava presente na RDC 136/2003, e demonstra relevância no caso dos SLT. Em produtos para os quais não surjam preocupações especiais, a farmacovigilância de rotina deve ser suficiente para o monitoramento da segurança pós-registro, sem a necessidade de medidas adicionais (por exemplo, estudos de segurança), sendo apenas necessária a apresentação de um Plano de Farmacovigilância. Entretanto, para os produtos com riscos identificados importantes, riscos potenciais significativos ou informações críticas anteriormente desconhecidas, medidas adicionais elaboradas para tratar dessas preocupações devem ser consideradas em um Plano de Minimização de Risco. O Plano de Minimização de Risco tem por finalidade o gerenciamento de novos riscos identificados no período pós-registro ou mesmo o acompanhamento de riscos conhecidos em populações anteriormente estudadas. Tem também como finalidade a aplicação em situações em que o produto terá um provável uso que não foi estudado adequadamente no período pré-registro (GUIA DE FARMACOVIGILÂNCIA, ANVISA, 2009). Portanto, o Plano de Minimização de Risco demonstra ser condizente com as recomendações de segurança dos SLT propostas pelo guia *Residual Drug in Transdermal and Related Drug Delivery Systems / 2011* do FDA, o qual propõe

um estudo robusto baseado no QbD, no sentido de garantir maior segurança e menor impacto de resíduo gerado.

Quanto aos requisitos específicos dessa RDC para registro de medicamento genérico e similar, além de documentação administrativa e documentação técnica da qualidade, é necessária a inclusão de certificado de equivalência farmacêutica, certificado do perfil de dissolução, relatório de desenvolvimento do método de dissolução e estudo de bioequivalência. Ambos os testes, equivalência farmacêutica e bioequivalência, devem ser realizados obrigatoriamente com o mesmo lote.

#### **6.1.3.2 Lei 11.794 de 8 de Outubro de 2008**

Também conhecida como Lei Arouca, a Lei 11.794 de 2008 reflete uma tendência mundial no sentido de promover aceitação científica e regulatória de testes livre de animais. Lança como objetivo para os testes *in vivo* utilizando animais o mesmo proposto pelo EMA com os 3 R's (*Refinement, Reduction, Replacement*), ou seja, Refinar, Reduzir ou Substituir.

Esta Lei estabelece que a criação e a utilização de animais em atividades educacionais são restritas a estabelecimentos de ensino superior e de educação profissional técnica. No caso de finalidade didática, alerta que sempre que possível, as práticas de ensino deverão ser fotografadas ou filmadas, de forma a permitir a reprodução para ilustração de práticas futuras, evitando-se a repetição desnecessária. Tem como principal objetivo zelar pela ética na utilização de animais em pesquisa e ensino observando sempre os anseios da comunidade científica e, sempre que possível, reduzir o número de animais, evitar seu sofrimento e estresse, bem como estimular sua substituição por métodos alternativos. A utilização de animais em pesquisa científica fica restrita a instituições credenciadas pelas Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAS)

Uma grande contribuição da Lei 11.794 foi a criação do CONCEA, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. O CONCEA é presidido pelo Ministro de Estado da Ciência, Tecnologia e Inovação e integrado

por representantes do CNPq, Ministério da Educação, Ministério do Meio Ambiente, Ministério da Saúde, Federação Nacional da Indústria Farmacêutica, representantes das sociedades protetoras de animais, dentre outros, constituindo, portanto, uma entidade democrática com finalidade de aprimorar técnicas alternativas à utilização animal. Em 2014 foram publicadas duas importantes Resoluções do CONCEA, Resoluções Normativas 17 e 18, quanto ao reconhecimento dos testes *in vitro*, relatadas a seguir.

#### **6.1.3.3 Resolução Normativa nº 17 de 3 de Julho de 2014 - CONCEA**

Esta Resolução Normativa dispõe sobre o reconhecimento no país de métodos alternativos validados que tenham por finalidade a redução, a substituição ou o refinamento do uso de animais em atividades de pesquisa, nos termos da Lei nº 11.794.

As instituições interessadas em validar métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa deverão estar associadas à Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA), criada por meio da Portaria nº 491, de 03 de julho de 2012, do Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI). O objetivo do RENAMA é disponibilizar, através de uma rede de laboratórios associados, as metodologias preconizadas pela OECD, contribuindo para a garantia da qualidade dos serviços ofertados ao setor produtivo. O CONCEA poderá reconhecer o método alternativo validado por Centros para Validação ou por estudos colaborativos internacionais publicados em compêndios oficiais. E, após o reconhecimento pelo CONCEA do método alternativo, fica estabelecido o prazo de até 5 (cinco) anos como limite para a substituição obrigatória do método original pelo método alternativo.

#### **6.1.3.4 Resolução Normativa nº 18 de 24 de Setembro de 2014 - CONCEA**

Esta resolução apresenta os métodos alternativos reconhecidos pelo CONCEA, nos termos da Resolução Normativa nº 17 publicada meses antes. Estão relacionados nesta resolução 17 (dezessete) métodos alternativos

agrupados por teste, sendo todos guias da OECD, e indicando para avaliação de absorção cutânea o guia OECD 428.

Portanto, a criação do CONCEA e do RENAMA, este último subordinado ao primeiro, são passos significativos no estabelecimento de padrões de qualidade e segurança, necessários ao desenvolvimento de produtos transdérmicos. Não apenas fornecem ferramentas a ensaios pré-clínicos como equipara exigências regulatórias dos ensaios *in vitro* com o padrão europeu.

#### **6.1.3.5 Farmacopeia Brasileira**

A apresentação transdérmica não é mencionada na Farmacopéia Brasileira.

#### **6.1.3.6 Considerações ANVISA**

A RDC 60/2014 fornece mais ferramentas quanto à avaliação de segurança que a predecessora RDC 136/2003, já que orienta quanto a elaboração de um Plano de Minimização de Riscos, bem como relaciona mais requisitos técnicos de qualidade, abrangendo todos os estágios de fabricação, harmonizando com padrões técnicos internacionais do ICH. Apesar disso, faltam ainda recomendações de segurança mais específicas, como aquelas inerentes à adesividade e sensibilidade cutânea.

Comparando a diretriz do EMA *Note for Guidance on Modified Release Oral and Transdermal Dosage Forms*, de 1999, e a RCD 60/2014 que fornece subsídios a respeito do registro de novas formas farmacêuticas, ambas demonstram alguma similaridade já que a última admite a substituição dos ensaios clínicos II e III por prova de biodisponibilidade relativa, quando o medicamento proposto estiver dentro da faixa terapêutica aprovada. Nesse sentido, seria possível comparar parâmetros farmacocinéticos básicos (por exemplo, ASC,  $C_{máx}$  e  $C_{mín}$ ) do dispositivo transdérmico com o obtido no medicamento de liberação imediata, condizente para avaliação de BE. No

entanto, a RDC 60/2014 não menciona estudo farmacodinâmico, complementar à avaliação de biodisponibilidade para fármaco já disponível em outra forma farmacêutica.

Por outro lado, no Brasil, ainda há carência de delineamentos específicos que demonstrem mais clareza e suporte legal quanto ao desenvolvimento desses dispositivos. As Resoluções Normativas 17 e 18 de 2014 podem representar um importante passo no reconhecimento dos ensaios *in vitro* de permeação e, por isso, faz-se necessário um olhar atento sobre os parâmetros utilizados nesses testes. O aprimoramento dos requisitos legais que envolvem, de um modo geral, os medicamentos transdérmicos, pode auxiliar no desenvolvimento de novos dispositivos com fármacos ainda não disponíveis no mercado nacional.

## **6.2 Ensaios *in vitro* de permeação**

Atualmente, existe uma crescente demanda para informação de taxa, grau e rota de penetração de compostos através da pele humana. Primeiramente, existe uma necessidade de aperfeiçoar a distribuição de fármacos nas respectivas camadas de interesse da pele para um máximo efeito terapêutico. Em segundo lugar, as vias tópicas e transdérmicas tornaram-se alternativas às vias de administração tradicionais. Por último, riscos toxicológicos oriundos de produtos de uso frequente, como agroquímicos, cosméticos, produtos de limpeza e produtos farmacêuticos, levam à necessidade de uma melhor avaliação da permeação de produtos químicos através da pele (VERMA *et al.*, 2003; WILLIAMS, 2006).

Técnicas *in vitro* para avaliação de permeação são amplamente utilizadas no meio acadêmico e atualmente existe uma tendência crescente para que os dados obtidos *in vitro* sejam incluídos na submissão ao registro, sozinhos ou acompanhados dos dados obtidos nos testes *in vivo*. De certa forma, as técnicas *in vitro* possuem vantagens quando comparadas aos testes *in vivo*, como por exemplo, a possibilidade de quantificação do fármaco permeado de forma direta no aparato, já que a amostragem é feita no compartimento abaixo da pele. Isso

contrasta com a maioria dos métodos de avaliação *in vivo*, que requerem uma quantificação em nível sistêmico do fármaco permeante (BRAIN, WALTERS e WATKINSON, 2002).

Na Europa e mais recentemente no Brasil com a Lei Arouca, existe a recomendação para utilização de técnica *in vitro* de permeação com o objetivo de reduzir o uso de animais em ensaios *in vivo* (European Commission, 2002; ECB, 2003; Lei 11.794, 2008). Uma área de particular importância atualmente na Europa envolve avaliação e registro de produtos que requerem dados de toxicidade para 30.000 agentes químicos. Não é apropriada a realização de extensos estudos *in vivo* em roedores, indo de encontro a questões éticas da União Européia (WILLIAMS, 2006).

É evidente que no desenvolvimento de um produto transdérmico torna-se necessário a realização dos dois ensaios. O ensaio de liberação avalia o grau de afinidade do fármaco com o dispositivo, com o objetivo de verificar se o mesmo não ficará retido ou se é conveniente algum ajuste na formulação. Para este ensaio é empregada uma membrana sintética inerte, como de polissulfona, ésteres de celulose (nitrato e acetato) ou politetrafluoroetileno. O ensaio de permeação avalia a quantidade de fármaco que atingiria a circulação sanguínea. Na avaliação de permeação é empregada membrana natural obtida a partir de pele humana, pele de animais ou ainda equivalentes de pele humana. Logo, na tentativa de estabelecer uma correlação *in vitro* - *in vivo* para dispositivos transdérmicos, é fundamental a determinação de uma técnica harmonizada a ser empregada nos ensaios *in vitro* de permeação.

A maioria dos métodos de avaliação de permeação *in vitro* utiliza células de difusão vertical do tipo Franz, como pode ser verificado nas referências da Tabela 5. O desafio, no entanto, é a padronização das condições experimentais ideais, como membrana empregada e o tratamento feito nessa membrana, solução receptora utilizada, temperatura de manutenção do compartimento receptor e tempo de ensaio são alguns parâmetros críticos que podem influenciar no resultado final.

Tendo em vista o objetivo de identificar e comparar as condições mais praticadas de ensaio, estudos referenciados sobre o tema foram analisados e seus parâmetros no ensaio *in vitro* de permeação forneceram subsídios para a elaboração da Tabela 5. As membranas sintéticas mencionadas a seguir em ensaios *in vitro* de permeação são diferentes daquelas utilizadas em ensaios de liberação, uma vez que necessitam mimetizar a pele humana e serão descritas melhor posteriormente. Todos os ensaios descritos na tabela a seguir foram conduzidos em células de Franz e considerações relevantes sobre cada parâmetro do ensaio de permeação são descritas na sequência.

**Tabela 5. Parâmetros aplicados no ensaio de permeação *in vitro*.**

Autor	Aparato / dimensões	Origem da membrana	Camadas da pele	Meio receptor	Tempo de ensaio	T (°C)
Kreilgaard <i>et al.</i> , 2000	Crown Glass Sommerville, EUA (1,8cm <sup>2</sup> a/d; 7mL v/r)	rato Wistar	epiderme + derme	NaCl 0,09M + KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,05M, pH 7,4	28h	32°C
Schmook <i>et al.</i> , 2001	n/i (2,54cm <sup>2</sup> a/d; 5,8 v/r)	cadáver humano, pele de porco, pele de rato e 2 membranas sintéticas	pele de rato – epiderme + derme; pele de porco e humana - epiderme	tampão fosfato / etanol 3:1	48h	32°C
Verma <i>et al.</i> , 2003	Gauer Glas Püttlingen, Alemanha (3,14cm <sup>2</sup> a/d; 12mL v/r)	humana, de abdoinoplastia	epiderme + derme	tampão fosfato pH 7,4	14h	37 ± 1°C
Peltola <i>et al.</i> , 2003	Crown Glass Sommerville, EUA (0,64cm <sup>2</sup> a/d; 5mL v/r)	cadáver humano	epiderme	10% (p/v) solução ciclodextrina HβCD	70h	n/i
Shim <i>et al.</i> , 2003	Lab Fine Instruments Korea (n/i)	porquinho da índia albino Hartley, porquinho-da-índia IAF/HA-hrBR sem pelo e camundongo SKH1 sem pelo.	n/i	tampão fosfato	18h	37°C
Dreher <i>et al.</i> , 2004	Aparato feito no lab. (9mm a/d; 4,9mL v/r)	humana, de abdoinoplastia e redução de mama	epiderme + derme	5% de PEG 4000 em tampão HEPES pH 6,8	n/i	37°C

<b>Autor</b>	<b>Aparato / dimensões</b>	<b>Origem da membrana</b>	<b>Camadas da pele</b>	<b>Meio receptor</b>	<b>Tempo de ensaio</b>	<b>T (°C)</b>
Chen <i>et al.</i> , 2004	TK-12A Shangai, China (2,8cm <sup>2</sup> a/d; 7mL v/r)	camundongo	epiderme + derme	etanol / água 4:1 (v/v)	24h	37°C
Fang <i>et al.</i> , 2001	n/i (0,785cm <sup>2</sup> a/d; 10mL v/r)	camundongo	n/i	tampão citrato- fosfato pH 7,4	48h	37°C
Paolino <i>et al.</i> 2005	n/i (0,75cm <sup>2</sup> a/d; 4,75mL v/r)	humana, de abdominoplastia	epiderme	tampão fosfato pH 7,4	24h	n/i
Jain <i>et al.</i> 2002	n/i (0,785cm <sup>2</sup> a/d)	rato Sprague- Dawley	epiderme + derme	tampão fosfato c/ azida sódica (conserv.) 0,01% (p/v)	24h	37°C
El-Kattan <i>et al.</i> , 2001	n/i (0,64cm <sup>2</sup> a/d; 5,1mL v/r)	camundongo SKH1 sem pelo	n/i	Tampão fosfato, pH 7,2, c/ 0,1% de formaldeído (conserv.)	24h	37 ± 0,5°C
Chen <i>et al.</i> , 2006	n/i (2,8cm <sup>2</sup> a/d; 7mL v/r)	orelha de porco	n/i	tampão fosfato	8h	37°C
Escribano <i>et al.</i> , 2003	FDC 400 Crown Glass Sommerville, EUA (1,86cm <sup>2</sup> a/d; 11m L v/r)	humana, de abdominoplastia	epiderme + derme	tampão fosfato pH 7,4	24h	32 ± 0,5°C
Gwak <i>et al.</i> , 2002	Sistema de permeação lado-a-lado (n/i)	camundongo sem pelo	epiderme + derme	tampão fosfato c/ 3mL de PEG 400 a 40%	24h	32°C
Zhao <i>et al.</i> , 2006	TP-4 Nanjing, China (1,54cm <sup>2</sup> a/d; 16mL v/r)	camundongo	epiderme + derme	tampão fosfato	12h	37 ± 0,5°C
Manosroi <i>et al.</i> , 2004	Crown Bio Sommerville, EUA (1,77cm <sup>2</sup> a/d; 12mL v/r)	rato wistar	epiderme + derme	etanol / água 1:1 (v/v)	24h	37 ± 1°C
Nokhodchi <i>et al.</i> , 2002	n/i (5,3cm <sup>2</sup> a/d; 25mL v/r)	rato wistar	epiderme + derme	tampão fosfato pH 7,4	24h	37 ± 0,5°C
Fang <i>et al.</i> , 2006	n/i (1,54cm <sup>2</sup> a/d; 10mL v/r)	camundongo Balb/c-nu	n/i	tampão citrato- fosfato pH 7,4	12h	37°C

<b>Autor</b>	<b>Aparato / dimensões</b>	<b>Origem da membrana</b>	<b>Camadas da pele</b>	<b>Meio receptor</b>	<b>Tempo de ensaio</b>	<b>T (°C)</b>
Akomeah <i>et al.</i> , 2003	n/i (0,6 ± 0,05cm <sup>2</sup> a/d; 1,8 ± 0,2mL v/r)	humana, de abdominoplastia	epiderme	tampão fosfato pH 7,4	4h	23°C, 30°C, 37°C e 45°C
Bonina <i>et al.</i> , 1994	n/i	membrana sintética	membrana sintética de éster de celulose posicionada entre 2 membranas de silicone	tampão fosfato pH 7,4 c/ 0,9% (p/v) de NaCl	8h	n/i
Kanikkannan e Singh, 2002	Permegear Riegelsville, EUA (0,636cm <sup>2</sup> a/d; 5mL v/r)	rato CD <sup>®</sup> (SD) hrBi sem pelo	n/i	tampão fosfato pH 7,4	48h	37 ± 1°C
Badran <i>et al.</i> , 2009	n/i (3,14cm <sup>2</sup> a/d; 15mL v/r)	humana, de abdominoplastia	epiderme + derme	tampão fosfato pH 7,4	6h	32 ± 1°C
Jaskari <i>et al.</i> , 1999	Crown Glass Sommerville, EUA (0,64cm <sup>2</sup> a/d; 3mL v/r)	cadáver humano	n/i	tampão HEPES – fosfato pH 7,4	24h	25°C
Lopes <i>et al.</i> , 2004	Hanson Chatsworth EUA (1,77cm <sup>2</sup> a/d; 7mL v/r)	orelha de porco	epiderme + derme	tampão fosfato com 10% de etanol	12h	37 ± 0,5°C
Chen <i>et al.</i> , 2007	TK-12A Shangai, China (2,8cm <sup>2</sup> a/d; 7mL v/r)	camundongo	epiderme + derme	tampão fosfato	8h	37°C
Vicentini <i>et al.</i> , 2008	Hanson Chatsworth EUA (1,77cm <sup>2</sup> a/d; 7mL v/r)	orelha de porco	epiderme + derme	tampão fosfato pH 7,2 com Tween 20 <sup>®</sup> 0,5%	12h	37 ± 0,5°C
Amnuakit <i>et al.</i> , 2004	n/i (3,14cm <sup>2</sup> a/d; 18mL v/r)	rato wistar	epiderme + derme	tampão fosfato	12h	37°C
Narishetty e Panchagnula, 2005	n/i (0,63cm <sup>2</sup> a/d; 4,5mL v/r)	cadáver humano	epiderme + derme	tampão fosfato pH 7,4 c/ azida sódica (conserv.) 0,002% p/v	24h	37 ± 0,5°C
Larucea <i>et al.</i> , 2001	FDC 400 Crown Glass Sommerville, EUA (1,86cm <sup>2</sup> a/d; 11mL v/r)	rato wistar	epiderme + derme	tampão fosfato pH 7,4	9h	37 ± 1°C

<b>Autor</b>	<b>Aparato / dimensões</b>	<b>Origem da membrana</b>	<b>Camadas da pele</b>	<b>Meio receptor</b>	<b>Tempo de ensaio</b>	<b>T (°C)</b>
Manosroi <i>et al.</i> , 2008	n/i (2,46cm <sup>2</sup> a/d; 13mL v/r)	rato Sprague-Dawley	epiderme + derme	tampão fosfato pH 6,5	6h	32 ± 2°C
Mukherjee <i>et al.</i> , 2004	n/i	camundongo	epiderme + derme	tampão fosfato c/ 20% (v/v) de PEG 400	24h	34 ± 1°C
Hathout <i>et al.</i> , 2005	Permegear, Hellertown EUA (1,77cm <sup>2</sup> a/d; 7,5mL v/r)	porco (pele dorsal)	n/i	tampão fosfato pH 7,4	30h	37°C
Lee <i>et al.</i> , 2008	n/i (0,785cm <sup>2</sup> a/d; 5,5mL v/r)	camundongo	epiderme + derme	tampão citrato-fosfato pH 7,4	12h	37°C
Ammar <i>et al.</i> , 2006	Vangard International, EUA 5,31cm <sup>2</sup> a/d; 100mL v/r)	rato wistar	epiderme + derme	tampão fosfato pH 7,4	24h	37 ± 0,5°C
He <i>et al.</i> , 2008	Shangai Kaikai, China (2,8cm <sup>2</sup> a/d; 6,5mL v/r)	camundongo	epiderme + derme	tampão fosfato c/ PEG 400 a 40%	12h	37 ± 0,2°C
Koizumi <i>et al.</i> , 2004	n/i (1,1cm <sup>2</sup> a/d; 16mL v/r)	micro porco Yucatan	epiderme	tampão fosfato c/ 0,1% de $\gamma$ -ciclodextrina e 0,01% de canamicina	24h	37°C
Yourick <i>et al.</i> , 2008	Fluxo através da célula; n/i (0,64cm <sup>2</sup> a/d)	humana, de abdominoplastia e rato Sprague-Dawley	epiderme + derme	tampão HEPES pH 7,4 c/ 4% de albumina bovina e 0,001% de BHT	24h	35°C
Leveque <i>et al.</i> , 2004	FDC 200 Sommerville EUA (3,14cm <sup>2</sup> a/d; 8mL v/r)	humana, de abdominoplastia	epiderme + derme	tampão fosfato pH 7,4 c/ 1,4% de albumina humana	5h	37°C
Puglia <i>et al.</i> , 2005	LGA Berkeley EUA ( 0,75cm <sup>2</sup> a/d; 4,5mL v/r)	humana, de redução de mama	epiderme	etanol / água 1:1 (v/v)	24h	35 ± 1°C

Autor	Aparato / dimensões	Origem da membrana	Camadas da pele	Meio receptor	Tempo de ensaio	T (°C)
Ng <i>et al.</i> , 2010	Feito sob encomenda para GlaxoSmithKline (59,6mm <sup>2</sup> a/d; 11,7mL v/r) <i>versus</i> Permengear Bethlehem EUA (73,8mm <sup>2</sup> a/d; 5,2mL v/r)	membranas sintéticas: Visking, Cuprophane, Benzoylated cellulose e Polyacrylonitrile (AN69)	-	tampão fosfato pH 7,4	7h	37°C
Sinkó <i>et al.</i> , 2012	Aparato feito no lab. (0,78cm <sup>2</sup> a/d; 6mL v/r)	humana, de abdo-minoplastia <i>versus</i> membrana sintética Skin-PAMPA	epiderme	tampão fosfato pH 5,5	n/i	32°C
Venter <i>et al.</i> , 2001	n/i (1,79cm <sup>2</sup> a/d; 6,5mL v/r)	Camundongo	n/i	tampão Sørensen pH 7,4	12h	32°C
Boonen <i>et al.</i> , 2012	Logan New Jersey EUA (0,64cm <sup>2</sup> a/d; 5mL v/r)	humana, de abdo-minoplastia	epiderme + derme	tampão fosfato com 1% de albumina bovina	24h	32 ± 1°C
Abdullah <i>et al.</i> , 2011	Perme-gear Hellertown EUA (0,636cm <sup>2</sup> a/d; 5mL v/r)	rato wistar	epiderme + derme	tampão fosfato pH 7,4	8h	37 ± 0,5°C
Olivier <i>et al.</i> , 2003	n/i (0,77cm <sup>2</sup> a/d)	humana, de abdo-minoplastia	n/i	tampão fosfato	24h	37°C
Pineau <i>et al.</i> , 2012	Laraspiral Dijon França (1,76cm <sup>2</sup> a/d; 6mL v/r)	humana, de abdo-minoplastia	epiderme + derme	Tampão fosfato pH 7,4 c/ 0,1% (p/v) de azida sódica (conserv.) e 5% (p/v) de Brij 98	24h	32 ± 2°C
Levintova <i>et al.</i> , 2011	Crown Glass Sommerville EUA (1,76cm <sup>2</sup> a/d; 13,1mL v/r)	cadáver humano	n/i	água deionizada	24h	37°C

Nota: T(°C) – temperatura em que o compartimento receptor é submetido; a/d - área de difusão; v/r - volume do compartimento receptor; n/i – não informado.

### 6.2.1 Aparato de difusão – célula de Franz

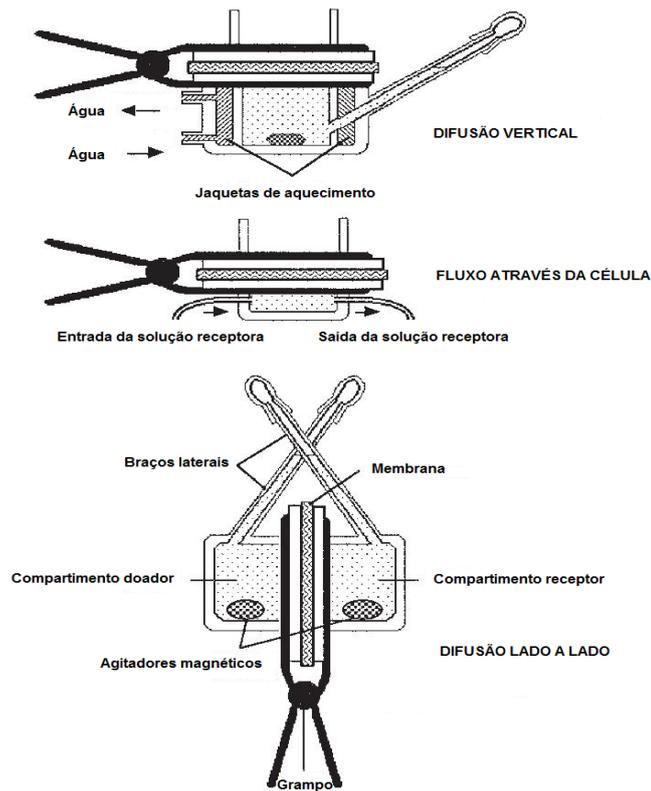
O aparato de difusão empregado deve ser de material inerte, sendo vidro o material mais comum, embora sejam utilizados aparatos de teflon e aço inoxidável (WALTERS *et al.*, 1981). Entre os compartimentos doador e receptor é acondicionada pele como barreira, nas dimensões do aparato e de modo que não persistam bolhas de ar entre a pele e a solução receptora. A quantidade de fármaco liberado a partir do compartimento doador é determinada em função do tempo. É essencial que seja mantida agitação eficiente no compartimento receptor e a amostragem de alíquota da solução deste compartimento deve ser simples, com a reposição do mesmo volume retirado para assegurar a condição *sink*. Dessa forma, não haverá interferência na difusão do permeante (BRAIN, WALTERS E WATKINSON, 2002).

As células de difusão passiva empregadas são geralmente as células de difusão vertical ou o aparato do tipo lado-a-lado, na Tabela 5 utilizado unicamente por Gwak e colaboradores (2002) e não aplicável a dispositivos transdérmicos. Na maioria das vezes, possuem compartimento receptor com volume entre 2 e 10 mL e área de difusão entre 0,2 e 2 cm<sup>2</sup>. As dimensões dos compartimentos devem ser medidas precisamente e seus valores devem ser empregados nos cálculos, com atenção à diluição do analito resultante da amostragem e reposição da solução receptora. A principal diferença na aplicação desses dois tipos de células é que o aparato do tipo lado-a-lado pode ser usado na avaliação de permeação, a partir de uma solução em agitação através de uma membrana, até a solução receptora também em agitação. É aplicável, por exemplo, na avaliação de soluções saturadas quando o acúmulo de sólido na superfície da membrana deve ser evitado. Esse tipo de célula também pode ser modificado para permitir a absorção de permeantes na fase de vapor, quando, por exemplo, material volátil pode ser retido no compartimento doador, de modo que a membrana seja exposta apenas ao permeante no estado de vapor. Já as células de difusão vertical são particularmente úteis no estudo da absorção a partir de formulações semissólidas dispostas sobre a membrana (BRAIN, WALTERS e WATKINSON, 2002), como os dispositivos transdérmicos, e foi o aparato mais utilizado dentre os estudos da bibliografia consultada, 95,7% dos estudos.

Outro tipo de aparato de difusão pode ser empregado em ensaios de permeação, o de fluxo através da célula. Este é recomendado quando o permeante em estudo possui solubilidade muito baixa no meio receptor. A condição *sink* é maximizada uma vez que o meio receptor é continuamente repostado através de um sistema de bomba, a uma taxa de 1,5mL/h. No entanto, a diluição promovida pelo fluxo contínuo acarreta problemas de sensibilidade analítica, particularmente se a permeação é lenta (BRAIN, WALTERS e WATKINSON, 2002). Outra dificuldade atribuída a esse modelo de célula é a dispersão deficiente mesmo com agitação constante e duradoura (GUMMER, HINZ e MAIBACH, 1987). Na literatura consultada e exposta na tabela 5 este aparato foi empregado apenas por Yourick e colaboradores (2008), sendo preferível pelos autores a utilização de emulsificantes, álcool ou ciclodextrinas na solução receptora, de forma a contornar a baixa solubilidade dos fármacos neste compartimento. A figura 14 mostra uma representação esquemática dos aparatos. Atualmente o ensaio de permeação pode ser automatizado e há equipamentos que permitem o ensaio com 6 ou 12 amostras simultaneamente, o que revela mais uma dificuldade na utilização do aparato de fluxo através da célula, a difícil aplicabilidade em sistemas automatizados.

As dimensões do compartimento receptor devem ser compatíveis com o objetivo de manutenção da condição *sink* do ensaio de permeação *in vitro*. Um grande volume no compartimento receptor garante a condição *sink*, mas pode reduzir a sensibilidade analítica, a não ser que grandes amostras possam ser recolhidas e subseqüentemente concentradas. A fase receptora ideal proporciona uma simulação precisa das condições *in vivo* de permeação do composto teste. Como regra geral, a concentração do permeante na solução receptora não deve exceder 10% da sua solubilidade de saturação. Concentração excessiva do fármaco na solução receptora leva a um decréscimo na taxa de absorção, o que pode levar a uma estimativa de biodisponibilidade *in vitro* subestimada (SKELLY *et al.*, 1987; JONES *et al.*; 1989; BRAIN, WALTERS e WATKINSON, 2002).

Figura 15. Aparatos de Franz - representação esquemática



Fonte: BRAIN, WALTERS e WATKINSON, 2002

Chegando-se à conclusão de que o aparato mais adequado e utilizado na avaliação de dispositivos transdérmicos é o de difusão vertical, nenhuma outra observação a respeito de marca, modelo ou dimensões ideais foi relatada. Resumindo, para uma boa condução do estudo de permeação, a célula de difusão deve (BRONAUGH *et al.*, 2002; BRAIN, WALTERS e WATKINSON, 2002):

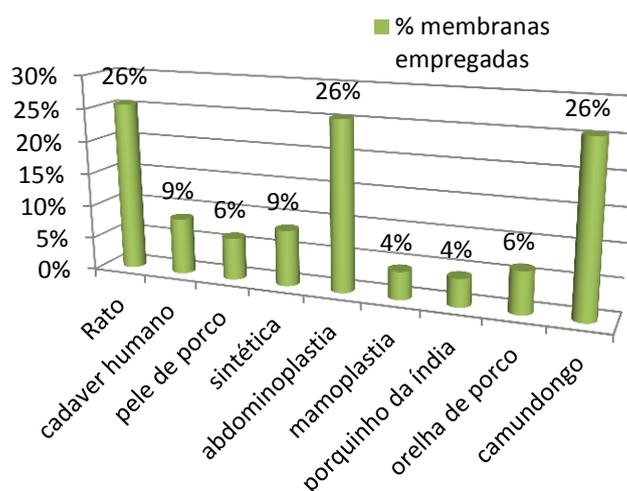
- ser inerte;
- permitir um ensaio robusto e de fácil condução;
- permitir agitação do conteúdo no compartimento receptor;
- garantir íntimo contato entre a membrana e a solução receptora;
- ser mantido à temperatura constante
- ter precisamente calibrados os volumes dos compartimentos e área de difusão;
- manter integridade da membrana;
- permitir fácil amostragem e reposição da solução receptora.

## 6.2.2 Membranas

### 6.2.2.1 Escolha da membrana

O parâmetro mais controverso e de grande relevância no ensaio de difusão *in vitro* é a escolha da membrana. A variedade de membranas utilizadas é grande e pode ocasionar baixa confiabilidade no ensaio, levando-se em consideração a proposta de correlação *in vivo-in vitro* dos testes de permeação. A figura 16 ilustra o percentual de pesquisadores relacionados na tabela 5 que optou por trabalhar com cada membrana em seus ensaios. É possível notar que as peles mais utilizadas são de rato, camundongo e pele humana obtida a partir de abdominoplastia.

Figura 16. Gráfico de seleção de membranas pelos pesquisadores



No estudo *in vitro* de permeação de fármacos, é unânime a opinião entre os pesquisadores de que o melhor é a realização do ensaio utilizando pele humana. Porém, devido à dificuldade na obtenção da mesma, aos aspectos éticos envolvidos e à variabilidade atribuída ao gênero, idade, raça e localização anatômica, pele extraída de animais é frequentemente utilizada para estimar a absorção através da pele humana (WESTER e NOONAN, 1980; VENTER *et al.*, 2001; NICOLI *et al.*, 2008; BARBERO e FRASCH, 2009). No entanto, os dados obtidos devem ser utilizados com cautela, já que existem diferenças nas propriedades de barreira entre a pele animal e a pele humana, principalmente devido ao potencial de permeação de diversos compostos através do folículo

piloso e a espessura relativa do estrato córneo (SCHMOOK *et al.*, 2001; BRONAUGH *et al.*, 2002; WILLIAMS, 2006).

Quando é possível trabalhar com pele humana, algumas observações são feitas, principalmente quanto a idade, raça e local de extração, embora não sejam restritivas. Com relação ao sexo, não foi comprovada ainda diferença significativa quando comparado o mesmo local de aplicação. O avanço da idade pode acarretar em aumento no tamanho dos corneócitos, aumento de desidratação nas camadas mais externas do estrato córneo, decréscimo no turnover epidermal e decréscimo na depuração microvascular. A diminuição na hidratação pode prejudicar principalmente a permeação de fármacos menos lipofílicos (ROSKOS, MAIBACH e GUY, 1989; LEVIN e MAIBACH, 2005).

A respeito da raça, a pele branca é mencionada como ligeiramente mais permeável que a negra. Estudos mostram que a espessura do estrato córneo é semelhante, no entanto, a pele negra demonstrou ser mais compacta, possuindo mais camadas no estrato córneo e um maior conteúdo lipídico. Corcuff e colaboradores (1991) reportaram também que os corneócitos de indivíduos negros, brancos e asiáticos possuem tamanhos semelhantes, mas apresentam diferenças quanto à descamação espontânea. Em estudo comparativo *in vivo* de Kompaore e Tsuruta (1993), foi avaliada a penetração cutânea de nicotinas pela determinação do *lag time* antes da vasodilatação induzida por esses fármacos. O estudo foi conduzido em pele íntegra e em pele com remoção do estrato córneo, após 12 remoções com adesivo (*tape stripping*). A vasodilatação com metil nicotinato mostrou permeabilidade maior na pele asiática, depois na pele branca e menor na pele negra (KOMPAORE e TSURUTA, 1993; LEOPOLD e MAIBACH, 1996).

Levando em consideração a posição anatômica, existem diferenças significativas quanto a permeação de fármacos quando comparada a aplicação em diferentes regiões do corpo, sendo atribuído esse fato ao diâmetro dos corneócitos, conteúdo lipídico, distribuição de anexos cutâneos e à extensão do caminho difusional. (ROUGIER *et al.*, 1986; TSAI *et al.*, 2003). Embora, na prática, a permeação de compostos através da pele siga um padrão diferente nas diversas regiões, é consenso que algumas áreas do corpo, como cabeça e região

genital, são uniformemente mais permeáveis que outras, como as extremidades (braços e pernas). Por exemplo, perda de água transepidermal e permeação do ácido benzoico, cafeína e ácido acetil salicílico decresceram na ordem testa > atrás da orelha > abdome > braço. Perda de água transepidermal é uma medida do fluxo de vapor d'água no estado de equilíbrio que atravessa a pele para o ambiente externo. *In vivo* essa medida vem sendo relacionada diretamente com a taxa de difusão do fármaco através do estrato córneo (LOTTE *et al.*,1987; MACHADO *et al.*, 2010).

Nos ensaios de permeação *in vitro* que utilizam como membrana natural a pele humana, na maioria das vezes é empregada pele extraída do abdome. Conforme observado nos artigos elencados na tabela 5, 17 autores empregaram como membrana a pele humana, sendo que 11 desses estudos obtiveram a pele a partir de cirurgia de abdominoplastia, 1 estudo obteve a pele a partir de cirurgia de mamoplastia e 1 estudo obteve de ambos. Os 4 estudos restantes que utilizaram pele humana obtiveram a mesma a partir de cadáver e não especificaram a região de extração. Para estudos de permeação *in vitro*, é conveniente que o local de extração da pele seja de posição anatômica relevante ao objetivo do estudo, que seja realizado em número adequado de replicadas e utilizando pele de diferentes doadores, incluindo diferentes sexos e raças (BRAIN, WALTERS e WATKINSON, 2002).

Diversos estudos comparativos, *in vivo*, demonstraram que ensaios de permeação utilizando animais comuns de laboratório, como rato, coelho e porco, exibem diferença para o resultado em humanos, e seus resultados são referenciados ainda hoje como justificativa na utilização de membranas naturais em estudos *in vitro*. Nesses estudos, foram aplicados sobre a pele, de forma não oclusiva, determinada concentração de compostos radioativos e toda a urina foi coletada durante 5 dias. Previamente, foi administrada uma dose intravenosa desses compostos para estimar a extensão do metabolismo, bem como excreção através de outra via que não a renal. O estudo foi realizado *in vivo* com aplicação de  $4\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de cada composto radioativo. Os animais tiveram os pelos removidos no dia anterior ao teste e aplicação dos compostos nas costas. Os indivíduos voluntários tiveram a aplicação do composto no antebraço e o doseamento em

todas as espécies foi realizado na urina. O percentual recolhido na urina de dose aplicada topicamente, quando dividido pelo percentual da dose recolhida na urina após administração intravenosa, foi utilizado para estimar o total absorvido através da pele em cada dia. A tabela apresenta o total absorvido nos 5 dias. Os dados obtidos demonstraram que a permeabilidade cutânea aumenta na seguinte ordem: homem, porco, rato e coelho, sendo a pele de porco a que apresentou maior semelhança com a pele humana (BARTEK, LaBUDDE e MAIBACH, 1972; FELDMANN e MAIBACH, 1974).

Resultados de estudo comparativo *in vitro* realizado por Frantz e colaboradores em 1995, no qual comparavam a permeabilidade de 2-etil-1,3 hexanediol (EHD), um repelente de insetos, através de pele humana, de rato e de coelho, corroboram os resultados obtidos *in vivo* de estudos anteriores. Houve maior permeação em pele de coelho, depois em pele de rato e a pele humana apresentou a menor permeação.

O estrato córneo humano funciona como barreira eficiente, reservatório para o fármaco e possui estrutura bem característica. Está associado à epiderme viável, que é metabolicamente ativa e seu metabolismo difere da pele das outras espécies animais. Adicionalmente, as características e densidade de distribuição dos anexos cutâneos (folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas) também são importantes nessa diferenciação. A matriz lipídica do estrato córneo forma uma estrutura contínua e fármacos aplicados sobre a pele utilizam essa rota de permeação. Essa matriz é composta por cerca de 50% de ceramidas, 35% de ácidos graxos livres e 15% de colesterol, composição diferente da constituição intercelular de outras membranas biológicas. Algumas características dos diferentes tipos de pele utilizadas como membrana natural estão relacionadas na tabela 6 (BRONAUGH *et al.*, 1982; VENTER *et al.*, 2001).

**Tabela 6. Medida de espessura da pele, tamanho e densidade de folículos pilosos, de pele humana e animal**

Tipo de pele	Estrato córneo (μm)	Epiderme (μm)	Pele Completa (mm)	Área da pele	Número de folículos / cm <sup>2</sup>	Diâmetro dos folículos / μm
Humana (16)	16,8±0,7	46,9±2,3	2,97±0,28	Abdome	11±1	97±3
Porco (35)	26,4±0,4	65,8±1,8	3,43±0,05	Costas	11±1	177±4
Rato (9)	18,4±0,5	32,1±1,3	2,09±0,07	Costas	289±21	25±1
Camundongo sem pelo (12)	8,9±0,4	28,6±0,9	0,70±0,02	Costas	75±6	46±1
Camundongo (9)	5,8±0,3	12,6±0,8	0,84±0,02	Costas	658±38	26±1

Fonte: BRONAUGH *et al.*, 1982

Nota: Os valores apresentados são uma média do número de seções entre parênteses. Três a seis seções foram obtidas de cada amostra de pele. Pele humana e de porco foi obtida de ambos os sexos. Pele de rato e camundongos (com e sem pelo) foram obtidas de fêmeas.

Estudos mais recentes fornecem novos dados sobre a diferença de características entre as membranas naturais utilizadas. Nicoli e colaboradores (2008) levantaram em seu estudo que o estrato córneo de porco, devido a similaridade bioquímica com o humano, é o melhor modelo na impossibilidade de utilização de pele humana. Levantam a possibilidade de pele das costas e de orelha de coelho também constituir um bom modelo, melhor que a pele de rato, devido ao menor número de folículos pilosos em coelho.

Atualmente, quando a utilização da pele humana não é viável para realização de testes *in vitro*, a membrana obtida a partir da pele de orelha de porco demonstrou proporcionar melhor alternativa, tanto pelo ponto de vista histológico como fisiológico (SALERNO *et al.*, 2010; JACQUES *et al.*, 2010).

Jacobi e colaboradores (2005) realizaram um estudo para comparar a capacidade reservatória do estrato córneo da orelha de porco com o estrato córneo do abdome humano. O fármaco utilizado foi o ácido flufenâmico, lipofílico, e foi estimada a quantidade que o ácido flufenâmico alcançou em camadas mais profundas da pele e na solução receptora, bem como a quantidade do mesmo que decresceu no estrato córneo depois de decorrido o tempo determinado. O resultado foi comparado com o encontrado no abdome (*in vitro*) e no antebraço humano (*in vivo*). A conclusão dos autores foi que o estrato córneo da pele de

orelha de porco apresenta resultados, em termos de capacidade reservatória, próximos ao encontrado com estrato córneo de pele humana, tanto *in vitro* como *in vivo*. No entanto, o estudo ressalta que composição e organização estrutural dos lipídeos intercelulares de homem e porco possuem diferenças e semelhanças. O estrato córneo humano contém altas quantidades de ésteres de colesterol e ceramidas 6 e pequenas quantidades de triglicérides e ceramidas 2, comparado ao estrato córneo do porco. Adicionalmente, ambos os tecidos diferem na composição de ácidos graxos livres. Portanto, a penetração do fármaco em pele humana e de orelha de porco ocorre de forma diferente, tanto via folicular como intercelular.

#### **6.2.2.2 Membranas artificiais**

Alguns autores optam pela utilização de membranas artificiais justificando possuírem vantagens, como facilidade de obtenção, menor custo e simplicidade estrutural de alguns modelos. Essas apresentariam também melhor reprodutibilidade, uma vez que variáveis das membranas naturais como idade, raça, sexo e posição anatômica de obtenção da pele são eliminadas. Com essas membranas, estudos em larga escala seriam mais facilmente conduzidos (NG *et al.*, 2010 ; SINKÓ *et al.*, 2012).

Vários são os modelos de membranas artificiais empregadas, como Visking e Cuprophan (ambas contendo –OH na superfície), membrana de celulose benzoilada (OH e benzoil na superfície) e membrana de poliácridonitrila (NA 69, CN na superfície), variando entre si na massa molar e no conteúdo de glicerina, utilizadas por NG e colaboradores (2010). Bonina e colaboradores (1995) utilizaram um sistema sintético consistindo em uma membrana de éster de celulose (hidrofílica) entre duas membranas de silicone (lipofílicas). Ambos os estudos consideraram que seus modelos de membranas artificiais reproduzem satisfatoriamente a permeação através da pele humana.

Por outro lado, Sinkó e colaboradores (2012) compararam a permeação em ensaio de difusão utilizando como membrana pele humana e o modelo de Permeabilidade em Membranas Artificiais em Paralelo (*skin*-PAMPA), que

consiste em uma membrana lipídica, de constituição semelhante aos lipídeos epidermais, acondicionada entre filtros e é comercializado no próprio dispositivo de difusão descartável. Correlacionaram resultados de permeação obtidos em membrana natural (pele humana), obtidos em três bases de dados para diversos compostos, com resultados obtidos utilizando *skin*-PAMPA. Chegaram à conclusão de que, como nas bases de dados os resultados não são obtidos a partir de protocolos padronizados quanto ao padrão e preparo da pele utilizada, a comparação com o que foi encontrado no modelo de membrana artificial fica difícil de ser realizada. Este é mais um motivo evidente para a padronização de ensaios *in vitro* de permeação.

Groeber e colaboradores (2011) apresentaram diversas vantagens de tecidos obtidos por engenharia *in vitro*. São formados por células derivadas de células humanas com arranjo do ambiente fisiológico em três dimensões, permitindo a interação de diferentes tipos celulares entre si e com a matriz que as cerca. Alguns exemplos são Skinethic™ HRE, Episkin™, Epiderm™, Epiderm FT™, EST1000, and AST2000. Nesse estudo foi mencionada a aplicabilidade *in vitro* em testes de permeação, embora sem apresentação de resultados.

Anos antes Schmook e colaboradores (2001) compararam a permeação de fármacos com diferentes polaridades, sendo eles terbinafina, clotrimazol, hidrocortisona e ácido salicílico, em pele humana, pele de porco e pele de rato com Graftskin™ LSE™ (equivalente de pele humana) e com Skinethic™ HRE (pele humana reconstituída). A pele de porco foi a que demonstrou maior semelhança com a pele humana. Os fluxos de permeação e as concentrações retidas dos fármacos foram de mesma magnitude para ambas as membranas. Graftskin™ LSE™ proporcionou barreira adequada ao ácido salicílico, mas foi muito permeável aos compostos mais hidrofóbicos, mais até que a pele de rato. No caso do Skinethic™ HRE, para o ácido salicílico foram encontradas concentrações semelhantes às retidas na pele humana e um fluxo sete vezes maior. Já a permeação de compostos mais hidrofóbicos através da camada epidermal foi muito maior que a membrana obtida a partir da pele humana. Os autores chegaram então à conclusão que esses modelos de pele reconstituída não podem ser considerados para ensaios *in vitro* de permeação.

Nos equivalentes de pele humana obtida por engenharia *in vitro*, pele artificial cresce a partir de queratinócitos e fibroblastos. Há um consenso entre alguns pesquisadores de que o perfil de permeação em equivalentes de pele humana é em torno de 10 vezes maior que o obtido com membrana natural de pele humana, devido à imaturidade do estrato córneo dessas membranas. Equivalentes de pele humana desempenham bem a função comparativa mas para dados quantitativos possuem limitações (WILLIAMS, 2006).

A justificativa para utilização de membranas artificiais é muito pertinente e pode ser uma alternativa no futuro, caso surja um modelo que seja comprovadamente equivalente à pele humana. Por outro lado, para que haja futuramente parâmetros de comparação para eficiência de membranas artificiais frente a membranas naturais, é necessário que protocolos harmonizados sejam utilizados para ensaios com membranas naturais pela comunidade científica.

### **6.2.2.3 Preparo da membrana**

Swarbrick e colaboradores (1982) já defendiam há mais de trinta anos a criação de “bancos de pele”, visto que a maior disponibilidade de membranas de pele humana naquela época dependia do preparo a partir da excisão da pele de cadáveres com até 48 horas de óbito. Segundo os autores, os bancos de pele poderiam ser capazes de estocar por período definido de tempo e a uma temperatura segura para manutenção da viabilidade da pele em estudos de permeação. Portanto, com a criação desses bancos, a disponibilidade de pele humana poderia ser maior, principalmente levando-se em consideração o aumento gradativo nas cirurgias de abdominoplastia e mamoplastia.

Outro parâmetro variável nos ensaios de permeação diz respeito ao preparo da membrana, quais segmentos utilizar e como deve ser o preparo da pele para que a membrana mantenha sua viabilidade. Diferentes tipos de membrana natural podem ser obtidos (BRAIN, WALTERS e WATKINSON, 2002):

- pele completa, incluindo estrato córneo, epiderme viável e derme;

- estrato córneo com epiderme viável (*dermatomed skin*), na qual a camada mais profunda da derme é removida;
- membrana epidermal, incluindo estrato córneo e epiderme, com separação total da derme utilizando calor;
- estrato córneo apenas, preparada em três passos através de tratamento enzimático.

O tipo mais adequado ao uso será dependente da natureza do permeante. O ambiente da pele *in vivo* difere em parte do ambiente *in vitro*. *In vivo*, a contínua perfusão vascular na derme pode remover rapidamente os permeantes que atingem a junção epiderme-derme. Esses vasos, caso ainda presentes, não possuem perfusão sanguínea. *In vitro*, o ambiente relativamente aquoso da derme vai inibir a permeação de compostos lipofílicos, ao passo que *in vivo* esta barreira é contornada pela camada de capilares. Portanto, o uso de membranas de estrato córneo, epidermal ou a epidermal com remoção de maior parte da derme (*dermatomed skin*) é mais apropriado para permeantes lipofílicos. Outras considerações podem justificar também o uso de membranas epidermais, mesmo quando a derme não representa barreira ao permeante. Por exemplo, quando o objetivo do estudo é avaliar o conteúdo do permeante na pele, é muito mais fácil extrair e solubilizar membranas epidermais ou de estrato córneo, que membranas feitas a partir de pele completa (BRAIN, WALTERS e WATKINSON, 2002). Dos autores relacionados na tabela 5 que identificaram qual membrana natural utilizaram, 27 utilizaram membrana com pele completa (estrato córneo, epiderme viável e derme) e 7 utilizaram membrana epidermal.

Algumas recomendações são feitas com relação ao tratamento da pele assim que esta é removida do indivíduo ou animal. Imediatamente após excisão, o tecido subcutâneo deve ser removido e a pele envolta em papel alumínio antes de acondicionada em bolsas de polietileno, devendo ser assim mantida congelada de -25°C a -20°C até o uso. Sob essas condições são mantidas estabilidade da pele, bem como espessura do estrato córneo por um período de até 3 meses (VERMA *et al.*, 2003; ESCRIBANO *et al.*, 2003). No preparo da membrana epidermal, é mencionada a imersão da pele em água purificada a  $60 \pm 1^\circ\text{C}$  por 2 minutos para separação da epiderme. Esse processo enfraquece a junção

epiderme-derme, mas não enfraquece a junção estrato córneo-epiderme (SWARBRICK *et al.*, 1982; PELTOLA *et al.*, 2003; PAOLINO *et al.*, 2005; PUPE *et al.*, 2013).

Com relação ao congelamento para armazenamento da pele, considerações foram feitas a respeito do estado de hidratação antes do congelamento, podendo este influenciar a permeação. Ensaio realizados em membranas previamente congeladas sem a desidratação apresentaram maior permeabilidade. A água cristalizada a baixas temperaturas danifica as células ou rompe a matriz intercelular, de modo que a resistência à permeação diminui. Como regra, tecidos não devem estar hidratados quando acondicionados em congeladores. O ideal é que antes do congelamento, a pele sem o tecido subcutâneo seja desidratada a temperatura ambiente ou em dessecador, com umidade relativa mantida em 25%. Quando necessária a utilização, a pele deve ser retirada do congelador e mantida em temperatura ambiente por aproximadamente uma hora. A membrana deve então ser reidratada por uma hora em tampão fosfato pH 7,4 antes do acondicionamento no aparato de difusão (SWARBRICK *et al.*, 1982; FARES e ZATZ, 1997; PUPE *et al.*, 2013).

Quanto à utilização de pele de cadáver humano, não é recomendada a excisão da pele após 48 horas do óbito. Há relatos de tecidos removidos entre 72 a 96 horas após o óbito e que apresentaram variabilidade maior e mais intensa nas taxas de permeação, indicando possíveis alterações estruturais no estrato córneo (SWARBRICK *et al.*, 1982).

### **6.2.3 Solução Receptora**

A solução receptora mais comumente utilizada é o tampão salino fosfato em pH 7,4, embora não seja sempre o mais apropriado. Substâncias hidrofóbicas, com solubilidade em água menor que 10µg/mL, possuem coeficiente de partição octanol/água elevado e baixa tendência de partição até a solução receptora através da membrana. Nesse caso a adição de agentes solubilizantes é necessária (SKELLY *et al.*, 1987; BRAIN, WALTERS e WATKINSON, 2002).

As soluções receptoras descritas na literatura relacionada na tabela 5 variam de água deionizada apenas (LEVINTOVA et al., 2011) a tampão fosfato contendo albumina, ciclodextrinas, emulsificantes e conservantes. Albumina, ciclodextrinas e emulsificantes aumentam a solubilidade de permeantes, enquanto os conservantes diminuem o crescimento microbiano no fluido receptor. O crescimento microbiano pode representar problemas por diminuir a partição do fármaco para a solução receptora ou por metabolizar o fármaco. As ciclodextrinas, oligossacarídeos cíclicos, vêm demonstrando ser boas opções de agentes solubilizantes por não danificarem a membrana (BRAIN, WALTERS e WATKINSON, 2002; MARTINS e VEIGA 2002).

Para permitir a solubilização do fármaco, muitas vezes é empregado um meio não fisiológico, como a solução hidroalcolica a 50%. Como restrição ao uso, esse agente solubilizante ou outro mencionado anteriormente não deve danificar a membrana natural, devendo ser a integridade da membrana comprovada experimentalmente (SKELLY *et al.*, 1987; JONES *et al.*, 1989). A avaliação de integridade da membrana é recomendada pelo Guia OECD 428, com o objetivo de evitar uma absorção superestimada pelo uso de pele debilitada, com a função de barreira do estrato córneo comprometida. Algumas técnicas empregadas nessa avaliação incluem avaliação visual, permeação de água tritiada, medida da resistência elétrica transepidermal e perda de água transepidermal (VAN DE SANDT *et al.*, 2004; GUTH *et al.*, 2015).

### **6.2.3.1 pH da Solução Receptora**

Também é importante considerar que o pH da solução receptora deve afetar diretamente o fluxo aparente de um permeante fracamente ionizável. O pH das camadas epidermais deve ser alterado pela solução receptora, e isso pode teoricamente resultar em modulação das tendências de partição de espécies ionizáveis (KOU *et al.*, 1993). Portanto, para uma estimativa realística de permeação de fármacos, a condição ideal seria com solução e pH fisiológicos, considerando pH 7,4. Esse foi o pH relatado em 48,9% dos estudos dispostos na tabela 5.

#### **6.2.4 Temperatura de manutenção do ensaio**

Os experimentos de difusão *in vitro* são normalmente conduzidos com a temperatura da pele a 32°C, correspondendo à temperatura *in vivo*. Para isso, é necessário que a solução receptora seja mantida a  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , pela imersão da célula em banho de água ou pela utilização de células com jaquetas contendo água com temperatura controlada. Essa temperatura foi eleita pela maioria dos pesquisadores baseada no fato de que a solução receptora está em contato com as camadas mais profundas da pele fixada no aparato, e que a temperatura das camadas mais profundas da pele em humanos é mantida entre 36,2 e 37,2°C durante o dia, variando com o ciclo circadiano (LOPES *et al.*, 2005). Dos estudos relacionados na tabela 5, 63,8% deles mantiveram a solução receptora aquecida em torno de 37°C, demonstrando contradição na interpretação de alguns pesquisadores que mantiveram a solução receptora a 32°C.

Essa contradição pode ser em decorrência de má interpretação dos guias OECD. O guia OECD 428 esclarece que a temperatura do compartimento doador e da membrana deve ser mantida a uma temperatura constante próxima a da pele, que é  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ . Portanto, essa deve ser a temperatura mantida na membrana, e não na solução receptora.

#### **6.2.5 Tempo de Ensaio**

O tempo de ensaio deve ser definido com cautela, já que é possível necrose da pele durante experimentos *in vitro* prolongados, levando a um aumento na permeabilidade do fármaco (VENTER *et al.*, 2001). O Guia 428 da OECD recomenda a realização de amostragens da solução receptora por até 24h, mencionando que após esse período pode ter início a deterioração da pele. Dos estudos relacionados na tabela 5, a grande maioria ficou compreendida no período de até 24h, 82,9% deles. Levando em consideração que não ficou evidente o tempo de ensaio em dois estudos, o tempo médio utilizado na avaliação de permeação foi de 20h.

### **6.3 Proposta de metodologia para aprovação regulatória de testes de permeação *in vitro***

Tendo por base os Guias OECD, especialmente o Guia OECD 428 referenciado pela Resolução Normativa nº. 18 de 2014, e o levantamento bibliográfico realizado no presente estudo, torna-se conveniente uma proposta de padronização a ser utilizada nos ensaios de permeação *in vitro*, necessidade fundamental revelada com a criação do RENAMA em 2014. O primeiro passo no sentido de estabelecer os testes *in vitro* com o objetivo de reduzir testes *in vivo* foi o reconhecimento de métodos alternativos recomendados pela OECD. No entanto, mesmo os métodos da OECD, que não são ainda harmonizados, deverão ser validados no prazo máximo de cinco anos. Desse modo, após confronto dos principais parâmetros utilizados pela comunidade científica, segue a proposta que foi objetivo específico do presente estudo, proposta essa focada na redução de ensaios *in vivo* com animais.

#### **6.3.1 Estabelecimento dos parâmetros adotados no ensaio *in vitro***

- 1) Célula de difusão: deve proporcionar selagem adequada da pele entre os compartimentos doador e receptor, permitir fácil amostragem, proporcionar controle de temperatura e agitação adequada da solução receptora em contato com a face interna da membrana. O modelo de célula de difusão que parece reunir melhor essas características é a célula de difusão vertical, com equipamentos automatizados podendo incluir de 6 a 12 células, sendo este também o número de replicadas do ensaio de permeação sugerido para a etapa de desenvolvimento (GUIDELINE ON QUALITY OF TRANSDERMAL PATCHES, 2012). Este é, com grande vantagem, o modelo eleito pela maioria dos autores. Quando o material a ser empregado é semissólido, o espalhamento de quantidade finita desse produto dificilmente produzirá uma camada uniforme sobre a membrana. Portanto, quando o material de investigação for semissólido, é aconselhável a aplicação de dose infinita, ou seja, excesso de produto, com oclusão do compartimento doador (SATO *et al.*, 2007).

- 2) Meio receptor: a utilização de um fluido receptor fisiológico é preferível, embora outros possam ser empregados, contanto que justificados. A composição precisa do fluido receptor deve ser fornecida e a solubilidade adequada do composto teste deve ser demonstrada no meio receptor escolhido, de modo a comprovar que este não age como barreira a absorção. Adicionalmente, o fluido receptor não deve afetar a integridade da pele. Este é o parâmetro que, junto com a membrana, mais varia entre os estudos.

Quando o composto tem caráter lipofílico e a permeação até a solução tampão fosfato não é favorecida, são citados, entre outros, a utilização de albumina, ciclodextrina, polietilenoglicol e etanol, em quantidades não definidas ainda. Dreher e colaboradores (1997), bem como Gwak e colaboradores (2002), utilizaram polietilenoglicol em baixas concentrações, próximas a 5%. Leveque e colaboradores (2004) mencionam que a utilização de albumina a 1,4% é similar a do fluido intersticial da pele, tendo a vantagem de manutenção do ambiente fisiológico. O ideal é que, para a definição de uma metodologia bem delineada, a solução receptora seja definida de acordo com as características de partição (octanol/água) do fármaco, e que a condição *sink* do sistema seja mantida, ou seja, o meio receptor precisa possuir alta capacidade de dissolver e carrear o fármaco e não deve exceder 10% da concentração de saturação para o fármaco ao final do teste (Pharmacopeial Forum, 2009). Adicionalmente, é conveniente a manutenção de pH fisiológico na solução receptora.

- 3) Membrana: conforme a OECD, pele humana ou de animais podem ser utilizadas, embora a pele humana seja recomendada. Tornar viável a proposta de Swarbrick e colaboradores (1982) sobre a criação de bancos de pele seria o ideal porque permitiria inclusive representatividade étnica no caso de ensaios pré-clínicos, por exemplo, com exemplares de pele branca, negra e asiática, como é o mais indicado. A propósito, com o aumento na confiabilidade do teste de permeação *in vitro*, este poderia ser

um substituto para os ensaios clínicos de fase I, empregando-se o mesmo número de amostras (100 indivíduos sadios = 100 amostras de pele humana) e diversidade de sexo e raça. No entanto, para esse avanço, é importante o acesso à pele humana.

É conveniente que o tipo de membrana escolhida esteja de acordo com as características do fármaco. Membrana de estrato córneo, epidermal ou a epidermal com remoção de maior parte da derme são recomendadas para fármacos lipofílicos, enquanto que membrana contendo também a derme é indicada para fármacos de características hidrofílicas. Pele excessivamente espessa (> 1 mm) deve ser evitada, a não ser que seja requerida a determinação do fármaco em camadas profundas da pele. A espessura usual empregada varia de 200 a 400  $\mu\text{m}$ . A seleção da posição anatômica e técnica de preparo devem ser justificados, devendo ser a pele utilizada no ensaio de posição anatômica relevante ao estudo de permeação do fármaco, como abdome, costas, braços. Caso não seja possível o acesso a pele humana, a pele de orelha de porco demonstra maior compatibilidade histológica com a mesma. Quando a pele for congelada, antes da utilização é necessário verificar se a integridade e propriedade de barreira da mesma são mantidas. Para isso, é possível utilizar, por exemplo, as técnicas de resistência elétrica transepidermal ou perda de água transepidermal (GUTH *et al.*, 2015).

- 4) Temperatura: a difusão passiva de compostos aplicados sobre a pele é afetada pela temperatura. O compartimento doador e a pele precisam ser mantidos em temperatura constante próxima a da pele,  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ . Para que essa condição seja satisfeita, a solução receptora deve ser mantida a uma temperatura de  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . A umidade relativa do ar deve estar preferencialmente entre 30 e 70%.
- 5) Duração do teste e amostragem: O tempo de exposição deve ser capaz de mimetizar a exposição humana. Após término do ensaio, a pele deve ser limpa para remoção do material não permeado, como opção, com a

solução etanol/água (1:1) (VAN DE SANDT *et al.*, 2004) ou tampão fosfato (SHIM *et al.*, 2004), e essa solução empregada na lavagem deve ser coletada para análise. Não é recomendado que o período de amostragem ultrapasse 24h, embora ocorra quando o fluxo de permeação é lento. A frequência de amostragem do fluido receptor deve permitir a construção gráfica do perfil de absorção da substância teste, logo o intervalo deve ser pequeno para substâncias que permeiem rapidamente.

- 6) Análise dos dados: de acordo com o OECD *Guidance Notes on dermal absorption* (2010), o fluxo de permeação a partir da exposição à formulação deve ser apresentado como miligrama por centímetro quadrado por hora ( $\text{mg}/\text{cm}^2/\text{h}$ ), calculado a partir da parte linear da curva absorção ( $\text{mg}/\text{cm}^2$ ) *versus* o tempo. A interceptação no eixo X da reta obtida através da quantidade de fármaco permeado (dos pontos obtidos na porção linear da curva) contra a raiz quadrada do tempo ( $\sqrt{t}$ ) representa o *lag time* e a inclinação da reta representa o fluxo de permeação.

Segue abaixo, na tabela 7, um resumo esquemático proposto para os parâmetros a serem empregados no ensaio de permeação *in vitro*:

**Tabela 7. Proposta de parâmetros a serem empregados no ensaio de permeação *in vitro***

Aparato	Célula de difusão vertical.
Solução receptora	Preferencialmente meio fisiológico. Opções de agentes solubilizantes: ciclodextrinas, polietilenoglicol em baixas concentrações ou albumina. Utilização de pH fisiológico.
Membrana	Preferencialmente pele humana. Avaliar possibilidade de criação de bancos de pele. Membrana de estrato córneo, epidermal ou a epidermal com remoção de maior parte da derme são recomendadas para fármacos lipofílicos. Espessura: entre 200 e 400 $\mu\text{m}$ .
Temperatura da solução receptora	37 $\pm$ 1°C.
Duração do teste e amostragem	Duração de 24h para o teste e intervalo de amostragem pequeno para substâncias que permeiam rapidamente.
Análise dos dados	A interceptação no eixo X da reta obtida através da quantidade de fármaco permeado (dos pontos obtidos na porção linear da curva) contra a raiz quadrada do tempo representa o <i>lag time</i> e a inclinação da reta representa o fluxo de permeação.

## 6.4 Discussão geral

Após levantamento das exigências regulatórias relativas a SLT disponíveis nas três principais agências, é possível resumi-las na tabela 8, conforme abaixo.

**Tabela 8. Resumo das ferramentas regulatórias**

<b>Ensaio / Agência</b>	<b>FDA</b>	<b>EMA</b>	<b>ANVISA</b>
Ensaio de desempenho (ensaio de liberação)	Realização de ensaio de acordo com SUPAC SS (1997) e USP 37, utilizando célula de Franz	Diretriz sobre Qualidade (2012) e Farmacopéia Européia, utilizando os aparatos mencionados na mesma	RDC 60/2014, sem referência a aparatos
Ensaio de Bioequivalência	SUPAC SS (1997) e Estudos de biodisponibilidade e bioequivalência (2014)	Nota de Orientação (1999)	RDC 60/2014
Estudos de Irritação/sensibilização	Irritação cutânea e testes de sensibilização (1999)	Diretriz sobre Qualidade (2012)	Inexistente
Avaliação de robustez/adesividade	Fármaco residual em sistemas de liberação (2011) e USP 37	Diretriz sobre Qualidade (2012)	Inexistente
Avaliação comparativa com produto de liberação imediata	Estudos de biodisponibilidade e bioequivalência (2014)	Nota de Orientação (1999), utilizando comparação de parâmetros farmacocinéticos (ASC, C <sub>máx</sub> )	RDC 60/2014, possibilidade de prova de biodisponibilidade relativa (no caso de faixa terapêutica já aprovada)
Teste de vazamento	USP 37	Inexistente	Inexistente
Avaliação de atributos de qualidade	SUPAC SS (1997) e USP 37	Diretriz sobre Qualidade (2012) e Farmacopeia Européia	RDC 60/2014
Ensaio de permeação na etapa de desenvolvimento	Inexistente	Diretriz sobre Qualidade (2012), utilizando guias OECD como referência	Lei 11.194 (2008) e Resoluções Normativas 17 e 18 (2014), essas últimas utilizando guias OECD como referência

Uma possibilidade de complementação ao que é disponibilizado atualmente, de forma inespecífica pela ANVISA com a RDC 60/2014, seria a conjunção de referências importantes fornecidas pelo FDA e EMA, que amparasse a indústria nacional quanto ao desenvolvimento de dispositivos transdérmicos. Os guias OECD já são referência para a ANVISA quanto à validação de métodos alternativos de análise. Resta, no entanto, a definição de diretrizes específicas de regulação desses medicamentos no Brasil, com o objetivo de esclarecer o fabricante/importador, bem como garantir a segurança da população.

Com essa finalidade, seriam guias relevantes na construção de uma regulamentação nacional para SLT:

- a) Nota de Orientação para Liberação Oral Modificada (EMA, 1999);
- b) Diretriz sobre Qualidade de Dispositivos Transdérmicos (EMA, 2012);
- c) Irritação Cutânea e Testes de Sensibilização de Produtos Transdérmicos Genéricos (FDA, 1999);
- d) Fármaco Residual em Sistemas de Liberação Transdérmica (FDA, 2011);
- e) USP 37, teste de desempenho com célula de Franz e testes específicos para SLT (testes de adesão, teste de vazamento e testes em processo) e limites microbiológicos.

A inclusão dos itens (c) e (d) em uma diretriz regulatória, agregaria em requisitos de segurança e qualidade ao que já é proposto pelo EMA, além de o item (c) ser pré-requisito em testes de bioequivalência por influenciar diretamente a permeação cutânea.

A elaboração de uma regulamentação melhor definida, associada à validação das técnicas *in vitro* de permeação, representariam um avanço singular no que tange os SLT, dispositivos promissores quando comparados aos esquemas terapêuticos tradicionais.

## 7 CONCLUSÃO

No presente estudo, foram confrontadas as exigências regulatórias para medicamentos transdérmicos advindas das três principais agências de interesse, FDA, EMA e ANVISA. O FDA e o EMA demonstram complementaridade na avaliação de aspectos inerentes a qualidade e segurança, apresentando o EMA uma abordagem mais clara quanto a requisitos de qualidade desde as etapas iniciais de desenvolvimento dos SLT, enquanto o FDA fornece subsídios extras na avaliação de segurança dos mesmos. A ANVISA não possui legislação que aborde especificamente os dispositivos transdérmicos. Quanto aos compêndios oficiais, a USP 37 apresenta dados mais completos para o controle de qualidade dos dispositivos transdérmicos, uma alternativa à falta de abordagem para estes medicamentos pela Farmacopeia Brasileira.

Paralelamente, foi realizado um estudo da técnica *in vitro* aplicada na avaliação de permeação dos SLT através de pesquisa na literatura científica, os parâmetros empregados no referido teste foram identificados e avaliados quanto à sua relevância, permitindo a realização de uma proposta de metodologia de análise.

## 8 BIBLIOGRAFIA

Abdullah, Ghassan Z.; Abdulkarim, Muthanna F.; Salman, Ibrahim M.; Ameer, Omar Z.; Yam, Mun F.; Mutee, Ahmed F.; Chitneni, Mallikarjun; Mahdi, Elrashid S.; Basri, Mahiran; Sattar, Munavvar A.; Noor, Azmin M. In vitro permeation and in vivo anti-inflammatory and analgesic properties of nanoscaled emulsions containing ibuprofen for topical delivery. *International Journal of Nanomedicine* 2011;6 387-396.

Akomeah, Franklin; Nazir, Tahir; Martin, Gary P.; Brown, Marc B. Effect of heat on the percutaneous absorption and skin retention of three model penetrants. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 21 (2004) 337-345.

Alexander, Amit; Dwivedi, Shubhangi; Ajazuddin; Giri, Tapan K.; Saraf, Swarnlata; Saraf, Shailendra; Tripathi, Dulal Krishna. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. *Journal of Controlled Release* 164 (2012) 26-40.

Ammar, H.O.; Ghorab, M.; El-Nahas, S.A.; Kamel, R. Design of a transdermal delivery system for aspirin as an antithrombotic drug. *International Journal of Pharmaceutics* 327 (2006) 81-88.

Amnuait, Chomchan; Ikeuchi, Itsue; Ogawara, Ken-Ichi; Higaki, Kazutaka; Kimura, Toshikuro. Skin permeation of propranolol from polymeric film containing terpene enhancers for transdermal use. *International Journal of Pharmaceutics* 289 (2005) 167-178.

Andrade, Eduardo Dias; Groppo, Francisco Carlos; Volpato, Maria Cristina; Rosalen, Pedro Luiz; Ranali, José. *A Regulação de Medicamentos no Brasil*. Artmed ed. Porto Alegre, 2013, págs 376 e 377.

Badran, M.M.; Kuntsche, J.; Fahr, A. Skin penetration enhancement by a microneedle device (Dermaroller®) in vitro: Dependency on needle size and applied formulation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 36 (2009) 511-523.

Baert B.; Annavarapu S.; Burvenich C.; Spiegeleer B. Analytical, biopharmaceutical and regulatory evaluation of topical testosterone preparations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 72 (2009) 275-281.

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

Barker, C.L.; Clothier, R.H. Human keratinocyte cultures as models of cutaneous esterase activity. *Toxicology in vitro*. 11 (1997) 637-640.

Bartek, Methodius J.; LaBudde John A.; Maibach, Howard I. Skin Permeability in vivo: Comparison in rat, rabbit, pig and man. *The Journal of Investigative Dermatology*, vol.58, n° 3, 1972.

Bonina, F.P.; Montenegro, L.; Scrofani N.; Esposito, E.; Cortesi, R.; Menegatti, E.; Nastruzzi, C. Effects of phospholipid based formulations on in vitro and in vivo percutaneous absorption of methyl nicotinate. *Journal of Controlled Release* 34 (1995) 53-63.

Boonen, Jente; Malysheva, Svetlana V.; Taevernier, Lien; Mavungu, José Diana Di; Saeger, Sarah De; Spiegeleer, Bart De. Human skin penetration of selected model mycotoxins. *Toxicology* 301 (2012) 21-32.

Brain, Keith R.; Walters, Kenneth A.; Watkinson, Adam C. *Methods for Studying Percutaneous Absorption. Dermatological and Transdermal Formulation*; Marcel Dekker, Inc. New York, 2002, cap. 5.

British Pharmacopoeia 2012.

Bronaugh, Robert L.; Stewart, Raymond F.; Congdon, Elaine R. *Methods for in vitro Percutaneous Absorption Studies II. Animal Models for Human Skin. Toxicology and Applied Pharmacology* 62, 481-488 (1982).

Bronaugh, Robert L., Hood, Harolyn L., Kraeling, Margaret E.K., Yourick, Jeffrey J. *Topical Absorption of Dermatological Products*; cap.10; Marcel Dekker, Inc; New York, 2002.

Cevc, Gregor; Vierl, Ulrich. Nanotechnology and the transdermal route. A state of the art review and critical appraisal. *Journal of Controlled Release* 141 (2010) 277-299.

Chantasart, Doungdaw; Hao, Jinsong; Li, S.Kevin. Evaluation of skin permeation of  $\beta$ -blockers for topical drug delivery. *Pharm.Res.*2013 March; 30(3):.doi:10.1007/511095-012-0928-9.

Chen, Huabing; Chang, Xueling; Du, Danrong; Li, Jin; Xu, Huibi; Yang, Xiangliang. Microemulsion-based hydrogel formulation of ibuprofen for topical delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 315 (2006) 52-58.

Chen, Huabing; Chang, Xueling; Weng, Ting; Zhao, Xiaozhi; Gao, Zhonghong; Yang; Yajiang; Xu, Huibi; Yang, Xiangliang. A study of microemulsion systems for transdermal delivery of triptolide. *Journal of Controlled Release* 98 (2004) 427-436.

Chen, Huabing; Mou, Dongsheng; Du, Danrong; Chang, Xueling; Zhu, Dandan; Liu, Jie; Xu, Huibi; Yang, Xiangliang. Hidrogel-thickened microemulsion for topical administration of drug molecule at na extremely low concentration. *International Journal of Pharmaceutics* 341 (2007) 78-84.

Corbo, M; Schultz, T.W.; Wong, G.K.; Van Buskirk, G.A. Development and Validation of In Vitro Release Testing Methods for Semisolid Formulations. *Pharmaceutical Technology* 17(9):112-128, 1993.

Corcuff P.; Lotte C.; Rougier A.; Maibach H.I. Racial differences in corneocytes. A comparison between black, White and oriental skin. ACTA Dermato-Venereologica, Vol.7, 2ª ed., 146-148, 1991.

Croma Comunica, notícias do mundo analítico, 05/04/2011.

Csóka, I.; Csányi, E.; Zapantis, G.; Nagy, E.; Fehér-Kiss, A.; Horváth, G.; Blazsó, G.; Erös, I. In vitro and in vivo percutaneous absorption of topical dosage forms: case studies. International Journal of Pharmaceutics 291 (2005) 11-19.

Decreto 79.094 de 05 de Janeiro de 1977.

Degim, I.Tuncer. New tools and approaches for predicting skin permeability. Drug Discovery Today, vol. 11, n. 11/12, June 2006.

Dreher, F.; Walde, P.; Walther, P.; Wehrli, E. Interaction of a lecithin microemulsion gel with human stratum corneum and its effect on transdermal transport. Journal of Controlled Release 45 (1997) 131-140.

ECB Technical Guidance Document on Risk assessment in support of commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessments for new substances and Commission Regulation (EC) No. 1488/94 on Risk Assessment for existing substance. EUR 20418 EN/1, 2003.

El-Kattan, Ayman; Asbill, Charles S.; Haidar, Sam. Transdermal testing: practical aspects and methods. PSTT Vol.3, nº 12 december 2000.

El-Kattan, Ayman; Asbill, Charles S.; Kim, Nanhye; Michniak, Bozena B. The effects of terpene enhancers on the percutaneous permeation of drugs with diferente lipophilicities. International Journal of Pharmaceutics 215 (2001) 229-240.

Escribano, Elvira; Calpena, Ana Cristina; Queralt, Josep; Obach, Rossend; Doménech, Jose. Assessment of diclofenac permeation with diferente formulations: anti-inflammatory study of a selected formula. European Journal of Pharmaceutical Sciences 19 (2003) 203-210.

European Commission, 2002. Guidance Document on Dermal Absorption Directorate E1 – Plant Health. Sanco/333/2000, Rev. 7, March 2004.

European Pharmacopoeia 8.3 2015.

Fang, Jia-You; Hong, Chi-Tzong; Chiu, Wen-Ta; Wang, Ying-Yue. Effect of liposomes and niosomes on skin permeation of enoxacin. International Journal of Pharmaceutics 219 (2001) 61-72.

Fang, Jia-You; Hwang, Tsong-Long; Huang, Yen-Ling; Fang, Chia-Lang. Enhancement of the transdermal delivery of catechins by liposomes incorporating anionic surfactants and ethanol. *International Journal of Pharmaceutics* 310 (2006) 131-138.

Fares H.M; Zatz J.L. Dual-probe method for assessing skin barrier integrity: effect of storage conditions on permeability of micro-Yucatan pig skin. *J Soc Cosmet Chem* 48:175–186, 1997

Feldmann, Robert J.; Maibach, Howard I. Percutaneous absorption of some pesticides and herbicides in man. *Toxicology and Applied Pharmacology* 28, 126-132 (1974).

Flynn, Gordon L.; Stewart, Barbra. Percutaneous Drug Penetration: Choosing candidates for Transdermal Development. *Drug Development Research*, 13:169 – 185 (1988).

Frantz, Stephen W.; Ballantyne, Bryan; Beskitt, Joyce L.; Tallant, Marilyn J.; Greco, Richard J. Pharmacokinetics of 2-Ethyl-1,3-Hexanediol. III. In vitro skin penetration comparisons using the excised skin of humans, rats and rabbits. *Fundamental and Applied Toxicology* 28, 1-8 (1995).

Guia de Farmacovigilância – ANVISA. Anexo III - Plano de Farmacovigilância e Plano de Minimização de Risco (PFV/PMR). Brasília, 2009.

Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos. ANVISA, 2ª Edição, Brasília 2012.

Goodman and Gilman. *As Bases da Farmacologia Terapêutica*. Ed. Laurence L. Bruton, 11ªed. Porto Alegre 2010.

Groeber, Florian; Holeiter, Monika; Hampel, Martina; Hinderer, Svenja; Schenke-Layland, Katja. Skin tissue engineering — In vivo and in vitro applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 128 (2011) 352–366.

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. U.S. Department of Health and Human Services; Food and Drug Administration (FDA); Center for Drug Evaluation and Research (CDER); May 1997. Supac-SS CMC 7.

Guidance for Industry (FDA). Topical Dermatologic Corticosteroids: in vivo Bioequivalence. 2 June 1995.

Guidance for Industry. Skin Irritation and Sensitization Testing of Generic Transdermal Drug Products. U.S. Department of Health and Human Services; Food and Drug Administration (FDA); Center for Drug Evaluation and Research (CDER); February 1999.

Guidance for Industry. Q8 (R2) Pharmaceutical Development. U.S. Department of Health and Human Services; Food and Drug Administration (FDA); Center for Drug Evaluation and Research (CDER); Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). November 2009 ICH.

Guidance for Industry. Residual Drug in Transdermal and Related Drug Delivery Systems. U.S. Department of Health and Human Services; Food and Drug Administration; Center for Drug Evaluation and Research (CDER); August 2011.

Guidance for Industry. Bioavailability and Bioequivalence Studies Submitted in NDAs or INDs — General Considerations. U.S. Department of Health and Human Services; Food and Drug Administration; Center for Drug Evaluation and Research (CDER); March 2014.

Guideline on quality of transdermal patches. European Medicines Agency, 23 August 2012.

Gummer, C.L.;Hinz, R.S.; Maibach, H.I. The skin penetration cell: a design update. *International Journal of Pharmaceutics* 40 (1987) 101-104.

Guth, Katharina; Schäfer-Korting, Monika; Fabian, Eric; Landsiedel, Robert; Van Ravenzwaay, Ben. Suitability of skin integrity tests for dermal absorption studies in vitro. *Toxicology in Vitro* 29 (2015) 113–123.

Gwak, Hye Sun; Chun, In Koo. Effect of vehicles and penetration enhancers on the in vitro percutaneous absorption of tenoxicam through hairless mouse skin. *International Journal of Pharmaceutics* 236 (2002) 57-64.

Hathout, Rania M.; Woodman, Timothy J.; Mansour, Samar; Mortada, Nahed D.; Geneidi, Ahmed S.; Guy, Richard H. Microemulsion formulations for the transdermal delivery of testosterone. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 40 (2010) 188-196.

He, Wen; Guo, Xianxi; Zhang, Mian. Transdermal permeation enhancement of N-trimethyl chitosan for testosterone. *International Journal of Pharmaceutics* 356 (2008) 82-87.

Jacobi, U; Taube, H.; Schäfer, U.F.; Sterry, W.; Lademann, J. Comparison of four different in vitro systems to study the reservoir capacity of the stratum corneum. *Journal of Controlled Release* 103 (2005) 61-71.

Jacques, Carine; Perdu, Elisabeth; Dorio, Céline; Bacqueville, Daniel; Mavon, Alain; Zalko, Daniel. Percutaneous absorption and metabolism of [14C]-ethoxycoumarin in a pig ear skin model. *Toxicology in Vitro* 24 (2010) 1426–1434.

Jain, Amit Kumar; Thomas, Narisetty Sunil; Panchagnula, Ramesh. Transdermal drug delivery of imipramine hydrochloride. Effect of terpenes. *Journal of Controlled Release* 79 (2002) 93-101.

Jana, Sougata; Ali, Syed Ansar; Nayak, Amit Kumar; Sen, Kalyan Kumar; Basu, Sanat Kumar. Development of Topical Gel Containing Aceclofenac-Crospovidone Solid Dispersion by “Quality by Design (QbD)” approach. *Chemical Engineering Research and Design* 92 (2014) 2095-2105.

Jaskari, Tarja; Vuorio, Marja; Kontturi, Kyösti; Urtti, Arto; Manzanares, José A.; Hirvonen, Jouni. Controlled transdermal iontophoresis by ion-exchange fiber. *Journal of Controlled Release* 67 (2000) 179-190.

Jepps, Owen G.; Dancik, Yuri; Anissimov, Yuri; Roberts, Michael S. Modeling the human skin barrier – Towards a better understanding of dermal absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65 (2013) 152-168.

Jones, S.P.; Greenway, M.J.; Orr, N.A. The influence of receptor fluid on in vitro percutaneous penetration. *International Journal of Pharmaceutics*, 53 (1989) 43-46.

Kanikkannan, N.; Singh, Mandip. Skin permeation enhancement effect and skin irritation of saturated fatty alcohols. *International Journal of Pharmaceutics* 248 (2002) 219-228.

Koizumi, Atsuko; Fujii, Makiko; Kondoh, Masuo; Watanabe, Yoshiteru. Effect of N-methyl-2-pyrrolidone on skin permeation of estradiol. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57 (2004) 473-478.

Kompaore, Francis; Tsuruta, Hiroshi. In vivo differences between Asian, Black and White in the stratum corneum barrier function. *International Archives of Occupational and Environmental Health* (1993) 65:5223-5225.

Kou, Jim H.; Roy, Samir D.; Du, Jie; Fujiki, Jean. Effect os Receiver Fluid pH on in vitro Skin Flux of Weakly Ionizable Drugs. *Pharmaceutical Research* vol.10, n° 7, 1993.

Kreilgaard, Mads; Pedersen, Erik J.; Jaroszewski, Jerzy W. NMR characterisation and transdermal drug delivery potential of microemulsion systems. *Journal of Controlled Release* 69(2000) 421-433.

Krishnaiah, Yellela S.R.; Xu, Xiaoming; Rahman, Ziyaur; Yang, Yang; Katragadda, Usha; Lionberger, Robert; Peters, John R.; Uhl, Kathleen; Khan, Mansoor A. Development of performance matrix for generic product equivalence of acyclovir topical creams. *International Journal of Pharmaceutics* 475 (2014) 110–122

Larrucea, Edurne; Arellano, Adriana; Santoyo, Susana; Ygartua, Pilar. Combined effect of oleic acid and propylene glycol on the percutaneous penetration on tenoxicam and its retention in the skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 52 (2001) 113-119.

Lee, Woan-Ruoh; Pan, Tai-Long; Wang, Pei-Wen; Zhuo, Rou-Zi; Huang, Chun-Ming; Fang, Jia-You. Erbium:YAG laser enhances transdermal peptide delivery and skin vaccination. *JOURNAL OF Controlled Release* 128 (2008) 200-208.

Lei 6.360 de 23 de Setembro de 1976.

Lei 11.794 de 8 de Outubro de 2008.

Leopold, Claudia S.; Maibach, Howard I. Effect of lipophilic vehicles on in vivo skin penetration of methyl nicotinate in different races. *International Journal of Pharmaceutics* 139 (1996) 161-167.

Leveque, N.; Makki, S.; Hadgraft, J.; Humbert, Ph. Comparison of Franz cells and microdialysis for assessing salicylic acid penetration through human skin. *International Journal of Pharmaceutics* 269 (2004) 323-328.

Levin, Jackie; Maibach, Howard. The correlation between transepidermal water loss and percutaneous absorption: an overview. *Journal of Controlled Release* 103 (2005) 291 – 299.

Levintova, Yuliya; Plakogiannis, Fotios M.; Bellantone, Robert A. Na improved in vitro method for measuring skin permeability that controls excess hydration of skin using modified Franz diffusion cells. *International Journal of Pharmaceutics* 419 (2011) 96-106.

Lewis, Derek; Paulo, Mário; Faustino, Eduardo; Farinha, Ascensão. *In vitro* comparative studies of transdermal nicotine delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*. 148 (1997), 177-189.

Li, J.B. and Rahn, P.C. Automated Dissolution Testing of Topical Drug Formulations Using Franz Cells and HPLC Analysis. *Pharmaceutical Technology* 17(7):44-52, 1993.

Liebenberg, Wilna; Engelbrecht, Eileen; Wessels, Anita; Devarakonda, Bharathi; Yang, Wenzhan; Villiers, Melgardt M. de. A comparative study of the release of active ingredients from semisolid cosmeceuticals measured with Franz, enhancer or flow-through cell diffusion apparatus. *Journal of Food and Drug Analysis*; vol.12, nº1; 2004; pages 19-28.

Lopes, Luciana B.; Collett, John H.; Bentley, M. Vitória L.B. Topical delivery of cyclosporin A: na in vitro study using monoolein as a penetration enhancer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 60 (2005) 25-30.

Lotte CA, Wilson DR, Maibach HI. In vivo relationship of transepidermal water loss and percutaneous absorption in man: effect of anatomical site. *Arch Dermatol Res* 279: 351–356, 1987.

Machado, Marta; Salgado, Teresa M.; Hadgraft, Jonathan; Lane, Majella E. The relationship between transepidermal water loss and skin permeability. *International Journal of Pharmaceutics* 384 (2010) 73–77.

Manosroi, A.; Jantrawut, P.; Manosroi, J. Anti-inflammatory activity of gel containing novel elastic niosomes entrapped with diclofenac diethylammonium. *International Journal of Pharmaceutics* 360 (2008) 156-163.

Manosroi, A.; Kongkanermit, L.; Monosroi, J. Stability and transdermal absorption of topical amphotericin B liposome formulations. *International Journal of Pharmaceutics* 270 (2004) 279-286.

Margetts, Lyn; Sawyer, Richard. Transdermal drug delivery: principles and opioid therapy. Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care and Pain. Vol.7, NO 5, 2007.

Martins, Maria Rita F.M.; Veiga, Francisco. Promotores de permeação para liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para ciclodextrinas. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Jan/Mar 2002; vol.38, n.1.

Mennini, N.; Furlanetto, S.; Cirri, M.; Mura, P. Quality by Design approach for developing chitosan-Ca-alginate microspheres for colon delivery of celecoxib-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin-PVP complex. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 80 (2012) 67-75.

Mukherjee, Biswajit; Mahapatra, Sushmita; Gupta, Ritu; Patra, Balaram; Tiwari, Amit; Arora, Priyanka. A comparison between povidone-ethylcellulose and povidone-eudragit transdermal dexamethasone matrix patches based on in vitro skin permeation. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 59 (2005) 475-483.

Narishetty, Sunil T.K.; Panchagnula, Ramesh. Effect of L-menthol and 1,8-cineole on phase behavior and molecular organization of SC lipids and skin permeation of zidovudine. Journal of Controlled Release 102 (2005) 59-70.

Ng, Shiow-Fern; Rouse, Jennifer J.; Sanderson, Francis D.; Meidan, Victor; Eccleston, Gillian M. Validation of a Static Franz Diffusion Cell System for In Vitro Permeation Studies. AAPS PharmSciTech, Vol.11, No.3, September 2010.

Nicoli, S.; Padula, C.; Aversa, V.; Vietti, B.; Wertz, P.W.; Millet, A.; Falson, F.; Govoni, P.; Santi, P. Characterization of Rabbit Ear Skin as a Skin Model for in vitro Transdermal Permeation Experiments: Histology, Lipid Composition and Permeability. Skin Pharmacology and Physiology 2008;21:218–226.

Nokhodchi, A.; Shokri, J.; Dashbolaghi, A.; Hassan-Zadeh, D.; Ghafourian, T.; Barzegar-Jalali, M. The enhancement effect of surfactants on the penetration of lorazepam through rat skin. International Journal of Pharmaceutics 250 (2003) 359-369.

Note for Guidance on Modified Release Oral and Transdermal Dosage Forms: Section II (Pharmacokinetic and Clinical Evaluation). The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Human Medicines Evaluation Unit. London, 28 July 1999.

Notman, Rebecca; Otter, Wouter K. den; Noro, Massimo G.; W.J. Briels, W.J.; Anwar, Jamshed. The Permeability Enhancing Mechanism of DMSO in Ceramide Bilayers Simulated by Molecular Dynamics. Biophysical Journal, Volume 93, September 2007 2056–2068.

OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Skin Absorption: *in vitro* Method. 13 April 2004.

OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Skin Absorption: *in vivo* Method. 13 April 2004.

OECD Series on Testing and Assessment Number 28. Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. 05 March 2004.

Oliveira, Gabriela; Hadgraft, Jonathan; Lane, Majella E. Toxicological implications of the delivery of fentanyl from gel extracted from a commercial transdermal reservoir patch. *Toxicology in vitro*, 26 (2012) 645-648.

Olivier, J.C.; Rabouan, S.; Couet, W. In vitro comparative studies of two marketed transdermal nicotine delivery systems: Nicopatch® and Nicorette®. *International Journal of Pharmaceutics* 252 (2003) 133-140.

Orazio, Joseph L.; Fischel, Jason A. Recurrent respiratory depression associated with fentanyl transdermal patch gel reservoir ingestion. *The Journal of Emergency Medicine*, vol.42, nº 5, 543-548, 2012.

Paolino, Donatella; Lucania, Giuseppe; Mardente, Domenico; Alhaique, Franco; Fresta, Massimo. Ethosomes for skin delivery of ammonium glycyrrhizinate: In vitro percutaneous permeation through human skin and in vivo anti-inflammatory activity on human volunteers. *Journal of Controlled Release* 106 (2005) 99-110.

Patel, Dipen; Chaudhary, Sunita; Parmar, Bhavesh; Bhura, Nikunj. Transdermal Drug Delivery System: A Review. *The Pharma Innovation*, vol.1, nº 4, 2012.

Paudel, Kalpana S.; Milewski, Mikolgi; Swadley, Courtney L.; Brogden, Nicole K.; Ghosh, Priyanka; Stinchcomb, Audra L. Challenges and opportunities in dermal/transdermal delivery. *Their Deliv.* 2010 July; 1(1): 109-131.

Peltola S.; Saarinen-Savolainen P.; Kiesvaara, J.; Suhonen T.M.; Urtti A. Microemulsions for topical delivery of estradiol. *International Journal of Pharmaceutics* 254 (2003) 99-107.

Pharmacopeial Forum. Topical and Transdermal Drug Products – Product Performance Test. Vol. 35(3) May-June 2009.

Pineau, Alain; Guillard, Olivier; Fauconneau, Bernard; Favreau, Frédéric; Marty, Marie-Hélène; Gaudin, Angeline; Vincent, Claire Marie; Marraud, Annie; Marty, Jean-Paul. In vitro study of percutaneous absorption of aluminum from antiperspirants through human skin in the Franz diffusion cell. *Journal of Inorganic Biochemistry* 110 (2012) 21-26.

Prausnitz, Mark R; Langer, Robert. Transdermal Drug Delivery – Review. *Nature Biotechnology*, vol.26, no11, Novembro 2008.

Puglia, Carmelo; Tropea, Salvatore; Rizza, Luisa; Santagati, Natale Alfredo; Bonina, Francesco. In vitro percutaneous absorption studies and in vivo evaluation of anti-inflammatory activity of

essencial fatty acids (EFA) from fish oil extracts. International Journal of Pharmaceutics 299 (2005) 41-48.

Pupe, Carolina Gonçalves; Carmo, Flávia Almada do; Sousa, Valéria Pereira de; Lopes, Marlene; Vieira, Bárbara Abraham; Ribeiro, Antônio José; Veiga, Francisco; Rodrigues, Carlos Rangel; Padula, Cristina; Santi, Patrícia; Cabral, Lucio Mendes. Development of a Doxazosin and Finasteride Transdermal System for Combination Therapy of Benign Prostatic Hyperplasia. Journal of Pharmaceutical Sciences, 102:4057–4064, 2013.

Rang, H.P.; Dale M.M. Farmacologia. Ed.Guanabara Koogan 4aEd.; Rio de Janeiro 2001.

RDC 79 de 28 de Agosto de 2000.

RDC 162 de 11 de Setembro de 2001.

RDC 136 de 29 de Maio de 2003.

RDC 219 de 20 de Setembro de 2004.

RDC 211 de 14 de Julho de 2005.

RDC 215 de 25 de Julho de 2005.

RDC 332 de 1<sup>o</sup> de Dezembro de 2005.

RDC 39 de 05 de Junho de 2008.

RDC 36 de 27 de Junho de 2012.

RDC 48 de 25 de Outubro de 2013.

RDC 60 de 10 Outubro de 2014

Resolução Normativa n<sup>o</sup> 17 de 3 de Julho de 2014 – CONCEA

Resolução Normativa n<sup>o</sup> 18 de 24 de Setembro de 2014 – CONCEA

Roberts, Michael S.; Cross, Sheree E.; Pellett, Mark A. Dermatological and Transdermal Formulations, cap.4. Marcel Dekker, Inc., New York, 2002.

Romani, Nikolaus; Ebner, Susanne; Tripp, Christoph H.;Flacher, Vincent; Koch, Franz; Stoitzner, Patrícia. Epidermal langerhans cells – Changing views on their function in vivo. Immunology Letters 106 (2006) 119-125.

Roskos, Kathleen V.; Maibach, Howard I.; Guy, Richard H. The Effect of Aging on Percutaneous Absorption in Man. Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics, Vol. 17, No. 6, 1989.

Salerno, C.; Carlucci, A.M.; Bregni, C. Study of in vitro drug release and percutaneous absorption of fluconazole from topical dosage forms. *AAPS PharmSciTech* 11 (2010) 986 – 993.

Sato, Mayumi Elisa Otsuka; Gomara, Fernanda; Pontarolo, Roberto; Andrezza, Itamar Francisco; Zaroni, Mariella. Permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol. 43, n. 2, abr./jun., 2007.

Schmook, Fritz P.; Meingassner, Josef G.; Billich, Andreas. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *International Journal of Pharmaceutics* 215 (2001) 51-56.

Schreiber, S.; Mahmoud, A.; Vuia, A.; Rübhelke, M.K.; Schmidt, E.; Schaller, M.; Kandárová, H.; Haberland, A.; Schäfer, U.F.; Bock, U.; Korting, H.C.; Liebsch, M.; Schäfer-Korting, M. *Toxicology in Vitro* 19 (2005) 813-822.

Shim, Jongwon; Kang, Hyung Seok; Park, Won-Seok; Han, Sang-Hun; Kim, Junoh; Chang, Ih-Seop. Transdermal delivery of minoxidil with block copolymer nanoparticles. *Journal of Controlled Release* 97 (2004) 477-484.

Silva, J.A.; Apolinário, A.C.; Souza, M.S.R.; Damasceno, B.P.G.L.; Medeiros, A.C.D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 2010;31(3);125-131; ISSN 1808-4532.

Sinkó, Bálint; Garrigues, Teresa M.; Balogh, György T.; Nagy, Zsombor K.; Tsinman, Oksana; Avdeef, Alex; Takács-Novák Krisztina. Skin-PAMPA: A new method for fast prediction of skin penetration. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 45 (2012) 698-707.

Skelly, Jerome P.; Shah, Vinod P.; Maibach, Howard I.; Guy, Richard H.; Wester, Ronald C.; Flynn, Gordon; Yacobi, Avraham. FDA and AAPS Report of the Workshop on Principles and Practices of in vitro Percutaneous Penetration Studies: Relevance to Bioavailability and Bioequivalence. *Pharmaceutical Research*, vol.4, n°3, 1987.

Storpirtis, S.; Gonçalves, J.E.; Chiann, C.; Gai, M.N. *Biofarmacotécnica*. Ed.Guanabara Koogan, 2009.

Swarbrick, James; Lee, Geoffrey; Brom, Jeffrey. Drug Permeation through Human Skin: I. Effect of Storage Conditions of Skin. *The Journal of Investigative Dermatology*, 78:63-66, 1982.

Tiwary, Ashok K.; Sapra, Bharti; Jain, Subheet. Innovations in Transdermal Drug Delivery: Formulations and Techniques. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulations*, 2007, vol.1, 23-36.

Tsai, Jui-Chen; Lin, Ching-Yu; Sheu, Hamm-Ming; Lo, Yu-Li; Huang, Ying-Huang. Noninvasive Characterization of Regional Variation in Drug Transport into Human Stratum Corneum in Vivo. *Pharmaceutical Research*, Vol. 20, No. 4, April 2003.

Ueda, Clarence T.; Shah, Vinod P.; Derdzinski, Kris; Ewing, Gary; Flynn, Gordon; Maibach, Howard; Marques, Margareth; Rytting, Howard; Shaw, Steve; Thakker, Kailas, Yacobi, Avi. Topical and Transdermal Drug Product. *Dissolution Technologies*, November 2010.

USP 37; 2015

Van de Sandt, J.J.M.; Van Burgsteden, J.A.; Cage, S.; Carmichael, P.L.; Dick, I.; Kenyon, S.; Korinth, G.; Larese, F.; Limasset, J.C.; Maas, W.J.M.; Montomoli, L.; Nielsen, J.B.; Payan, J.-P.; Robinson, E.; Sartorelli, P.; Schaller, K.H.; Wilkinson, S.C; Williams, F.M. In vitro predictions of skin absorption of caffeine, testosterone and benzoic acid: a multi-centre comparison study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 39 (2004) 271-281.

Venter, Johannes P.; Müller, Douw G.; Plessis, Jeanetta du; Goosen, Collen. A comparative study of an in situ adapted diffusion cell and na in vitro Franz diffusion cell method for transdermal absorption of doxylamine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 13 (2001) 169-177.

Verma D.D.; Verma S.; Blume G.; Fahr A. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. *International Journal of Pharmaceutics* 258 (2003) 141-151.

Vicentini, Fabiana T.M.C.; Simi, Thaís R.M.; Ciampo, José O. Del; Wolga, Nilce O.; Pitol, Dimitrius L.; Iyomasa, Mamie M.; Bentley, M. Vitória L.B.; Fonseca, Maria J.V. Quercetin in w/o microemulsion: In vitro and in vivo skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated in vivo. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 69 (2008) 948-957.

Walters, Kenneth A.; Brain, Keith R.; Green, Darren M.; James, Valerie J.; Watkinson, Adam C.; Sands, Robert H. Comparison of the transdermal delivery of estradiol from two gel formulations. *Maturitas* 29 (1998), 189-195.

Walters, Kenneth A. *Dermatological and Transdermal Formulations*, cap.1 a 5. Marcel Dekker, Inc., New York, 2002.

Wester, Ronald C.; Howard, Maibach I. *Topical Absorption of Dermatological Products*. Marcel Dekker, Inc. New York, 2002; cap.9.

Wester, Ronald C.; Noonan, Patrick K. Relevance of animal models for percutaneous absorption. *International Journal of Pharmaceutics*, 7 (1980) 99-110.

Williams, Faith M. In vitro studies - how good are they at replacing in vivo studies for measurement of skin absorption? *Environmental Toxicology and Pharmacology* 21 (2006) 199–203.

WO 2007/064407 A1; PCT / US 2006/039557. Patente Excelon<sup>®</sup> Patch, Novartis.

Wokovich, Anna M.; Prodduturi, Suneela; Doub, William H.; Hussain, Ajaz S.; Buhse, Lucinda F. Transdermal drug delivery system (TDDS) adhesion as a critical safety, efficacy and quality attribute. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 64 (2006) 1-8.

Yourick, Jeffrey J.; Jung, Connie T.; Bronaugh, Robert L. In vitro and in vivo percutaneous absorption of retinol from cosmetic formulations: Significance of the skin reservoir and prediction of systemic absorption. *Toxicology and Applied Pharmacology* 231 (2008) 117-121.

Zatz, J.L. Drug Release from Semisolids: Effect of Membrane Permeability on Sensitivity to Product Parameters. *Pharmaceutical Research* 2:787-789, 1995.

Zhao X.; Liu, J.P.; Li, Zhang Y. Enhancement of transdermal delivery of theophylline using microemulsion vehicle. *International Journal of Pharmaceutics* 327 (2006) 58-64.

Zernikow, Boris; Michel, Erik; Anderson, Brian. Transdermal fentanyl in childhood and adolescence: a comprehensive literature review. *The Journal of Pain*, vol.8, no 3, March 2007, pgs 187-207.