

Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde

Diogo Melo Araújo Borba

AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA DA PROGESTERONA A  
PARTIR DE DIFERENTES FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

Brasília

2017

Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde

AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA DA PROGESTERONA A  
PARTIR DE DIFERENTES FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

Orientando: Diogo Melo Araújo Borba

Matrícula: 10/00098762

Orientador: Prof. Dr. Guilherme M.  
Gelfuso

Co-orientador: Msc Breno Noronha Matos

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Universidade de Brasília  
como requisito parcial para obtenção de  
grau Farmacêutico

Brasília

2017

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Diogo Melo Araújo Borba

Avaliação da permeação cutânea da progesterona a partir de diferentes formulações farmacêuticas

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção de grau Farmacêutico



Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso (Presidente)  
Universidade de Brasília

## AGRADECIMENTOS

À vida dada a mim por meus pais, Moizés e Ana Maria, e sua imensa dedicação, amor e carinho; aos meus irmãos, Thiago e Moizés Filho e todos os meus familiares em especial minha querida avó Maria Vitoria.

Aos meus amigos sempre presentes, Joao de Deus e Guilherme Augusto, a minha amiga e farmacêutica Danielli Silva a qual me ajudou em momentos cruciais deste trabalho.

À Universidade de Brasília pela vivência e pela construção humana a qual me proporcionou.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Guilherme Gelfuso, pela oportunidade, por sua atenção, pelos seus ensinamentos e também por sua militância política.

Ao meu co-orientador, Breno Noronha, por sempre estar disposto a me ajudar e a realizar o melhor trabalho, à Maira Nunes que me ajudou em parte dos ensaios deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos (LTMAC), que me receberam bem e sempre estiveram dispostos em ajudar e tirar dúvidas.

A todos os companheiros e amigos que fiz ao longo dos anos de faculdade e que lutam por um ensino público de melhor qualidade.

Por fim, dedico *in memoriam* a minha madrinha Suzana Araújo e ao meu avô Vicente Henrique pelos anos de convivência, amor e pela imensa alegria e orgulho que me proporcionaram e por nunca terem deixado de acreditar nessa conquista.

## RESUMO

A progesterona é um dos hormônios mais indicados em tratamentos de reposição hormonal, visto que, com o aumento da idade e o início da menopausa tem-se uma diminuição de sua produção natural e a consequente ocorrência de sintomas tais como, suores noturnos, insônia, aumento da fadiga e irritabilidade, depressão, além do aumento do risco de doenças como osteoporose, endometriose, problemas cardiovasculares e câncer de colo de útero. Os cremes e outras formas farmacêuticas tópicas de progesterona vêm sendo muito utilizados para esse tipo tratamento, por serem de fácil aplicação, além de garantir o uso de doses menores do hormônio, se comparados com comprimidos orais, o que diminui bastante os efeitos colaterais. Porém esses medicamentos são bioisentos pela ANVISA de testes de bioequivalência o que gera uma incerteza quanto à sua segurança e eficiência. Este estudo comparou, por meio de permeação cutânea *in vitro* em células de difusão vertical do tipo Franz por um período de 48 horas utilizando pele de porco, o perfil de permeação de formulações, uma comercial e duas manipuladas, de progesterona creme 20mg/mL disponíveis no mercado, assim como, o teor, pH e densidade, com o objetivo de constatar a qualidade das formulações e assegurar a sua de intercambialidade. O fármaco foi quantificado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando método sensível previamente validado. Observaram-se diferenças significativas entre a formulação comercial e as manipuladas quanto à absorção do fármaco tanto na epiderme quanto no estrato córneo. Ainda foram encontrados teor abaixo do especificado na prescrição em formulas manipuladas, e pH abaixo do limite de segurança,  $\text{pH} \leq 5,5$ . O presente estudo mostra que devido à ausência de legislações regulatórias mais rígidas e falta de controle de qualidade para avaliar a bioequivalência de medicamentos tópicos e transdérmicos no Brasil, esses podem acarretar em potencial risco a saúde pública. Faz-se necessário uma revisão por parte da ANVISA e outros órgão competentes dos métodos de análises e as condições de registro para formulações de uso tópico, assim como, o incremento de estudos *in vitro* de permeação cutânea para avaliação de biodisponibilidade e bioequivalência.

**Palavras-chave:** progesterona, permeação cutânea, medicamentos tópicos, bioequivalência.

## ABSTRACT

Progesterone is one of the most indicated hormones in hormone replacement therapy, provided that with the natural aging process and the transition into menopause stage there is a decrease in this hormone's natural production and the consequent occurrence of symptoms such as night sweats, insomnia, increased fatigue and irritability, depression; in addition to increased risk of diseases such as osteoporosis, endometriosis, cardiovascular conditions and cervical cancer. The use of topical creams and topical pharmaceutical forms of progesterone has been widely applied in this type of treatment, due to their simple administration, besides guaranteeing the use of smaller doses compared to oral tablets, which greatly reduces side effects. However, these drugs are exempted by ANVISA from bioequivalence tests, which creates an uncertainty about both its safety and efficiency. This study compared, through *in vitro* cutaneous permeation in Franz-type vertical diffusion cells for 48 hours using porcine skin, the permeation profile of formulations, a commercial and two manipulated, 20 mg/mL progesterone cream available in the market, as well as the composition, pH and density, in order to verify the quality of the formulations and ensure their interchangeability. The drug was quantified by high performance liquid chromatography (HPLC) using a previously validated sensitive method. The results obtained showed significant differences between the commercial formulation and those manipulated in terms of presence of the drug in both the epidermis and the stratum corneum. Moreover, it was found that the content was below the specified in the prescription, that formulas were manipulated, and that pH was below the safety limit, that is  $\text{pH} \leq 5.5$ . The present study shows that due to the absence of stricter regulatory legislation, lack of quality control to evaluate the bioequivalence of topical drugs in Brazil, these may potentially to public health risk. It is necessary that a reform by ANVISA and other competent bodies of the methods of analysis and the registration conditions for topical formulations be pursued, as well as the increase of *in vitro* transdermal delivery studies for the evaluation of bioavailability and bioequivalence.

**Keywords:** Progesterone, transdermal delivery; Progesterone, topical drugs, bioequivalence.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO .....</b>	<b>5</b>
2.1	<b>OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>5</b>
2.2	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>6</b>
3.1	<b>Material.....</b>	<b>6</b>
3.2	<b>Pele.....</b>	<b>6</b>
3.3	<b>Formulações.....</b>	<b>7</b>
3.4	<b>Padronização do método analítico .....</b>	<b>8</b>
3.5	<b>Estudos <i>in vitro</i> de permeação cutânea de progesterona .....</b>	<b>9</b>
	.....	<b>10</b>
3.6	<b>Ensaio de equivalência farmacêutica das formulações .....</b>	<b>12</b>
3.7	<b>Análise estatística dos dados .....</b>	<b>12</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>13</b>
4.1	<b>Padronização do método analítico .....</b>	<b>14</b>
4.2	<b>Estudos <i>in vitro</i> de permeação cutânea .....</b>	<b>15</b>
4.3	<b>Equivalência farmacêutica entre as formulações.....</b>	<b>18</b>
4.4	<b>Biodisponibilidade e Bioequivalência .....</b>	<b>20</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>22</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>23</b>

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Estrutura química da (A) Progesterona, (B) Testosterona, (C) Estriol e (D) Estradiol, usados em terapias de reposição hormonal..... 1
- FIGURA 3.** Processo de retirada da pele da orelha do porco: A) A orelha do porco é fixada em uma placa de isopor. B) Com auxílio de um bisturi a pele é removida da orelha do porco. C) Pele totalmente removida da orelha do porco. D) O tecido adiposo adjacente é retirado com auxílio de uma tesoura. E) A pele de porco é mantida sob refrigeração à -4°C até seu uso. (Adaptado de MATOS, 2014) ..... 7
- FIGURA 4.** Formulações de progesterona creme. A) BIOVEA (industrializada), B) Manioulada A e C) Manipulada B. .... 8
- FIGURA 7.** Peles de suínos retiradas das células de Franz após o estudo de permeação in vitro com as formulações: F1) BIOVEA, F2) Manipulada B e F3) BIOEXATA. Os ensaios foram realizados em quaduplicata. .... 11
- FIGURA 8.** Ilustração esquemática demonstrando diferentes maneiras de penetração de fármacos pelo estrato córneo (Trommer, 2006). .... 13
- FIGURA 9.** Representação gráfica das curvas analíticas obtida para a progesterona (PG) por CLAE. (A) amostras diluídas em metanol. Equação da reta:  $y = 136246x - 4606$  e coeficiente de correlação linear:  $r = 0,9997$ . (B) amostras diluídas em solução de tampão fosfato/propilenoglicol na proporção 60:40 (v/v). Equação da reta:  $y = 140636x - 7931,6$  e coeficiente de correlação linear:  $r = 0,9964$ . .... 14
- FIGURA 10.** Quantidade de progesterona recuperada do estrato córneo (EC) da pele a partir das formulações BIOVEA, Manipulada A e Manipulada B. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão da média obtidas a partir de 4 replicatas. .... 16
- FIGURA 11.** Quantidade de progesterona recuperada da pele remanescente (sem EC) a partir das formulações BIOVEA, Manipulada A e Manipulada B. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão da média obtidas a partir de 4 replicatas. .... 17

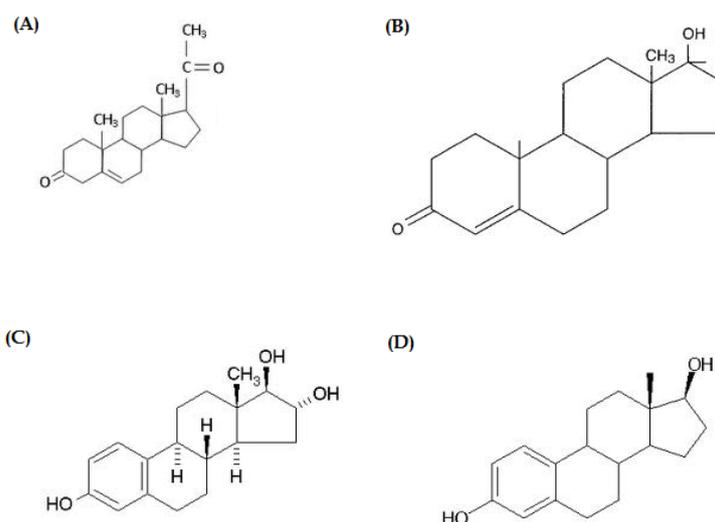
## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> Concentrações teórica e obtida de progesterona nas formulações BIOVEA, Manipulada B e Manipulada A para determinação do teor.....	19
<b>TABELA 2.</b> pH e densidade das formulações BIOVEA, Manipulada A e Manipulada B.	19
<b>TABELA 3.</b> Comparação das exigências requeridas para registro de medicamentos tópicos (SOARES et al., 2015). .....	21

## 1 INTRODUÇÃO

A progesterona (PG) é um dos hormônios mais usados em tratamentos de reposição hormonal feminino, visto que, com o aumento da idade e o início da menopausa tem-se uma diminuição de sua produção natural e a consequente ocorrência de sintomas tais como, suores noturnos, insônia, aumento da fadiga e irritabilidade, depressão, alterações na pele, secura vaginal e incontinência. Além do aumento do risco de doenças como osteoporose, endometriose, problemas cardiovasculares e câncer de colo de útero (YOO et al., 2006; SCHIERBECK et al., 2012).

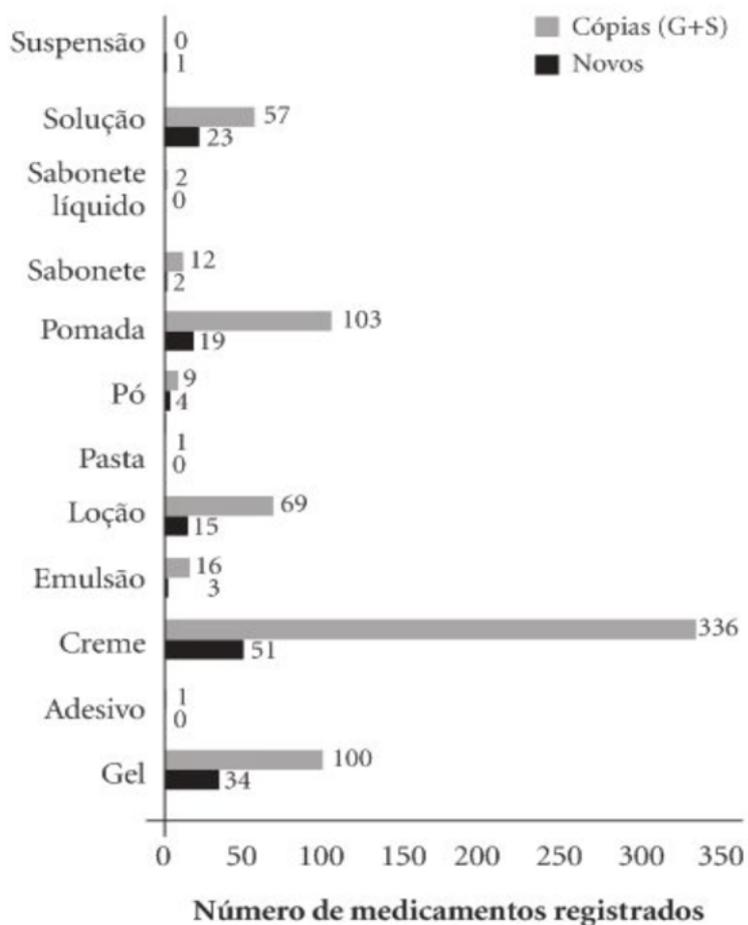
A liberação transdérmica e de fármacos esteroides (Figura 1) utilizados para a reposição hormonal vem sendo alvo de muitos estudos nos últimos anos (LIU, 2013). Trata-se de uma via de fácil acesso, já que a pele é o órgão do corpo humano mais extenso em superfície (GRATIERI et al., 2008; GRATIERI et al., 2009, ELGINDY et al., 2016).



**FIGURA 1.** Estrutura química da (A) Progesterona, (B) Testosterona, (C) Estriol e (D) Estradiol, usados em terapias de reposição hormonal.

O desenvolvimento de sistemas dermatológicos tópicos e transdérmicos tem suscitado interesse crescente nas últimas décadas, principalmente por ser uma via alternativa ao trato gastrointestinal. Estes sistemas possuem, de um modo geral, as seguintes vantagens em comparação com medicamentos de administração oral ou parenteral: 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; há a possibilidade de tratamento por longos períodos com uma única aplicação do medicamento; a terapia pode ser interrompida facilmente pela simples remoção do sistema transdérmico; eles permitem administração em menor dose devido ao aumento da biodisponibilidade; possibilitam manutenção de concentrações plasmáticas constantes; e aumentam a adesão do paciente ao tratamento como resultado da fácil administração (ALEXANDER et al., 2012).

No Brasil, por exemplo, existiam até o ano de 2015, 1.573 medicamentos de uso semissólidos registrados pela Anvisa contendo um único fármaco, 900 deles destinados ao uso dermatológico, e desses, 708 eram registrados como cópias (medicamentos genéricos ou similares) e 193 como medicamentos referência. Considerando apenas os medicamentos semissólidos, em que a permeação do fármaco é dependente de sua liberação pela base dermatológica, tinham-se 625 cópias com registros concedidos pela Anvisa e 62 novos (SOARES KCC et al., 2015). Percebe-se com isso o grande predomínio dos medicamentos semissólidos cópias registrados no Brasil, perfazendo-se uma média de 10,25 cópias para cada medicamento referência, como é mostrado na Figura 2.



**FIGURA 2.** Formulações tópicas dermatológicas simples registradas na ANVISA até o ano de 2013 (SOARES KCC et al., 2015)

Os medicamentos de aplicação tópica (aqueles não destinados a efeitos sistêmicos) que contenham o mesmo fármaco, na mesma concentração, além de excipientes de mesma função em relação ao de referência, são bioisentos pela RDC 37/2011, ou seja, os de uso tópico não precisam comprovar sua eficácia e segurança por meio dos estudos de bioequivalência (ANVISA, 2011). O único estudo exigido para registro das formulações tópicas genéricas no Brasil é o de equivalência farmacêutica, que avalia apenas os parâmetros físico-químicos, determinação de aspecto, teor, identificação, peso médio, pH, viscosidade e densidade e microbiológicos (ANVISA, 2010). Esses ensaios são estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira 5<sup>a</sup> edição preferencialmente, ou em farmacopeias de referência como a americana e/ou europeia.

Neste contexto, o presente estudo avaliou *in vitro* a permeação e retenção cutânea de progesterona a partir de diferentes formulações farmacêuticas, como indicativo da qualidade, efetividade e intercambialidade desses produtos semissólidos disponíveis no mercado. Além disso, com o estudo buscou-se a validação desses estudos *in vitro* de permeação cutânea para avaliação de bioequivalência de formulações semissólidas de absorção transdérmica, utilizando-se dados obtidos com ensaios de equivalência farmacêutica entre os produtos (teor, densidade e pH).

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Este estudo tem como objetivo avaliar *in vitro* a permeação cutânea da progesterona a partir de diferentes formulações farmacêuticas semissólidas.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar e comparar a permeação e retenção cutânea *in vitro* de progesterona nas camadas da pele (estrato córneo e epiderme viável) a partir de diferentes formulações farmacêuticas, como requisito de qualidade dos produtos comerciais;
- Executar ensaios de equivalência farmacêutica entre as formulações, sendo elas: teor, densidade e pH;
- Verificar se a metodologia empregada é capaz de diferenciar a biodisponibilidade dermatológica de progesterona a partir de diferentes produtos transdérmicos.

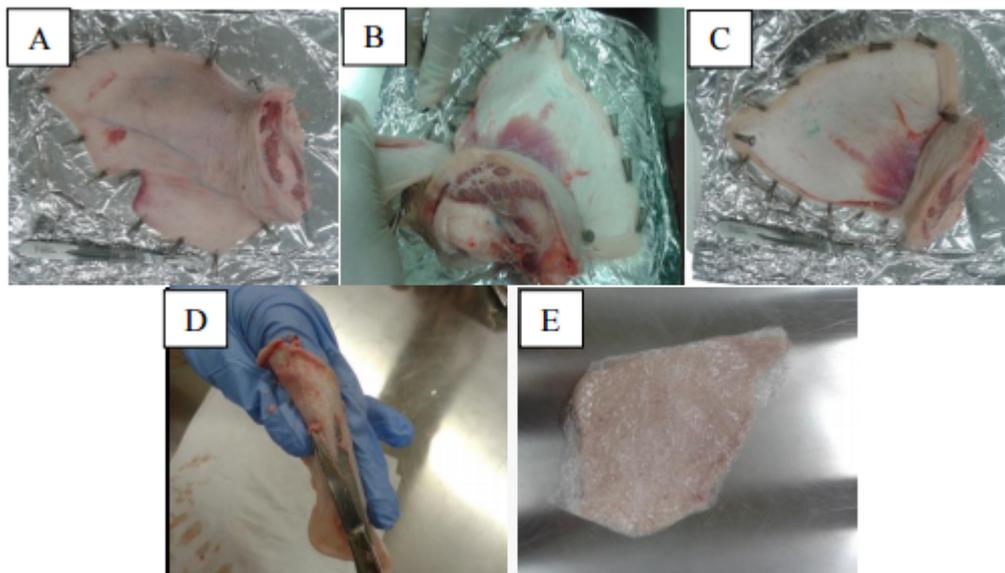
### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Material**

A progesterona (99%) utilizada neste trabalho foi gentilmente cedida pelo Instituto de Manipulações Farmacêuticas Farmacotécnica (Brasília, Brasil). Solventes como metanol e acetonitrila grau HPLC foram obtidos da Tedia Brazil Ltda. (Rio de Janeiro, Brasil). Para preparação do tampão fosfato foram utilizados fosfato de sódio nas formas monobásica e dibásica (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e cloreto de sódio (Serva, Rio de Janeiro, Brasil) e correções de pH foram realizadas com hidróxido de sódio (Dinâmica Química Contemporânea Ltda. São Paulo, Brasil). As orelhas de porco utilizadas para remoção da pele foram cedidas pelo Frigorífico Bonasa (Brasília, Brasil). Todas as análises foram realizadas com água tipo Milli-Q (Millipore, França).

#### **3.2 Pele**

Foram utilizadas orelhas de porco obtidas logo após o abate do animal e antes do processo de escalda. A pele inteira foi removida da região externa da orelha com auxílio de um bisturi, separada de sua camada adiposa adjacente com o auxílio de uma tesoura (Figura 3), e foi armazenada a  $-4^{\circ}\text{C}$  por um período máximo de 2 meses antes do uso. Não foi necessária nenhuma autorização de conselhos de ética, por se tratar de material biológico liberado para consumo.



**FIGURA 3.** Processo de retirada da pele da orelha do porco: A) A orelha do porco é fixada em uma placa de isopor. B) Com auxílio de um bisturi a pele é removida da orelha do porco. C) Pele totalmente removida da orelha do porco. D) O tecido adiposo adjacente é retirado com auxílio de uma tesoura. E) A pele de porco é mantida sob refrigeração à  $-4^{\circ}\text{C}$  até seu uso. (Adaptado de MATOS, 2014)

### 3.3 Formulações

O perfil de permeação cutânea *in vitro* de progesterona foi determinado a partir de três formulações na forma farmacêutica de creme, sendo uma industrial da marca BIOVEA, adquirida do fabricante em 18 de janeiro de 2017, e duas formulações manipuladas, uma manipulada em 01 de fevereiro de 2017 (manipulada A) e outra manipulada em 06 de fevereiro de 2017 (manipulada B). As três formulações (Figura 4) continham a concentração de 20 mg/mL de progesterona.



**FIGURA 4.** Formulações de progesterona creme. A) BIOVEA (industrializada), B) Manipulada A e C) Manipulada B.

### 3.4 Padronização do método analítico

A quantificação da progesterona nos estudos de permeação cutânea foi baseada em método analítico desenvolvido por Quintão e colaboradores (QUINTÃO et al., 2015). Foi utilizado equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), modelo Shimadzu LC 20-AD, composto por duas bombas (modelo LC 20-AT), um injetor automático (modelo 9SIL-20AD) e forno (modelo CTO-20AS), acoplados a um detector espectrofotométrico (modelo SPD-M20A) e a um computador equipado com o programa de análise cromatográfica Shimadzu LC. Foi utilizada uma coluna de fase reversa  $C_{18}$  (150 mm x 4,6 mm; 5  $\mu$ m) e fase móvel composta por uma mistura de Água deionizada:Acetonitrila (30:70) (v/v). A vazão da fase móvel foi igual a 1 mL/min, o volume de injeção das amostras foi de 50  $\mu$ L. O forno foi utilizado à 40°C e a detecção foi

feita no UV em comprimento de onda igual a 244 nm. O método foi previamente validado em termos de seletividade, linearidade, sensibilidade, precisão e exatidão (QUINTÃO et al., 2015).

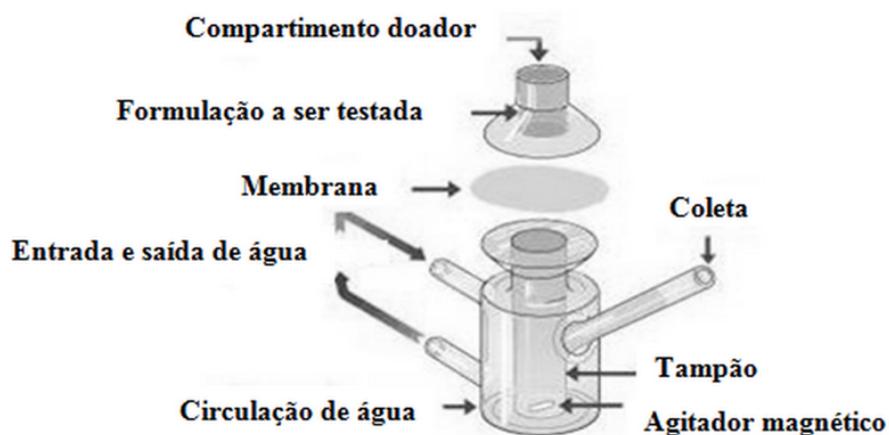
Para o presente estudo, construiu-se duas curvas de calibração: uma contendo a progesterona dissolvida em metanol pensando-se nos ensaios de doseamento do hormônio extraído da pele, e outra contendo a progesterona dissolvida em uma mistura de tampão fosfato pH 7,4 e propilenoglicol (60:40 v/v) para se dosar a progesterona permeada para o fluido receptor nos ensaios de permeação.

Assim, diluições do hormônio nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 µg/mL tanto em metanol quanto em mistura de tampão fosfato pH 7,4 e propilenoglicol (60:40 v/v) foram feitas em triplicatas e analisadas por cromatografia seguindo-se o método descrito anteriormente para a construção das curvas analíticas.

### **3.5 Estudos *in vitro* de permeação cutânea de progesterona**

Os estudos de permeação foram conduzidos *in vitro* em células de difusão vertical do tipo Franz, esquematizada na Figura 5. Esta célula possui um compartimento doador, no qual foi inserido 1 mL de cada formulação, e um compartimento receptor, que foi preenchido com 15 mL de uma mistura de solução tampão fosfato 0,01 M, pH 7,4 e propilenoglicol (60:40 v/v). Para todos os experimentos, as células foram mantidas sob agitação a 500 rpm.

Os estudos de permeação foram conduzidos por 48 h, realizando-se coletas da solução receptora em intervalos de tempo determinados: 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 30 h, 36 h e 48 h, repondo o volume de solução receptora imediatamente após cada coleta. Os experimentos foram realizados em quadruplicata para cada formulação.



**FIGURA 5.** Célula de difusão de Franz adaptada de Silva (2008)

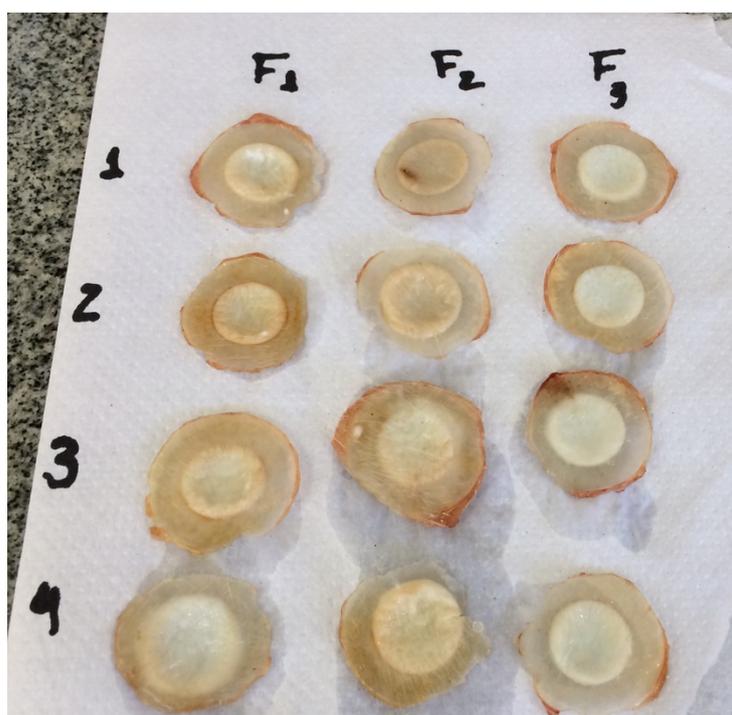
A Figura 6 apresenta uma fotografia do experimento *in vitro* de permeação cutânea utilizando-se as três formulações em estudo, realizado em quadruplicata para cada formulação.



**FIGURA 6.** Formulações dispostas em células de difusão de Franz. Cada linha horizontal indica uma formulação. Experimento em quadruplicata.

Ao final do experimento, a pele de porco foi retirada de cada célula de difusão, esticada e presa sobre um suporte e limpa (Figura 7). Um *template* de plástico com área de

exposição igual a 1 cm<sup>2</sup> foi colocado sobre a pele de modo a deixar exposta somente a área de transporte do fármaco. O estrato córneo desta região foi removido com o auxílio de 15 fitas adesivas, aderidas, pressionadas e removidas em um único movimento da superfície da pele. As 15 fitas foram colocadas todas em tubos tipo Falcon, e adicionou-se 5 mL de metanol, de onde a progesterona foi extraída sob agitação por 24 h. Esta suspensão foi filtrada em filtros com porosidade de 0,22 µm e levada para quantificação. A pele remanescente foi cortada em pequenos pedaços e colocada em tubo plástico juntamente com o solvente extrator do fármaco. Após 24 h, filtrou-se a solução de extração e a quantidade retida na epiderme viável foi quantificada por CLAE.



**FIGURA 7.** Peles de suínos retiradas das células de Franz após o estudo de permeação *in vitro* com as formulações: F1) BIOVEA, F2) Manipulada B e F3) Manipulada A. Os ensaios foram realizados em quaduplicata.

### **3.6 Ensaios de equivalência farmacêutica das formulações**

O teor das formulações foi realizado com o objetivo de confirmar a concentração informada por seus respectivos fabricantes de 20 mg/mL. Para isso, pesou-se 0,1 g de cada formulação e posteriormente diluiu-se em metanol em balão volumétrico de 100 mL. Diluiu-se novamente em metanol em balão volumétrico de 10 mL, coletou-se uma alíquota de 1mL e filtrou-se em membranas com porosidade de 0,22  $\mu$ m. A solução foi então levada para quantificação em CLAE.

A densidade foi determinada em triplica por meio de cálculo de densidade relativa utilizando-se seringa de 1 mL para medição das massas volumétricas. Assim, pesou-se primeiro a seringa vazia e posteriormente com 1mL de água. Após, para cada formulação, pesou-se novamente a seringa vazia e posteriormente ela completa com 1 mL de cada formulação.

Por fim, o pH das formulações foi analisado em pHmetro acoplado a uma sonda própria para aferição em sistemas semissólidos. Assim, a sonda foi colocada em cada uma das formulações em triplicata. A análise foi feita em temperatura ambiente.

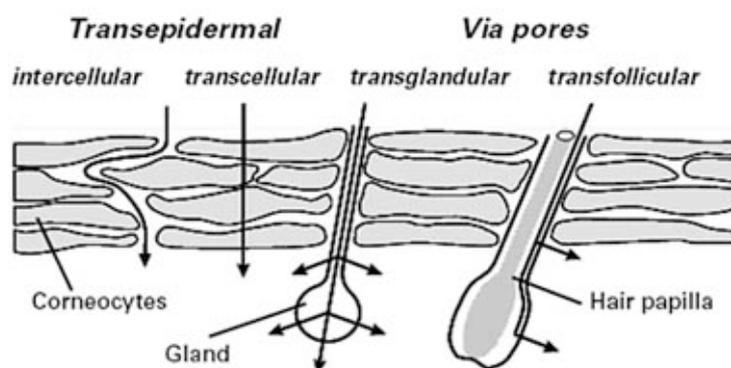
### **3.7 Análise estatística dos dados**

Os dados quantitativos estão apresentados nas Tabelas e Figuras como média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 a 5 replicatas. As regressões lineares foram obtidas com a utilização do programa Microsoft Excel 2007. A análise estatística dos dados foi realizada com auxílio do programa GraphPad Prism, seguido do teste de Tukey com comparação múltipla dos dados. O nível de significância estatística foi fixado como sendo  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A absorção de fármacos pela via percutânea envolve um processo de difusão através do estrato córneo, das células viáveis da epiderme e, finalmente, das camadas superiores da derme até à microcirculação, sendo que o passo determinante da absorção é a permeação através do estrato córneo lipofílico.

Existem, então, duas vias potenciais de passagem do fármaco: a via transcelular (por dentro das células) e a intercelular (por entre as células) (Figura 8) e, em ambas as vias de permeação, a estrutura do estrato córneo obriga o fármaco a se difundir através das bicamadas lipídicas intercelulares e essa capacidade depende da sua lipofilia e tamanho da molécula (MARTINS; VEIGA, 2002).



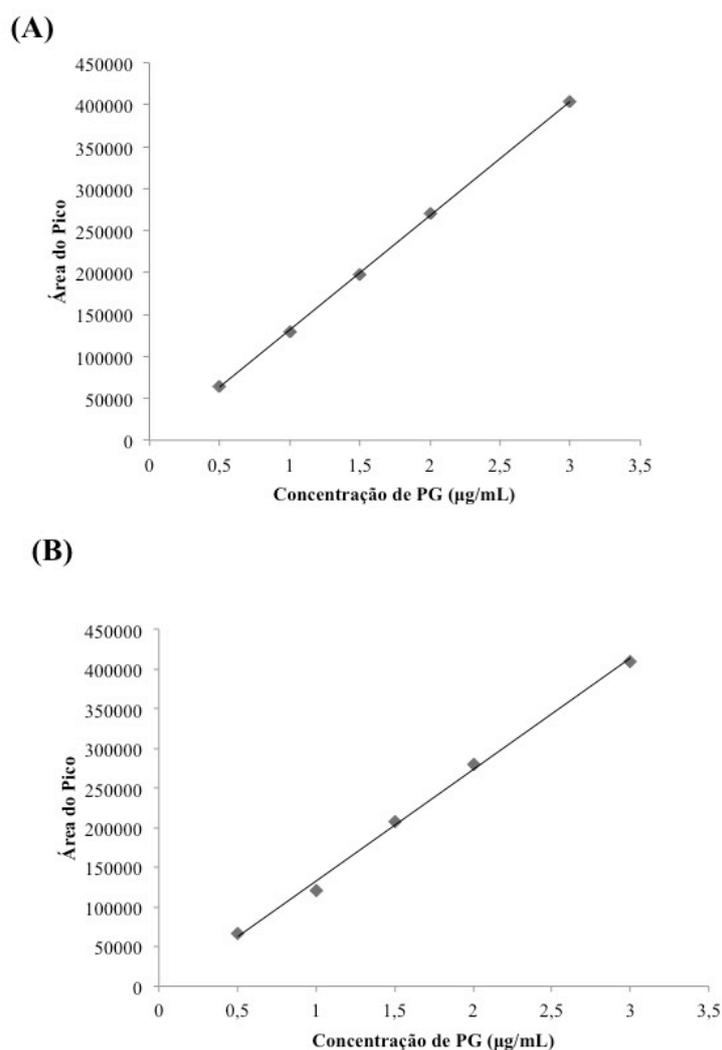
**FIGURA 8.** Ilustração esquemática demonstrando diferentes maneiras de penetração de fármacos pelo estrato córneo (Trommer, 2006).

As razões pelas quais os hormônios esteroides podem ser utilizados pela via dérmica é que são moléculas potentes e altamente lipossolúveis. Assim, baixas dosagens conseguem alcançar níveis terapêuticos no sangue. Acredita-se que a permeação dos hormônios ocorra por carregamento do estrato córneo com o hormônio ativo, que então se difunde lentamente em direção aos capilares sanguíneos da derme (). Embora os hormônios esteroides sejam derivados do colesterol e este se associe fortemente à membrana plasmática, modulando sua fluidez, o mesmo não ocorre com os esteroides, pois, ao invés

de incorporarem-se à membrana, eles facilmente difundem para dentro da célula passando através da membrana (OREN, 2004).

#### 4.1 Padronização do método analítico

As curvas analíticas obtidas por CLAE para análise da progesterona tanto dissolvida em metanol (solvente extrator para ensaios de retenção cutânea do fármaco) quanto dissolvida no meio receptor estão apresentadas na Figura 9 abaixo.



**FIGURA 9.** Representação gráfica das curvas analíticas obtida para a progesterona (PG) por CLAE. (A) amostras diluídas em metanol. Equação da reta:  $y = 136246x - 4606$  e coeficiente de correlação linear:  $r = 0,9997$ . (B) amostras diluídas em solução de tampão fosfato/propilenoglicol na proporção 60:40 (v/v). Equação da reta:  $y = 140636x - 7931,6$  e coeficiente de correlação linear:  $r = 0,9964$ .

Observa-se que a linearidade do método analítico previamente validado foi mantida mesmo mudando-se os solventes, uma vez que a regressão linear das curvas obtidas para a progesterona em ambos os solventes resultou em coeficientes de correlação superiores ao estabelecido pela Anvisa, que é de 0,99 (ANVISA, 2003).

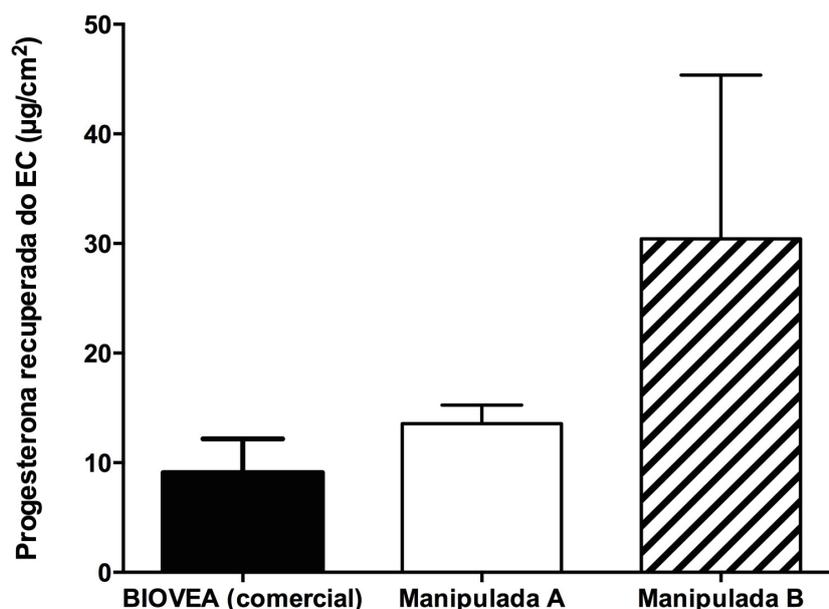
Comparando-se as curvas, nota-se que com a mudança do solvente das amostras de progesterona a alteração nos coeficientes angulares foi pequena, variando apenas 3% (136246 para a curva em metanol *versus* 140636 para a curva no fluido receptor). Mesmo assim, para se evitar incorrer em erros experimentais, optou-se por usar curvas de calibração diferente para cada solvente utilizado nas amostras do hormônio.

#### **4.2 Estudos *in vitro* de permeação cutânea**

Os estudos de permeação cutânea foram realizados por um período total de 48h horas, com coletas da fase receptora em intervalos de tempo determinados: 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 30 h, 36 h e 48 h. Após as 48 horas do experimento, o fármaco foi extraído do estrato córneo e da epiderme viável. O processo de extração do fármaco das camadas da pele suína foram validados previamente por Quintão e colaboradores (QUINTAO et al., 2015).

Não foi possível se determinar a quantidade permeada da progesterona para o fluido receptor, uma vez que ela ocorreu em concentrações abaixo do limite de quantificação do método analítico [que era de 0,5 µg/mL (QUINTAO et al., 2015)]. A biodisponibilidade tópica da progesterona entre as formulações testadas, portanto, foi analisada em termos das quantidades do hormônio recuperadas das camadas da pele (estrato córneo e epiderme viável) após o tempo experimental de 48 h.

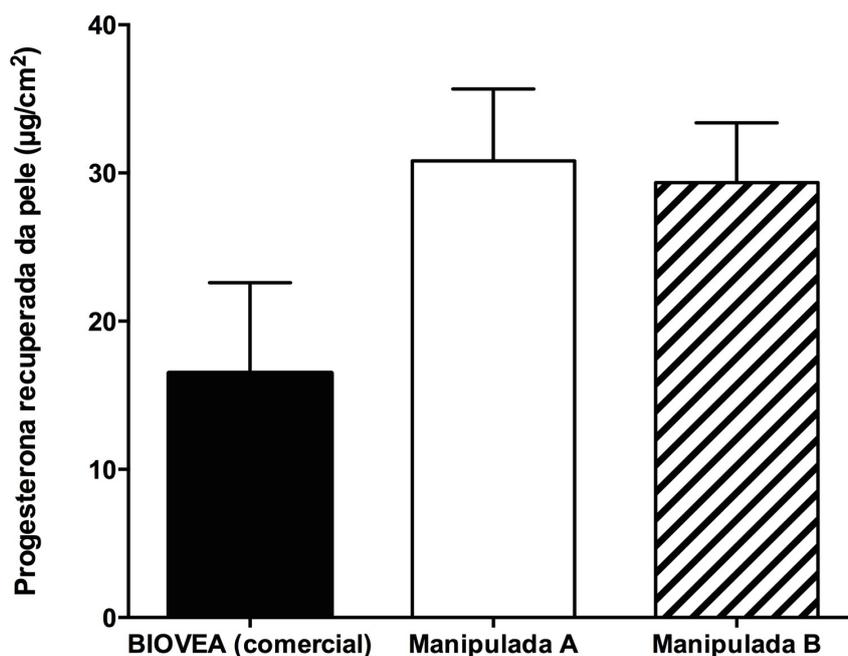
Na Figura 10 observa-se a penetração de progesterona no estrato córneo após tratamento da pele por 48 h com cada uma das três formulações testadas *in vitro*.



**FIGURA 10.** Quantidade de progesterona recuperada do estrato córneo (EC) da pele a partir das formulações BIOVEA, Manipulada A e Manipulada B. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão da média obtidas a partir de 4 replicatas.

Na comparação individual de cada formulação, a fórmula da BIOVEA teve menor retenção do hormônio no estrato córneo ( $8,44 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), não diferente estatisticamente ( $p < 0,05$ ) da retenção proporcionada pela fórmula manipulada Manipulada A ( $13,07 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). A formulação manipulada B, por sua vez, levou a um acúmulo de  $26,61 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de progesterona no estrato córneo, o que representa um aumento significativo ( $p > 0,05$ ) de 2 vezes com relação às demais formulações.

Na Figura 11 estão apresentados dados de penetração de progesterona nas camadas mais profundas da epiderme e derme (pele remanescente, sem estrato córneo) após tratamento da pele por 48 h com cada uma das três formulações testadas *in vitro*.



**FIGURA 11.** Quantidade de progesterona recuperada da pele remanescente (sem EC) a partir das formulações BIOVEA, Manipulada A e Manipulada B. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão da média obtidas a partir de 4 replicatas.

Novamente, a formulação comercial demonstrou uma menor difusão da progesterona para a epiderme viável ( $18,22 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), uma vez que a penetração ocasionada pelas formulações manipuladas foi maior que pela BIOVEA ( $30,23 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para a Manipulada A e  $29,55 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para a Manipulada B). Esse aumento observado foi estatisticamente significativo.

No rótulo do produto BIOVEA não está especificado o uso de nenhum promotor de permeação cutânea na formulação. Já as formulações manipuladas, pelos resultados obtidos, indicam a presença de promotores sendo estes o motivo principal das formulações Manipuladas A e B terem aumentado significativamente em aproximadamente 60% a permeação da progesterona para as camadas mais profundas da pele.

De fato, os promotores de permeação cutânea são incorporados às formulações com intuito de incrementar a difusão do fármaco através da pele (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).

Neste estudo, se considerarmos a formulação comercial como referência, o método *in vitro* de permeação cutânea utilizado teria reprovado as formulações magistrais por terem ocasionado diferenças significativas na biodisponibilidade dérmica. Infere-se, no entanto, que o método *in vitro* de permeação cutânea é um método relativamente simples (se comparados e testes de *endoint* clínico) e capaz de prever a biodisponibilidade transdérmica, uma vez que demonstrou ser capaz de fazer essa diferenciação entre os perfis de penetração entre as formulações testadas.

Para concluirmos esse estudo, verificamos a equivalência farmacêutica entre as formulações, como hoje é exigido pela Anvisa (ANVISA, 2011).

### **4.3 Equivalência farmacêutica entre as formulações**

A equivalência farmacêutica entre as formulações testadas foi analisada em termos de teor, pH e densidade. A Tabela 1 mostra os resultados referente ao teor de progesterona determinado para as três formulações.

**TABELA 1.** Concentrações teórica e obtida de progesterona nas formulações BIOVEA, Manipulada B e Manipulada A para determinação do teor.

<b>Formulação</b>	<b>C. teórica (mg/mL)</b>	<b>C. obtida (mg/mL)</b>	<b>Teor (%)</b>
<b>BIOVEA</b>	0,05	0,05 ± 0,0012	99,9%
<b>Manipulada A</b>	0,05	0,03± 0,0011	60,0%
<b>Manipulada B</b>	0,05	0,04± 0,0024	80,0%

A formulação BIOVEA apresentou a mesma concentração do rótulo estando, portanto, dentro das especificações dadas pelo fornecedor. Já formulações manipuladas apresentaram concentrações bem diferente da prescrita: Manipulada B continha 0,04 mg/mL, portanto 20% menor que a prescrição, e a formulação Manipulada A mostrou um teor igual a 0,03 mg/mL, ou seja, um teor 40% inferior ao prescrito.

Os dados de pH e densidade das formulações estão apresentados na Tabela 2.

**TABELA 2.** pH e densidade das formulações BIOVEA, Manipulada A e Manipulada B.

<b>Formulação</b>	<b>pH</b>	<b>Densidade (g/mL)</b>
<b>BIOVEA</b>	6,4± 0,005	0,63± 0,030
<b>Manipulada A</b>	6,7 ± 0,005	1,01± 0,006
<b>Manipulada B</b>	5,4 ± 0,011	0,77± 0,011

O pH das formulações BIOVEA e Manipulada A foram 6,4 e 6,7 respectivamente apresentaram pH próximo à neutralidade. Já a formulação Manipulada B apresentou pH ligeiramente ácido (5,4) o que poderia causar irritações no paciente, visto que o pH ideal

de uma formulação é padronizado de acordo com o pH de estabilidade dos componentes ativos utilizados e o de tolerância biológica para produtos cutâneos (5,5 a 8,0) (SILVA, 2006). Quanto à densidade, as formulações, muito provavelmente pela diferenças nas composições, apresentaram valores de densidade bem distintos entre si.

Os dados de teor, pH e densidade, em conjunto, portanto, indicam não haver equivalência entre as formulações testadas. Como visto anteriormente, essa falta de equivalência refletiu nos estudos de permeação cutânea *in vitro*.

#### **4.4 Biodisponibilidade e Bioequivalência**

Para um medicamento ser registrado como genérico ou similar, deve ser demonstrado o mesmo grau de eficácia, segurança e qualidade que o produto inovador. A comprovação da eficácia e segurança desses produtos é dada por meio dos estudos de equivalência farmacêutica e bioequivalência que são feitos por meio de quatro tipos de estudos diferentes: farmacocinético, farmacodinâmico, clínicos comparativos ou *in vitro* (ANVISA, 2011).

Comparando-se a legislação brasileira à de outros países, conforme o estabelecido anteriormente por Soares e colaboradores e apresentado na Tabela 3 (SOARES et al., 2015), constata-se falta de rigidez das leis nacionais, a qual exige testes que se resumem àqueles descritos na farmacopeia do produto, como aspecto, teor, identificação, peso médio, pH, viscosidade e densidade. Nos Estados Unidos o *Food Drug and Administration* (FDA), órgão regulador americano, exige estudos clínicos para esse tipo de forma farmacêutica, que podem ser substituídos pelos farmacodinâmicos (estudo de bioequivalência com *endpoints* clínicos, em que é observada uma determinada resposta específica) (SOARES et al., 2015).

Na Europa, o EMA (*European Medicines Agency*) e na Austrália, a agência *Therapeutic Goods Administration* (TGA) requerem, para registro das formulações tópicas semissólidas, a apresentação de estudos clínicos que podem ser substituídos por estudos: farmacodinâmicos, de disponibilidade local ou com animal ou *in vitro* (SOARES et al., 2015).

**TABELA 3.** Comparação das exigências requeridas para registro de medicamentos tópicos (SOARES et al., 2015).

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

## 5 CONCLUSÃO

A análise estatística dos dados obtidos do estudo *in vitro* de permeação cutânea da progesterona mostrou que as formulações analisadas apresentaram diferenças significativas tanto para concentração de progesterona retida no estrato córneo BIOVEA x Manipulada B, quanto para as concentrações retidas na pele remanescente (epiderme) BIOVEA x Manipulada B e BIOVEA x Manipulada A. O teor de progesterona nas formulações manipuladas ficou diferente do relatado em rótulo, o que pode resultar em prejuízo para o usuário. A análise de pH detectou que uma das formulações manipuladas apresentou pH abaixo do recomendado para produtos cutâneos. Apesar de o método *in vitro* de permeação cutânea ter se mostrado eficiente para detectar comparativamente diferenças de biodisponibilidade cutânea de formulações para aplicação na pele, os resultados experimentais indicam falta de padronização e a ausência da garantia de bioequivalência entre as diferentes formulações. Isso é consequência da frágil legislação preconizada pela ANVISA para medicamentos de aplicação na pele, em que a única exigência prevista é o ensaio de equivalência farmacêutica, diferentemente do que é exigido em outros países que adotam regras mais rígidas de controle como a apresentação de ensaios clínicos ou farmacodinâmicos. Uma reavaliação da legislação faz-se necessário frente aos problemas encontrados e aos riscos eminentes na utilização desses medicamentos sem o devido controle de qualidade adequado.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Validação De Métodos Bioanalíticos. Diário Oficial da União 2003; 02 jun.

ANVISA. RDC 31, de 11 de agosto de 2010. Dispõe sobre a realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo. Diário Oficial da União 2010; 12 ago.

ANVISA. RDC 37, de 3 de agosto de 2011. Dispõe sobre o Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. Diário Oficial da União 2011; 4 ago.

ALEXANDER, A.; DWIVEDIB, S.; AJAZUDDINA; GIRIB, T. K.; SARAF, S.; TRIPATHIP, D. K. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. *J Control Release*, v. 164, p. 26-40, 2012.

DAVIS, Susan R.; DEMPSTER, Georgia; BELL, Robin J. The use of micronised progesterone for menopausal hormone therapy, a clinical practice audit. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, 2016.

ELGINDY, Nazik A.; MEHANNA, Mohammed M.; MOHYELDIN, Salma M. Self-assembled nano-architecture liquid crystalline particles as a promising carrier for progesterone transdermal delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 501, n. 1, p. 167-179, 2016.

ELSHAFIE, M. A. A.; EWIES, A. A. A. Transdermal natural progesterone cream for postmenopausal women: inconsistent data and complex pharmacokinetics. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 27, n. 7, p. 655-659, 2007.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M.; LOPEZ, R. F. V. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. *Química Nova*, v. 31, n. 6, p. 1490-1498, 2008.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M.; LOPEZ, R. F. V. Medicação do futuro: iontoforese facilita entrada de fármaco no organismo. **Revista Ciência Hoje**, São Paulo, v.44, n.259, p.20-25, maio. 2009. Editorial.

HOU, Ningqi et al. Hormone replacement therapy and breast cancer: heterogeneous risks by race, weight, and breast density. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 105, n. 18, p. 1365-1372, 2013.

LIU, Bette. Is transdermal menopausal hormone therapy a safer option than oral therapy?. **Canadian Medical Association Journal**, v. 185, n. 7, p. 549-550, 2013.

MARTINS, M. R.F; VEIGA. F; Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para ciclodextrinas. **Rev: brasileira de ciências farmacêuticas**, Vol 38, nº1, jan/mar, 2002

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.

MATOS, B. N. Desenvolvimento de uma formulação tópica contendo nanopartículas de quitosana como estratégia para aumentar a penetração folicular do minoxidil sulfato no tratamento da alopecia androgênica. Dissertação (mestrado). Universidade de Brasília, 2014.

MATOS, B. N.; REIS, T. A.; GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M. Chitosan nanoparticles for targeting and sustaining minoxidil sulphate delivery to hair follicles. **Int J Biol Macromol**. v.75, p. 225–9, 2015.

PRIOR, JC; et al. Progesterone Therapy, Endothelial Function and Cardiovascular Risk Factors: A 3-Month Randomized, Placebo-Controlled Trial in Healthy Early Postmenopausal Women. **PLoS ONE**. 9, 1, 1-9, Jan. 2014. ISSN: 19326203.

PRIOR, Jerilynn C. Progesterone or progestin as menopausal ovarian hormone therapy: recent physiology-based clinical evidence. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 22, n. 6, p. 495-501, 2015.

QUINTAO, Wanessa de Souza Cardoso et al . Influence of monoolein on progesterone transdermal delivery. **Braz. J. Pharm. Sci.**, São Paulo , v. 51, n. 4, p. 923 - 929, Dec. 2015.

RUAN, Xiangyan; MUECK, Alfred O. Systemic progesterone therapy—Oral, vaginal, injections and even transdermal?. **Maturitas**, v. 79, n. 3, p. 248-255, 2014.

SCHIERBECK, Louise Lind et al. Effect of hormone replacement therapy on cardiovascular events in recently postmenopausal women: randomised trial. **Bmj**, v. 345, p. e6409, 2012.

SOARES, Kelen Carine Costa et al. Bioequivalence of dermatological topical medicines: the Brazilian scenario and the challenges for health surveillance. **Ciencia & saude coletiva**, v. 20, n. 11, p. 3599-3608, 2015.

SILVA, Penildon. *Farmacologia*. 7ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006

SILVA, José ALEXSANDRO et al. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas básica e aplicada**, v. 31, n. 3, p. 125-131, 2010.

SWEETMAN, Sean C. **Martindale: the complete drug reference**. Pharmaceutical press, 2009.

YOO, Jin-Wook; LEE, Chi H. Drug delivery systems for hormone therapy. **Journal of controlled release**, v. 112, n. 1, p. 1-14, 2006.