



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

MARIA RAQUEL CAMBUÍ MURAGUCHI

**ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE POMADA DE
TRIANCIOLONA ACETONIDA:
CÉLULA DE DIFUSÃO X APARATO 4**

MARIA RAQUEL CAMBUÍ MURAGUCHI

**Estudo de liberação *in vitro* de pomada de triancinolona
acetonida: célula de difusão x aparato 4**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da
Farmacêuticas do Centro de Ciência da
Saúde da Universidade Estadual de
Londrina

Orientadora: Profª. Drª. Rúbia
Casagrande

Londrina, PR

2024

**Estudo de liberação *in vitro* de pomada de triancinolona acetônida:
célula de difusão x aparato 4**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Estadual de Londrina

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Rúbia Casagrande
Orientadora
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Marcela Maria Baracat
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Renata Micheli Martinez
Universidade Estadual de Londrina

Universidade Estadual de Londrina
Londrina, ____ de ____ de 2024.

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, meu esposo e ao meu irmão por
sempre acreditarem em mim e estarem ao meu lado
me apoiando.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pela vida e pelas grandes oportunidades que Ele coloca no meu caminho.

A minha orientadora, Profa. Dra. Rubia Casagrande, por ter aceitado o desafio de me orientar à distância. Agradeço também por todas as suas explicações, conhecimento compartilhado, além da paciência e compreensão que teve comigo durante todo este período. Muito obrigada.

Ao meu esposo, meu grande companheiro, Camilo Muraguchi, por ter me apoiado na decisão e por também por todo apoio que me deu durante o mestrado, sempre me dando forças.

Aos meus pais, Flávio e Gislaine, por se orgulharem de mim e por terem me dado toda a base para que eu tivesse a melhor educação possível, o que me permitiu me formar em uma das melhores universidades do país. Vocês são incríveis.

Ao meu irmão, Luiz Neto; minha cunhada, Laura, e minhas sobrinhas Maria Clara e Luiza. Obrigada por todo o apoio.

A todos os meus colegas de trabalho, que me ajudaram durante essa fase. Em especial à Amabili, Márcia, Andressa, Rebeca e Giulia que me auxiliaram nos experimentos.

Agradeço também a Priscila Chiamulera, minha supervisora na época que iniciei o mestrado, por ter me dado todo o apoio e incentivo para que eu ingressasse nesta jornada, me auxiliando também na escolha do tema. Muito obrigada.

CAMBUÍ, Maria Raquel. Estudo de liberação *in vitro* de pomada de triancinolona acetonida: célula de difusão x aparato 4. 2024. 59p. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná.

RESUMO

A administração de formas farmacêuticas semissólidas pela via tópica apresenta algumas vantagens em relação a outras vias por ser um método não invasivo e o fármaco não sofre metabolismo de primeira passagem. Considerando a importância deste tipo de formulação, alguns ensaios analíticos devem ser realizados para assegurar a qualidade do medicamento. Quando se trata de um medicamento genérico semissólido, devem ser realizados o estudo de equivalência farmacêutica e o perfil de liberação da formulação. Para avaliação do perfil de liberação, a Farmacopeia Americana traz que podem ser utilizados equipamentos como célula de difusão vertical (célula de Franz) e célula de fluxo contínuo (aparato USP 4). Portanto, o objetivo desse estudo foi desenvolver um método para avaliação do perfil de liberação da pomada de triancinolona acetonida e comparar os resultados obtidos em célula de Franz e em aparato 4. Para isto, foi avaliada a solubilidade do fármaco e a interferência da membrana utilizada no estudo. A comparação entre os métodos foi realizada por meio da repetibilidade e da precisão intermediária. Além disso, também foi avaliada uma formulação proposta a medicamento genérico, que teve a sua liberação comparada ao medicamento de referência utilizando o aparato 4. O resultado do estudo de solubilidade demonstrou que o aumento da concentração de etanol absoluto na solução receptora leva ao aumento da solubilidade da triancinolona acetonida. A solução receptora mais adequada para avaliação do perfil de liberação da triancinolona acetonida foi a saliva simulada pH 6,8 (70%) + etanol absoluto (30%) e membrana de nylon 0,45 μm . Os resultados indicaram semelhança entre os equipamentos, portanto, independente se escolhido aparato 4 ou célula de Franz, o resultado obtido na avaliação do perfil de liberação da triancinolona acetonida pomada não mostrou diferença. No entanto, o método que apresentou resultados de liberação do fármaco mais precisos foi por aparato 4, uma vez que apresentou menores valores

de DPR (desvio padrão relativo) tanto para repetibilidade, quanto para a precisão intermediária, quando comparado à célula de Franz. Por fim, a avaliação da formulação proposta a medicamento genérico utilizando o aparato 4 demonstrou que há semelhança com o perfil de liberação do medicamento de referência. Assim, a mesma estaria apta a ser registrada na Anvisa.

Palavras chave: estudos de liberação de fármacos; célula de Franz; aparato 4; triancinolona acetonida; equivalência farmacêutica.

CAMBUÍ, Maria Raquel. *In vitro* release study of triamcinolone acetonide ointment: diffusion cell x apparatus 4. 2024. 59p. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná.

ABSTRACT

The administration of semi-solid pharmaceutical forms topically has several advantages, which are due to the fact that the drug does not undergo first-pass metabolism and because it is a non-invasive method. Considering the importance of this type of formulation, some analytical tests must be carried out to ensure the quality of the medicine. When it is a semi-solid generic medicine, the analytical tests to be evaluated must be carried out considering pharmaceutical equivalence and release profile studies. To evaluate the release profile, the American Pharmacopoeia states that equipment such as vertical diffusion cell (Franz cell) and continuous flow cell (USP 4 apparatus) can be used. Therefore, the objective of this study was to develop a method to evaluate the release profile of triamcinolone acetonide ointment and compare the results obtained in Franz cells and in apparatus 4. For this, the solubility of the drug and the interference of the membrane used were evaluated. In the study. Comparison between methods was carried out using repeatability and intermediate precision. In addition, a formulation proposed for a generic medicine was also evaluated, which was released compared to the reference medicine. The result of the solubility study demonstrated that the solubility of triamcinolone acetonide increases with increasing absolute ethanol concentration in the receiving solution. The most suitable receptor solution for evaluating the release profile of triamcinolone acetonide was simulated saliva pH 6.8 (70%) + absolute ethanol (30%) and 0.45 μm nylon membrane. The results indicated similarity between the equipment, therefore, regardless of whether apparatus 4 or Franz cell was chosen, the result obtained in the evaluation of triamcinolone acetonide ointment was the same. However, the method that presented the most accurate results was using apparatus 4, as it presented lower DPR values for both repeatability and intermediate precision, when compared to the Franz cell. Finally, the evaluation of the formulation proposed for a generic medicine

demonstrated that there is similarity with the release profile of the reference medicine. Thus, it would be able to be registered with Anvisa.

Keywords: drug release studies; Franz cell; apparatus 4; triamcinolone acetonide; pharmaceutical equivalence

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura molecular da triancinolona acetonida.....	15
Figura 2: Célula de difusão vertical.	19
Figura 3: Esquema da célula de difusão vertical.....	19
Figura 4: Esquematização do sistema aberto.....	21
Figura 5: Esquematização do sistema fechado.....	21
Figura 6: Célula de fluxo contínuo.	22
Figura 7: Demonstração dos componentes da célula.	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DPR	Desvio padrão relativo
Et	Etanol absoluto
FDA	Food and Drug Administration
IFA	Insumo farmacêutico ativo
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
SCB	Sistema de classificação biofarmacêutica
SS	Saliva simulada
TA	Triancinolona Acetonida
PET	Poliéster
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
USP	United States Pharmacopoeia

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. A PELE E A MUCOSA ORAL	13
1.2. FORMAS FARMACÊUTICAS SEMISSÓLIDAS	14
1.3. TRIANCINOLONA ACETONIDA.....	14
1.4. MEDICAMENTOS GENÉRICOS	15
1.5. AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS DE FORMAS FARMACÊUTICAS SEMISSÓLIDAS.....	17
1.6. CÉLULA DE DIFUSÃO VERTICAL (CÉLULA DE FRANZ).	18
1.7. CÉLULA DE FLUXO CONTÍNUO (APARATO USP 4).....	20
2. OBJETIVOS.....	23
2.1. OBJETIVO GERAL.....	23
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1. MATERIAIS	24
3.1.1. Reagentes.....	24
3.1.2. Equipamentos	24
3.2. MÉTODOS.....	24
3.2.1. Solubilidade.....	24
3.2.2. Análise em célula de difusão vertical	26
3.2.3. Análise em célula de fluxo contínuo	27
3.2.4. Método de quantificação das amostras do produto acabado	27
3.2.5. Avaliação das precisões dos métodos.....	27
3.2.6. Análise estatística dos resultados	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO – ARTIGO CIENTÍFICO	29
Comparação de métodos de estudo de liberação in vitro de formas farmacêuticas semissólidas de medicamentos proposto a genérico e referência.....	29
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
6. REFERÊNCIAS	65
7. ANEXOS.....	69

1. INTRODUÇÃO

1.1.A PELE E A MUCOSA ORAL

A pele é o maior órgão do corpo humano e a principal barreira de proteção do organismo contra agressores externos, tais como microrganismos patógenos, substâncias químicas e a radiação ultravioleta. Além disso, também apresenta a função de impedir a perda excessiva de água e eletrólitos do corpo, além de ser importante na regulação da temperatura corporal (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005; FONSECA et al., 2011; KHAVKIN; ELLIS, 2011).

A pele é constituída por duas camadas: epiderme e derme, sendo a epiderme a camada mais externa e a derme a mais interna. A epiderme pode ser definida como um epitélio escamoso estratificado que sofre constante renovação (FONSECA et al., 2011a; KHAVKIN; ELLIS, 2011). O estrato córneo está presente nesta camada e sua principal função é agir como uma barreira, o que dificulta a permeação de fármacos pelas camadas mais internas da pele (MOREIRA, 2018). As principais células presentes na epiderme são os queratinócitos que representam aproximadamente 95% da sua composição (FONSECA et al., 2011a; KHAVKIN; ELLIS, 2011).

A derme está localizada sob a epiderme, sendo composta principalmente por colágeno, além de apresentar vasos sanguíneos e terminações nervosas (KHAVKIN; ELLIS, 2011). Esta camada é responsável por fornecer suporte mecânico para a epiderme (FISHER et al., 1997). Além disso, na derme estão presentes folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas. Uma grande quantidade de células imunes e fibroblastos, que participam ativamente de muitas respostas fisiológicas na pele, também estão presentes na derme (D'ORAZIO et al.).

Além de possuir a função de barreira, a pele pode ser utilizada como alternativa para a administração de medicamentos, visando a via tópica ou transdérmica. Na via tópica, a partir da forma farmacêutica o fármaco pode chegar até a parte superficial da derme, enquanto na via transdérmica, o mesmo pode atingir até a hipoderme, além de alcançar os vasos sanguíneos e poder ser absorvido, apresentando efeito sistêmico (MOREIRA, 2018).

Além da pele, a mucosa oral também pode ser utilizada como via tópica para a administração de fármacos. A mucosa que reveste a cavidade oral é constituída de uma camada de epitélio externo, estratificado e escamoso, apoiado por uma membrana basal e a lâmina própria, formada por tecido conjuntivo (DIAZ-DEL, 2005). O epitélio varia de acordo com a localização, sendo que as áreas sujeitas a mais esforços mecânicos, como gengiva e palato, são mais queratinizadas, sendo semelhantes a epiderme, enquanto a mucosa de revestimento, como das bochechas, lábio e soalho da boca, o epitélio é menos queratinizado, sendo mais permeável (DIAZ-DEL, 2005).

1.2. FORMAS FARMACÊUTICAS SEMISSÓLIDAS

As formas farmacêuticas semissólidas são as mais utilizadas para administração por via tópica. Estas formulações podem ser caracterizadas como pomadas, géis e cremes (AULTON, 2016).

As pomadas são formulações oleosas que normalmente são oclusivas. Esta forma farmacêutica tende a aumentar a hidratação do estrato córneo, o que auxilia no fluxo transdérmico do fármaco. Já os géis são formados a partir de um agente espessante inserido em uma fase líquida, podendo conter o fármaco dissolvido ou disperso (AULTON, 2016).

Por fim, os cremes são emulsões de duas fases, podendo ser água em óleo (oleosos) ou óleo em água. Os cremes oleosos, em comparação às pomadas, são menos gordurosos e possuem maior facilidade de aplicação e lavagem, entretanto, são menos oclusivos (AULTON, 2016).

A escolha do tipo de formulação depende das características físico-químicas do fármaco, assim como do objetivo terapêutico.

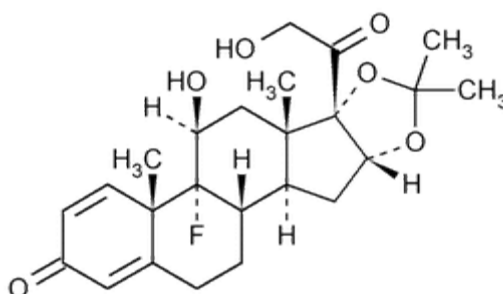
1.3. TRIANCINOLONA ACETONIDA

A triancinolona acetona é um fármaco corticosteroide sintético, que possui ação anti-inflamatória, antipruriginosa e antialérgica (ASPEN, 2023). A droga também é indicada para o tratamento de várias doenças da pele, como a dermatite atópica,

dermatite de contato, eczema, psoríase, afta ou úlcera, e muitos outros (SIDHU; PREUSS, 2022).

A sua estrutura molecular está representada na Figura 1.

Figura 1: Estrutura molecular da triancinolona acetonida.



Fonte: USP (2022c).

A triancinolona acetonida possui estrutura molecular $C_{24}H_{31}FO_6$, peso molecular 434,50 g/mol e valor de pKa igual a 12,87 (SANTER, 2018), é moderadamente solúvel em álcool desidratado, em clorofórmio e em metanol, entretanto, é praticamente insolúvel em água (USP, 2022).

O insumo farmacêutico ativo demonstra atividade anti-inflamatória e imunossupressora por meio da inibição da enzima fosfolipase A2, na camada fosfolipídica da membrana celular, impedindo assim a quebra das membranas lisossômicas dos leucócitos e a formação do ácido araquidônico (SIDHU; PREUSS, 2022).

De acordo com a lista de medicamentos de referência da Anvisa, no Brasil a triancinolona acetonida é comercializada nas formas farmacêuticas de solução spray nasal, suspensão spray nasal ou pomada (ANVISA, 2023).

1.4. MEDICAMENTOS GENÉRICOS

A Lei dos Genéricos foi implementada no Brasil em 10 de fevereiro de 1999, onde estabeleceu que o medicamento genérico é similar e intercambiável ao medicamento de referência (ARAÚJO, 2010). Dessa forma, o medicamento genérico deve apresentar o mesmo fármaco, na mesma dose e mesma forma farmacêutica que o medicamento de referência, além de ser necessária a comprovação da equivalência

farmacêutica e bioequivalência. A equivalência farmacêutica é comprovada através de ensaios *in vitro*, enquanto a bioequivalência comprova-se por meio de ensaios *in vivo* (ARAÚJO, 2010).

A normativa que trata sobre o registro de medicamentos genéricos no Brasil é a RDC 753, de 28 de setembro de 2022. Esta resolução dispõe sobre o registro de medicamentos de uso humano com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como novos, inovadores, genéricos ou similares.

De acordo com a legislação, para o registro de medicamento genérico, devem ser realizados os ensaios de bioequivalência, equivalência farmacêutica e perfil de dissolução comparativo. Todos estes devem ser realizados entre o medicamento genérico proposto frente ao seu medicamento de referência. Entretanto, em alguns casos, não se faz necessário o estudo de bioequivalência, dessa forma, deve ser conduzido o estudo de bioisenção (ANVISA, 2022b).

A bioisenção é definida como a substituição dos estudos de bioequivalência *in vivo* por estudos *in vitro* (ARRUNÁTEGUI, 2015). As Agências Regulatórias de cada país determinam os seus próprios critérios para a bioisenção. No Brasil, a RDC nº 749 de 2022, dispõe sobre a isenção de estudos de bioequivalência/ biodisponibilidade relativa. Esta norma descreve que existem três formas possíveis para a bioisenção de um medicamento, sendo elas (ANVISA, 2022a):

1) Bioisenção em razão da forma farmacêutica, via de administração ou local de ação. Neste caso, o estudo *in vivo* pode ser dispensado para soluções, de modo geral, medicamentos inalatórios orais administrados via nebulizadores, formas farmacêuticas de aplicação tópica que não sejam destinadas ao efeito sistêmico e medicamentos de uso oral que contenham fármacos destinados à ação local;

2) Bioisenção para as demais concentrações. Neste contexto, é necessário realizar o estudo *in vivo*, geralmente com a maior dose do medicamento proposto, e o estudo *in vitro* para as demais dosagens;

3) Bioisenção baseada no sistema de classificação biofarmacêutica (SCB). Neste âmbito, é possível bioisentar medicamentos administrados por via oral que contenham fármaco com alta solubilidade e alta ou baixa permeabilidade, ou seja, fármacos pertencentes à classe I ou III, respectivamente, do SCB.

Na maioria dos casos de bioisenção de medicamentos, os estudos *in vitro* exigidos envolvem também o perfil de dissolução comparativo. Entretanto, dependendo da forma farmacêutica, este estudo pode não ser aplicável.

1.5. AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS DE FORMAS FARMACÊUTICAS SEMISSÓLIDAS

O perfil de dissolução comparativo é exigido pela ANVISA para o registro de medicamentos genéricos, sendo uma ferramenta de avaliação da formulação *in vitro*. O princípio da técnica de dissolução se dá pelo qual o fármaco em estado sólido é dissolvido em um meio de dissolução, formando uma solução final, onde é possível definir a taxa de dissolução do mesmo (MARCOLONGO, 2003). Além disso, o ensaio de dissolução tem o objetivo de avaliar a quantidade de fármaco disponível para ser absorvido (ANVISA, 2021).

Tendo em vista o princípio da técnica, o teste de dissolução é aplicável para formulações no qual o fármaco precisa se dissolver para ser absorvido no trato gastrointestinal. Dessa forma, o teste se aplica para formas farmacêuticas sólidas, de modo geral como por exemplo comprimidos, cápsulas e supositórios (MARCOLONGO, 2003). Além disso, o teste também é aplicável para suspensões (MARCOLONGO, 2003), uma vez que nesta forma farmacêutica o insumo farmacêutico ativo (IFA) se encontra disperso em uma fase contínua (AULTON, 2016).

Posto isto, o teste de dissolução não é aplicável para formas farmacêuticas semissólidas de aplicação tópica. Por outro lado, existem algumas maneiras de avaliar a performance *in vitro* destas formulações.

De modo geral, quando se trata de produtos de aplicação tópica, a atividade termodinâmica do fármaco deve ser suficiente para que ele seja liberado da formulação para o estrato córneo, quando aplicado na pele (ANVISA, 2021). Entretanto, sabe-se que os excipientes em formulações semissólidas podem ter a função de base carreadora de ativos (SCHMITT, 2015), ou seja, têm a função de modular a liberação do IFA. Além disso a forma de preparo e tempo de repouso impactam diretamente na reologia de semissólidos (LAHOUD, 2010). Portanto, a

liberação do fármaco a partir da formulação genérica deve ser avaliada para assegurar a intercambialidade com o medicamento de referência.

A avaliação da liberação de semissólidos é realizada através de uma célula de difusão, no qual uma camada espessa da formulação é inserida em um compartimento em contato com uma membrana sintética, estando esta junto a uma solução receptora. Durante a análise, o IFA se difunde da formulação e atravessa a membrana para o reservatório contendo a solução receptora. A quantidade da droga liberada é calculada em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ pelo tempo, e deve ser comparada estatisticamente ao medicamento de referência (USP, 2023).

Para esta avaliação, a Farmacopeia Americana mostra que podem ser utilizados os aparatos de célula de difusão vertical (célula de Franz), célula de imersão ou célula de fluxo contínuo (aparato USP 4).

1.6. CÉLULA DE DIFUSÃO VERTICAL (CÉLULA DE FRANZ).

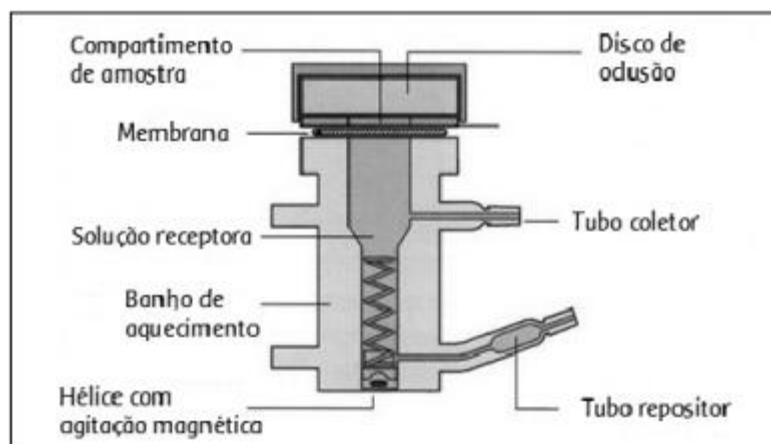
A célula de Franz também é conhecida como célula de difusão vertical. O equipamento foi idealizado por Thomas J. Franz em meados de 1970. Em um primeiro momento, o objetivo do trabalho era correlacionar a absorção através da pele de compostos tóxicos para o corpo humano, tentando correlacionar a avaliação *in vitro* com os dados *in vivo* (FRANZ, 1975), mas com o tempo a técnica foi sendo aplicada para avaliação de formulações de medicamentos.

Esta técnica é utilizada para avaliação de formulações semissólidas, assim como para adesivos transdérmicos (PRAÇA, 2010). A célula de difusão vertical está apresentada nas Figuras 2 e 3.

Figura 2: Célula de difusão vertical.



Figura 3: Esquema da célula de difusão vertical



Fonte: Adaptada de SERAFIM (2013).

O equipamento, conforme demonstrado na Figura 2, é composto pelos módulos de controle de rotação e temperatura, banho de aquecimento com circulação, béquer enjaquetado, mesa de agitação e as células. Nos módulos de controle de rotação e temperatura são selecionados os parâmetros do método. No compartimento de banho de aquecimento encontra-se a água, que permanece aquecida conforme temperatura selecionada, no bequer enjaquetado é mantida a solução receptora

aquecida para reposição da solução durante a análise. Por fim, a mesa de agitação promove a rotação de acordo com o selecionado no módulo de agitação e, acima dela, se encontram as células montadas com as amostras.

A Figura 3 representa a composição da célula. No compartimento da amostra existem dois discos o de acrílico e o de oclusão, ambos têm a função de posicionar corretamente a amostra. Neles, cabem cerca de 300 mg de amostra, uma vez que o orifício tem 1,5 mm de altura e 15 mm de espessura (USP, 2024). Além disso, não é recomendado a utilização de menos que 200 mg de amostra (USP, 2024).

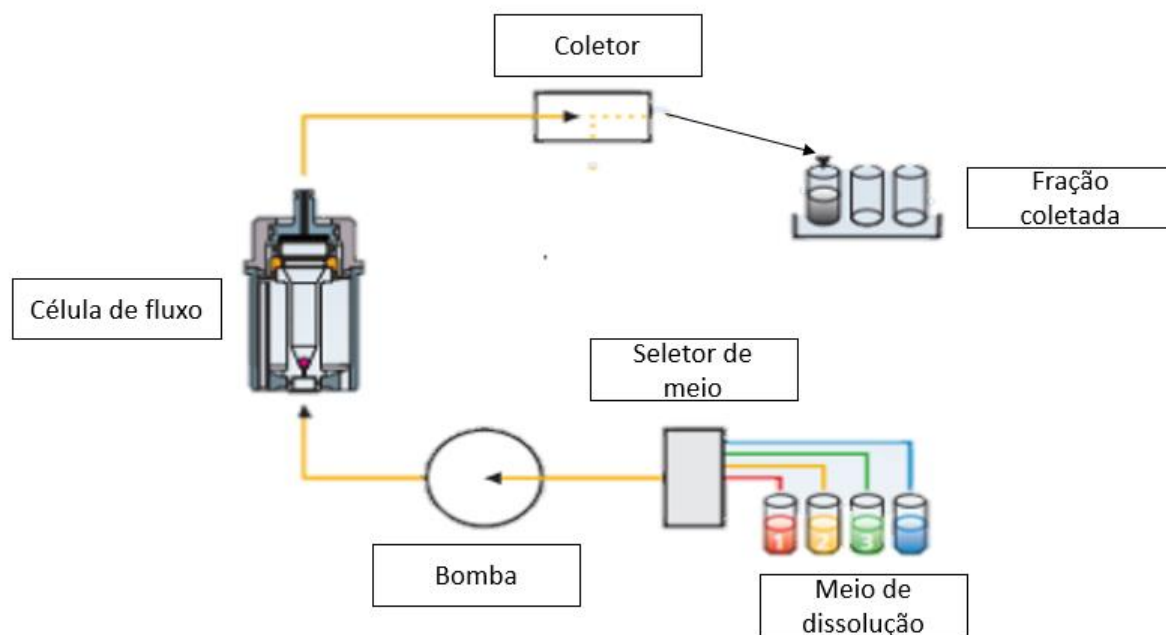
Na interface entre a amostra e a solução receptora se encontra a membrana de difusão. Dentro da solução receptora encontra-se a hélice com agitação magnética. A solução receptora é envolvida por um banho de aquecimento, que mantém a temperatura do ensaio. Por fim, a célula também é composta por dois tubos, no qual em um é coletada a amostra e no outro é inserida a solução receptora para reposição.

1.7. CÉLULA DE FLUXO CONTÍNUO (APARATO USP 4).

A célula de fluxo contínuo é chamada de aparato 4 por ser o quarto aparato descrito na Farmacopeia Americana para avaliação dos métodos de dissolução (USP, 2023). Foi introduzido no FDA em 1990 e hoje está presente nas Farmacopeias Americana, Europeia e Japonesa (CAVALCANTI, 2019).

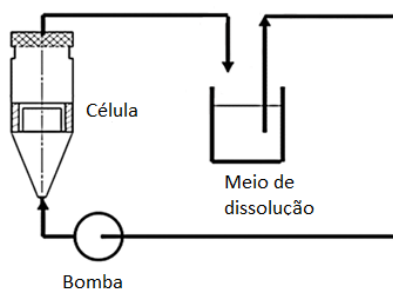
A célula de fluxo contínuo é um equipamento versátil, no qual é possível avaliar semissólidos, cápsulas, comprimidos, suspensões, supositórios, pós e grânulos, assim como implantes e dispositivos médicos. Dependendo do objetivo do teste, o equipamento pode estar configurado em sistema aberto ou fechado, conforme demonstrado nas Figuras 4 e 5, respectivamente. Para avaliação do perfil de liberação de semissólidos, a USP determina que o equipamento deve estar na configuração fechada (USP, 2023).

Figura 4: Esquematização do sistema aberto.



Fonte: Figura adaptada de CAVALCANTI, 2019.

Figura 5: Esquematização do sistema fechado.



Fonte: Adaptada de USP (2023).

O equipamento está demonstrado nas Figuras 6 e 7.

Figura 6: Célula de fluxo contínuo.



Figura 7: Demonstração dos componentes da célula.



O sistema fechado é composto por bomba responsável pelo fluxo, um agitador magnético onde se encontram os frascos *schotts* com a solução receptora em agitação, banho aquecido na temperatura selecionada e as células onde se encontram as amostras. Conforme demonstrado na Figura 7, as amostras se encontram dentro do adaptador para formas farmacêuticas semissólidas, onde ficam em contato com a membrana de difusão, neste adaptador é possível adicionar cerca de 1,2 g de amostra. Dentro da célula, o adaptador permanece em contato com a solução receptora. Ainda, dentro de cada célula se encontra uma esfera de rubi para impedir o retorno da solução receptora. Por fim, a célula se encontra dentro da camisa de aquecimento, para manutenção da temperatura do ensaio.

2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GERAL

Comparar a liberação da triancinolona acetonida a partir de produtos tópicos por dois métodos: célula de difusão de Franz e célula de fluxo contínuo (aparato 4).

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver método analítico para quantificação da triancinolona acetonida (IFA) liberada da forma farmacêutica utilizando método de célula difusão de Franz;
- Desenvolver método analítico para quantificação da triancinolona acetonida liberada da forma farmacêutica utilizando método de célula de fluxo contínuo (aparato 4);
- Avaliar a liberação da triancinolona acetonida pomada (do medicamento de referência) de acordo com os métodos desenvolvidos;
- Avaliar a precisão dos métodos desenvolvidos para a comparação dos resultados;
- Avaliar a semelhança da liberação da triancinolona acetonida entre o medicamento proposto a genérico e o medicamento referência nos métodos desenvolvidos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Reagentes

As amostras utilizadas foram do medicamento de referência OMCILON®-A Orabase registrado pela empresa Aspen Pharma Indústria Farmacêutica Ltda® (Serra, Espírito Santo, Brasil). A Substância Química de Trabalho (SQT), trianciolona acetonida, apresenta pureza de 99,47% e é proveniente da matéria-prima produzida pela empresa Tianjin Tianyao Pharmaceuticals Co. Ltd® (Tianjin, China). Os reagentes fosfato de potássio monobásico, fosfato de sódio dibásico, hidróxido de sódio e álcool etílico absoluto são da Neon® (Suzano, São Paulo, Brasil). O metanol foi obtido da J.T. Backer® (Xalostoc, México), o cloreto de sódio da Synth® (Diadema, São Paulo, Brasil) e a trietilamina da Sigma Aldrich® (Damstad, Alemanha). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Além disso, foram utilizadas as membranas de nylon (Nylaflo™) 0,45µm da Pall Corporation®, de celulose para tubos de diálise da Sigma®, celulose 8 µm e PES 0,45 µm, ambas provenientes da Merck Millipore Ltd®.

3.1.2. Equipamentos

Incubadora de agitação orbital, Quimis®; Balança analítica, Mettler Toledo®, precisão de duas casas; Balança analítica, Mettler Toledo®, Precisão de quatro casas; pipetador, Eppendorf®, pHmetro, Gehaka®; Centrífuga, Eppendorf®, Cromatógrafo líquido de alta eficiência, Shimadzu®; Célula de Franz, Teledyne Hanson®; Célula de fluxo contínuo; Sotax®.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Solubilidade

O ensaio de solubilidade seguiu a Nota Técnica 003 de 2013, que dispõe sobre a avaliação da solubilidade de fármacos e o desenvolvimento de métodos de

dissolução para estudos de equivalência farmacêutica e de perfil de dissolução comparativo (ANVISA, 2013).

3.2.1.1. Soluções receptoras

Considerando que o local de aplicação da pomada de triancinolona é na cavidade bucal, foi avaliada a saliva simulada pH 6,8 como solução receptora (MARQUES, 2011). O preparo desta solução consiste em 8 g de cloreto de sódio; 0,19 g de fosfato de potássio monobásico; 2,38 g de fosfato de sódio dibásico e água purificada qsp 1 L, onde o pH foi ajustado para 6,8 (MARQUES, 2011).

Com a finalidade de utilizar a menor quantidade de solvente orgânico possível, a solubilidade do fármaco foi avaliada em saliva simulada pH 6,8 (100%); saliva simulada (90%) + etanol absoluto (10%); saliva simulada (80%) + etanol absoluto (20%); saliva simulada (70%) + etanol absoluto (30%); saliva simulada (60%) + etanol absoluto (40%); saliva simulada (50%) + etanol absoluto (50%) e saliva simulada (40%) + etanol absoluto (60%).

3.2.1.2. Avaliação da interferência dos filtros

Antes de avaliar a solubilidade do fármaco propriamente dita, é importante avaliar a interferência dos filtros utilizados no ensaio para garantir sua adequabilidade. O filtro é considerado adequado se exercer interferência menor que 2% frente a condição centrifugada (USP, 2023).

Para isto, foi adicionado 10 mg de IFA em 40 mL de cada uma das soluções receptoras avaliadas. As soluções foram mantidas em incubadora de agitação orbital à 37°C e 200 rpm, onde após 1 hora, as amostras foram coletadas. As amostras coletadas foram separadas em 5 alíquotas. A primeira foi centrifugada a 3000 rpm por 5 min, onde o sobrenadante foi coletado. As demais foram filtradas com filtros PVDF e PET hidrofílicos com 0,45 µm de abertura de poro e com 2 mL de volume para ambientação do filtro e também sem volume de ambientação. Todas as amostras foram diluídas, utilizando-se 3 mL do sobrenadante ou dos filtrados para balão

volumétrico de 20 mL, no qual o volume do balão foi completado com fase móvel (água purificada e acetonitrila em proporção de 60:40).

3.2.1.3. Avaliação quantitativa da solubilidade da triancinolona acetona

A avaliação da solubilidade foi realizada em equilíbrio, dessa forma, inicialmente foram adicionados 10 mg de IFA em 40 mL de cada solução receptora. Após 30 min, foi observado se houve ou não a saturação da solução. Considerando que não estava visualmente saturada, foi adicionado mais 10 mg de fármaco, e assim foi evidenciado matéria prima insolúvel nas soluções (supersaturadas). As soluções foram mantidas em incubadora de agitação orbital à 37°C e 200 rpm por 24 horas. Após o tempo determinado, todas as soluções foram filtradas com as respectivas membranas adequadas e diluídas com 3 mL para balão volumétrico de 20 mL, onde o volume do balão volumétrico foi completado com fase móvel.

3.2.1.4. Método de quantificação para a solubilidade

O método utilizado para quantificação da solubilidade das amostras seguiu os parâmetros da monografia de triancinolona acetona pomada, disponível na USP (USP, 2022d). Ressalta-se que este ensaio foi utilizado para as amostras de matéria-prima. Dessa forma, foi utilizado cromatografia líquida de fase reversa com detecção por absorção molecular na região do ultravioleta/visível. A fase móvel preparada foi água purificada e acetonitrila em uma proporção de 60:40; volume de injeção de 25 µL e coluna cromatográfica com fase estacionária octadecilsilano (C18), 300 mm de comprimento, 4 mm de espessura e 5 µm de tamanho de partícula. A temperatura do forno foi ambiente; o fluxo da fase móvel utilizado foi 1,0 mL/min; o comprimento de onda de quantificação foi de 254 nm e o tempo de corrida foi de 15 minutos.

3.2.2. Análise em célula de difusão vertical

Os testes foram conduzidos utilizando 7 mL de solução receptora, por ser o volume comportado pelo equipamento, e aproximadamente 300 mg de pomada em

cada célula, ou seja, 0,3 mg de triancinolona acetonida. Foram avaliadas as membranas nylon 0,45µm e de celulose para tubos de diálise, não foram testadas outras membranas pois estas eram as únicas disponíveis que eram adequadas para o equipamento em questão. A temperatura do banho de aquecimento foi selecionada à 37°C, visando mimetizar a temperatura da cavidade bucal. Além disso, foi estabelecida a rotação de 300 rpm. O tempo de análise foi conduzido por até 6h, onde foram realizadas as coletas em 1, 2, 3, 4, 5 e 6h. Em cada tempo estabelecido foi coletado 1 mL de amostra e o mesmo volume foi repostado.

3.2.3. Análise em célula de fluxo contínuo

Assim como nas análises de célula de difusão vertical, as análises foram conduzidas à 37°C. Foram avaliados os fluxos de 16 e 24 mL/min. O volume de solução receptora em cada célula foi de 100 mL. O tempo de análise foi conduzido por até 6h, onde foram realizadas as coletas em 1, 2, 3, 4, 5 e 6h. Em cada tempo estabelecido foi coletado 2 mL de amostra e o mesmo volume foi repostado. Além disso, em cada célula foi inserido 1.200 mg de pomada, isto é, 1,2 mg de triancinolona acetonida. Por fim, foram avaliadas as membranas de nylon 0,45 µm, de celulose para tubos de diálise, celulose 8 µm e PES 0,45 µm.

3.2.4. Método de quantificação das amostras do produto acabado

Para a avaliação do produto acabado, o método da USP (USP, 2022d) não foi adequado, uma vez que os excipientes de formulação apresentaram interferência na quantificação do ativo, sendo assim, foi necessário adaptar o método analítico. Dessa forma, a fase móvel utilizada foi solução de água:acetonitrila na proporção 55:45, o fluxo foi 1 mL/min, o comprimento de onda utilizado foi 239 nm, a coluna utilizada foi uma YMC Pack Pro® com fase estacionária octadecilsilano (C18), 300 mm de comprimento, 4 mm de espessura e 5 µm de tamanho de partícula; foi injetado 100 µL de volume de amostra e o tempo de corrida foi de 10 minutos.

3.2.5. Avaliação das precisões dos métodos

A precisão de um método avalia a proximidade entre os resultados obtidos através do cálculo do desvio padrão relativo (DPR) em porcentagem, podendo ser

avaliada por meio de repetibilidade, precisão intermediária ou da reprodutibilidade (ANVISA, 2017). A repetibilidade avalia o grau de concordância entre as amostras preparadas sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica. A precisão intermediária expressa a proximidade entre os resultados obtidos da análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes, realizada por operadores distintos. Por fim, a reprodutibilidade avalia a proximidade dos resultados obtidos por dois laboratórios diferentes (ANVISA, 2017).

Sendo assim, as precisões dos métodos desenvolvidos por célula de Franz e por aparato 4 foram avaliadas por meio da repetibilidade, ou seja, foi calculado o DPR das sextuplicatas das amostras preparadas por um mesmo analista, sob as mesmas condições e em mesma corrida analítica. Além disso, também foi avaliada a precisão intermediária, no qual foram preparadas seis amostras em um dia e seis amostras em outro dia, por analistas diferentes, onde foi calculado o DPR das doze amostras obtidas. Ressalta-se ainda que todas as amostras foram provenientes do tempo de 6h de análise.

3.2.6. Análise estatística dos resultados

Para avaliação estatística dos resultados e comparação dos perfis de liberação, foi utilizado o teste de Mann-Whitney U com intervalo de confiança de 90%, no qual foi calculado através da planilha de Excel®. Além disso, foram avaliadas as médias das sextuplicadas, assim como foi calculado o desvio padrão para elas. As Figuras foram geradas no software GraphPad Prism®.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO – ARTIGO CIENTÍFICO

Estudo de liberação *in vitro* de pomada de triancinolona acetônida: célula de difusão x aparato 4

AAPS PharmSciTech

Maria Raquel Cambuí Muraguchi^a, Sandra Regina Georgetti ^a, Marcela Maria Baracat^a, Renata Micheli Martinez^a, Rúbia Casagrande^{*a}

^aDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Londrina-UEL, Avenida Robert Koch, 60, Hospital Universitário, 86039-440 Londrina, Paraná, Brazil

*Corresponding author. Address: Avenida Robert Koch, 60, Vila Operária, CEP 86039-440 Londrina, Paraná, Brazil. Tel.: +55 43 33712475. E-mail address: rubiacasa@yahoo.com.br (R. Casagrande).

Resumo

A administração de formas farmacêuticas semissólidas pela via tópica apresenta algumas vantagens, em relação a outras vias por ser um método não invasivo e o fármaco não sofre metabolismo de primeira passagem. Considerando a importância deste tipo de formulação, alguns ensaios analíticos devem ser realizados para assegurar a qualidade do medicamento. Quando se trata de um medicamento genérico semissólido, os ensaios analíticos a serem avaliados devem ser realizados considerando os estudos de equivalência farmacêutica e de perfil de liberação. Para avaliação do perfil de liberação, a Farmacopeia Americana traz que podem ser utilizados equipamentos como célula de difusão vertical (célula de Franz) e célula de fluxo contínuo (aparato USP 4). Portanto, o objetivo desse estudo foi desenvolver um método para avaliação do perfil de liberação da pomada de triancinolona acetônida e

comparar os resultados obtidos em célula de Franz e em aparato 4. Para isto, foi avaliada a solubilidade do fármaco e a interferência da membrana utilizada no estudo. Para comparação entre os métodos foi realizada por meio da repetibilidade e da precisão intermediária. Além disso, também foi avaliada uma formulação proposta a medicamento genérico, que teve a sua liberação comparada ao medicamento de referência. O resultado do estudo de solubilidade demonstrou que o aumento da concentração de etanol absoluto na solução receptora leva ao aumento da solubilidade da triancinolona acetonida. A solução receptora mais adequada para avaliação do perfil de liberação da triancinolona acetonida foi a saliva simulada pH 6,8 (70%) + etanol absoluto (30%) e membrana de nylon 0,45 µm. Os resultados indicaram semelhança entre os equipamentos, portanto, independente se escolhido aparato 4 ou célula de Franz, o resultado obtido na avaliação do perfil de liberação da triancinolona acetonida pomada foi o mesmo. No entanto, o método que apresentou resultados de liberação do fármaco mais precisos foi por aparato 4, uma vez que apresentou menores valores de DPR tanto para repetibilidade, quanto para a precisão intermediária, quando comparado à célula de Franz. Por fim, a avaliação da formulação proposta a medicamento genérico demonstrou que há semelhança com o perfil de liberação do medicamento de referência. Assim, a mesma estaria apta a ser registrada na Anvisa.

Palavras chave: estudos de liberação de fármacos; célula de Franz; aparato 4; triancinolona acetonida; equivalência farmacêutica

1. Introdução

A administração de medicamentos por via tópica apresenta muitas vantagens por ser um método não invasivo, no qual o fármaco não sofre metabolismo de primeira passagem, além de ter efeitos adversos sistêmicos reduzidos, quando comparado a outras vias convencionais como a oral e a parenteral (1). Tendo em vista estas vantagens, a pele se torna uma ótima candidata para aplicação de fármacos de efeitos locais e sistêmicos (2). As formas farmacêuticas tópicas mais comumente utilizadas são os géis, pomadas, loções, emulsões e suspensões (3).

Tendo em vista a eficácia e segurança de um medicamento, a garantia da qualidade é uma ferramenta primária para garantir o seu desempenho (4). Dentre os ensaios aplicáveis aos produtos semissólidos a fim de garantir a sua qualidade estão a descrição/aparência, identificação, teor, impurezas, uniformidade de dose unitária, conteúdo de água, limite microbiano, conteúdo de conservantes e antioxidantes, eficácia do sistema conservante, esterilidade, caracterização de partícula/gotícula, formação de cristais, polimorfismo, propriedades reológicas, uniformidade em recipiente, assim como em dose disponibilizada e, por fim, extraíveis e lixiviáveis (5).

Mesmo com todos estes ensaios a serem realizados para assegurar a qualidade de um produto semissólido, quando se trata de desenvolvimento de medicamentos genéricos, devem ser realizados alguns ensaios a mais para comprovação da equivalência farmacêutica do mesmo frente ao medicamento de referência. Os medicamentos genéricos são medicamentos similares e intercambiáveis ao medicamento de referência ou inovador (6).

Devido a complexa microestrutura de algumas formulações semissólidas, existem alguns obstáculos para o desenvolvimento de medicamentos genéricos dessas formulações (7).

As agências regulatórias de cada país dispõem sobre os seus próprios requisitos para que um medicamento genérico seja intercambiável ao medicamento de referência. No Brasil, a ANVISA traz que os medicamentos genéricos devem ter tanto a equivalência farmacêutica, quanto a bioequivalência comprovada frente ao medicamento de referência (8). Todavia, para algumas formas farmacêuticas o estudo

de bioequivalência não é necessário, sendo assim, deve ser realizado o estudo de bioisenção. Dentre elas, estão as formas farmacêuticas semissólidas de aplicação tópica (9). Para realizar a bioisenção, deve-se apresentar o estudo de liberação *in vitro* do medicamento genérico frente ao medicamento de referência (9).

A avaliação da liberação de semissólidos é realizada por meio de uma célula de difusão, no qual uma camada espessa da formulação é inserida em um compartimento em contato com uma membrana sintética, junto a solução receptora. Durante a análise, a substância se difunde através da formulação e atravessa a membrana para o reservatório contendo a solução receptora. A quantidade da droga liberada é calculada em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ pelo tempo, e deve ser comparada estatisticamente ao medicamento de referência (10).

Para esta avaliação, a Farmacopeia Americana traz que podem ser utilizados os aparatos de célula de difusão vertical (célula de Franz), célula de imersão e célula de fluxo contínuo (aparato USP 4) (10).

Tendo isto em vista, o fármaco escolhido para o estudo foi a triancinolona acetonida na forma farmacêutica de pomada. A triancinolona acetonida é um insumo farmacêutico ativo (IFA) da classe dos cortioesterioides que apresenta atividade anti-inflamatória e imunossupressora (11). A molécula possui forma molecular $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{FO}_6$ e peso molecular 434,50 g/mol. Além disso, possui valor de pKa igual a 12,87 (12) e é moderadamente solúvel em álcool desidratado, em clorofórmio e em metanol, entretanto, é praticamente insolúvel em água (13).

A triancinolona pode ser produzida na forma farmacêutica de pomada. As pomadas são formulações oleosas, que normalmente são oclusivas. Esta forma farmacêutica tende a aumentar a hidratação do estrato córneo, o que auxilia no fluxo transdérmico do fármaco (14). No Brasil, o medicamento de referência para a triancinolona pomada é o OMCILON®-A Orabase registrado pela empresa Aspen Pharma Indústria Farmacêutica Ltda® (15).

Portanto, o objetivo do trabalho foi desenvolver um método para avaliação do perfil de liberação da pomada de triancinolona acetonida e comparar os resultados obtidos em célula de Franz e aparato 4. Além disso, foi avaliada uma formulação proposta de medicamento genérico foi comparada ao medicamento de referência. Para isto, ambas as formulações foram avaliadas em célula de Franz e em aparato 4,

onde os resultados obtidos pelos dois equipamentos foram comparados para determinar a equivalência farmacêutica.

2. Material e métodos

2.1. Reagentes

As amostras utilizadas foram do medicamento de referência OMCILON®-A Orabase registrado pela empresa Aspen Pharma Indústria Farmacêutica Ltda® (Serra, Espírito Santo, Brasil). A Substância Química de Trabalho (SQT), que foi o padrão utilizado nas análises, é a triancinolona acetônida (IFA), no qual apresenta pureza de 99,47% e é proveniente da empresa Tianjin Tianyao Pharmaceuticals Co. Ltd® (Tianjin, China). Os reagentes fosfato de potássio monobásico, fosfato de sódio dibásico, hidróxido de sódio e álcool etílico absoluto são da Neon® (Suzano, São Paulo, Brasil). O metanol foi obtido da J.T. Backer® (Xalostoc, México), o cloreto de sódio da Synth® (Diadema, São Paulo, Brasil) e a trietilamina da Sigma Aldrich® (Damstad, Alemanha). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Além disso, foram utilizadas as membranas de nylon (Nylaflo™) 0,45 µm da Pall Corporation®, de celulose para tubos de diálise da Sigma®, celulose 8 µm e PES 0,45 µm, ambas provenientes da Merck Millipore Ltd®. Para filtração das amostras foram utilizados os filtros PVDF 0,45 µm e PET 0,45 µm, no qual os dois foram obtidos da empresa da Merck Millipore Ltd®.

2.2. Equipamentos

Incubadora de agitação orbital, Quimis®; Balança analítica, Mettler Toledo®, precisão de duas casas; Balança analítica, Mettler Toledo®, Precisão de quatro casas; pipetador, Eppendorf®, pHmetro, Gehaka®; Centrífuga, Eppendorf®, Cromatógrafo líquido de alta eficiência, Shimadzu®; Célula de Franz, Teledyne Hanson®; Célula de fluxo contínuo; Sotax®.

2.3. Solubilidade

Previamente à solubilidade, foi realizado o teste para avaliar-se a interferência dos filtros na quantificação do fármaco. Para isto, foi adicionado 10 mg de triancinolona acetonida (IFA) em 40 mL de cada uma das soluções receptoras avaliadas. As soluções foram mantidas em incubadora de agitação orbital à 37°C e 200 rpm, onde após 1 hora as amostras foram coletadas. As amostras coletadas foram separadas em 5 alíquotas. A primeira foi centrifugada a 3000 rpm por 5 min, onde o sobrenadante foi coletado, as demais foram filtradas com filtros PVDF e PET com 0,45 µm de abertura de poro e com 2 mL de volume de descarte e sem volume de descarte. Todas as amostras foram diluídas, utilizando-se 3 mL do sobrenadante ou dos filtrados para balão volumétrico de 20 mL, no qual o volume do balão foi completado com fase móvel (água purificada e acetonitrila em uma proporção de 60:40). Nesta solução, as amostras se encontravam na concentração de 0,0375 mg/mL.

A solubilidade foi conduzida pelo método de *shake-flask* (16). Dessa forma, o ensaio foi conduzido à 37°C, com o intuito de mimetizar a temperatura da cavidade bucal. Também com este objetivo, o meio receptor escolhido foi saliva simulada pH 6,8 (17). Assim, foi avaliada a saliva simulada, bem como a saliva simulada com adição de 5; 10; 20; 30; 40; 50 e 60% de etanol absoluto.

O ensaio foi conduzido em incubadora de agitação orbital, à 200 rpm de agitação. Inicialmente foram adicionados 10 mg de IFA em 40 mL de cada solução receptora e, após 30 minutos, foi observado se houve ou não a saturação da solução, como não estava visualmente saturada, foi adicionado mais 10 mg de IFA. Para cada solução receptora, o ensaio foi realizado em triplicata. As amostras permaneceram na incubadora por 24h.

Para quantificação da triancinolona acetonida utilizou-se o método de teor descrito na monografia do fármaco (18). Utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu®, coluna cromatográfica do modelo Waters X-Terra MS com fase estacionária octadecilsilano (C18), 300 mm de comprimento, 4 mm de espessura e 5 µm de tamanho de partícula; fase móvel água: acetonitrila (60:40) e volume de injeção de 25 µL. A temperatura do forno foi ambiente; o fluxo da fase móvel utilizado foi 1,0

mL/min; o comprimento de onda de quantificação foi de 254 nm e o tempo de corrida foi de 15 minutos.

2.4. Método por célula de difusão vertical (célula de Franz)

Os testes foram conduzidos utilizando 7 mL de solução receptora por ser o volume comportado pelo equipamento, e aproximadamente 300 mg de pomada em cada célula, ou seja, 0,3 mg de IFA, considerando que a dose da pomada de triancinolona acetonida é 1 mg/g. As membranas avaliadas foram a nylon 0,45µm e a de celulose para tubos de diálise (membrana de diálise). A temperatura do banho de aquecimento foi selecionada à 37°C, visando mimetizar a temperatura da cavidade bucal. Além disso, foi estabelecida uma rotação de 300 rpm. O tempo de análise foi conduzido por até 6h, onde foram realizadas as coletas em 1, 2, 3, 4, 5 e 6h, onde a cada tempo foi coletado 1 mL de amostra e o mesmo volume foi repostado.

2.5. Método por célula de fluxo contínuo (aparato 4)

Assim como nas análises de célula de difusão vertical, as análises foram conduzidas à 37°C. Foram avaliados os fluxos de 16 e 24 mL/min. O volume de solução receptora em cada célula foi de 100 mL. O tempo de análise foi conduzido por até 6h, onde foram realizadas as coletas em 1, 2, 3, 4, 5 e 6h, onde a cada tempo foi coletado 2 mL de amostra e o mesmo volume foi repostado. Além disso, em cada célula foi inserido 1.200 mg de pomada, isto é, 1,2 mg de triancinolona acetonida, considerando que a dose da pomada de triancinolona acetonida é 1 mg/g. Por fim, foram avaliadas as membranas de nylon 0,45 µm, de celulose para tubos de diálise, celulose 8 µm e PES 0,45 µm.

2.6. Método de quantificação das amostras do produto acabado

Para a avaliação do produto acabado, o método da USP (13) não foi adequado, uma vez que os excipientes de formulação apresentaram interferência na quantificação do ativo, sendo assim, foi necessário adaptar o método analítico. Dessa forma, a fase móvel utilizada foi solução de água:acetonitrila na proporção 55:45, o fluxo foi 1 mL/min, o comprimento de onda utilizado foi 239 nm, a coluna utilizada foi uma YMC Pack Pro® com fase estacionária octadecilsilano (C18), 300 mm de

comprimento, 4 mm de espessura e 5 µm de tamanho de partícula; foi injetado 100 µL de volume de amostra e o tempo de corrida foi de 10 minutos.

2.7. Avaliação das precisões dos métodos

A precisão de um método avalia a proximidade entre os resultados obtidos através do cálculo do desvio padrão relativo (DPR) em porcentagem, podendo ser avaliada por meio de repetibilidade, precisão intermediária ou da reprodutibilidade (20). A repetibilidade avalia o grau de concordância entre as amostras preparadas sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica. A precisão intermediária expressa a proximidade entre os resultados obtidos da análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes, realizada por operadores distintos. Por fim, a reprodutibilidade avalia a proximidade dos resultados obtidos por dois laboratórios diferentes (20).

Sendo assim, as precisões dos métodos desenvolvidos por célula de Franz e por aparato 4 foram avaliadas por meio da repetibilidade, ou seja, foi calculado o DPR das sextuplicatas das amostras preparadas por um mesmo analista, sob as mesmas condições e em mesma corrida analítica. Além disso, também foi avaliada a precisão intermediária, no qual foram preparadas seis amostras em um dia e seis amostras em outro dia, por analistas diferentes, onde foi calculado o DPR das doze amostras obtidas. Ressalta-se ainda que todas as amostras foram provenientes do tempo de 6h de análise.

2.8. Análise estatística dos resultados

Os dados foram analisados utilizando-se a média $\pm$ desvio padrão da média (DPM). O capítulo 1724 da Farmacopeia Americana (10) traz que a comparação entre os perfis de liberação é avaliada estatisticamente por um teste não paramétrico, sendo ele o teste U de Mann-Whitney. Assim, utiliza-se um intervalo de confiança de 90% para calcular a razão entre as inclinações do lote teste e do lote referência.

Tendo isto em vista, em um primeiro momento foi calculada a semelhança entre os resultados obtidos na célula de Franz e no Aparato 4 pelo teste U de Mann-Whitney. Para isto, utilizou-se os resultados provenientes da solução receptora saliva

simulada à 70% e etanol à 30%. Após, foi calculada a semelhança entre a formulação genérica proposta e o medicamento de referência.

3. Resultados e discussão

3.1. Solubilidade

A Tabela 1 apresenta os resultados do teste de filtro. As áreas dos picos obtidas nos cromatogramas das soluções filtradas foram comparadas às áreas das amostras centrifugadas, no qual foram calculadas as recuperações. Para o filtro ser considerado adequado, a interferência deve ser menor ou igual à 2% (18). Portanto, verifica-se que para a saliva simulada nenhum filtro foi considerado adequado, dessa forma as amostras foram centrifugadas.

Para as soluções saliva simulada (95%) + etanol (5%) e saliva simulada (90%) + etanol (10%), apenas o filtro PET 0,45 μm sem volume de ambientação se demonstrou adequado. Para as demais soluções, todos os filtros foram considerados adequados. Dessa forma, as soluções no qual os filtros foram adequados foram filtradas com PET 0,45 μm .

As solubilidades de triancinolona acetona (mg/mL) obtidas a partir das soluções de saliva simulada com concentrações crescentes de etanol estão apresentadas na Tabela 2. É possível notar que quanto maior a quantidade de etanol presente na solução receptora, maior é a concentração de triancinolona acetona obtida, ou seja, o aumento da quantidade de etanol consequentemente melhora a solubilização do fármaco.

A partir das concentrações obtidas no ensaio de solubilidade, foi calculado o volume necessário para a obtenção de solução saturada para cada uma das soluções receptoras e para ambos os aparatos, isto é, o volume necessário para solubilizar uma dose de fármaco. Conforme descrito nos itens anteriores, a dose da pomada de triancinolona acetona é 1 mg/g. Dessa forma, como a célula de Franz comporta 300 mg de pomada, a dose de IFA inserida no equipamento é de 0,3 mg. Já o aparato 4 comporta 1,2 g de pomada, ou seja, a dose de IFA inserida no equipamento é 1,2 mg.

Portanto, considerando que as concentrações obtidas no ensaio de solubilidade foram em mg/mL, foram calculados os volumes necessários para a

obtenção de solução saturada de cada uma das soluções receptoras, em ambos os equipamentos, ou seja, para isto foi considerada a dose de 0,3 mg para a célula de Franz e 1,2 mg para o aparato 4. Os resultados também se encontram na Tabela 2.

A partir do volume de solução saturada, foi calculado o volume necessário para manutenção da condição *sink*. Este volume é três vezes o volume de solução saturada. É importante definir o volume de condição *sink* para evitar que a velocidade de liberação do fármaco seja influenciada de maneira artificial pela aproximação da saturação durante a realização do teste (19). Dessa forma, o volume de solução receptora definido para o método deve levar em consideração esta condição.

Além disso, a definição do volume de solução receptora também é dependente do equipamento. Para a célula de Franz, o volume utilizado é de 7 mL, enquanto para o aparato 4 é de 100 mL. Esta diferença se dá por conta da capacidade de cada equipamento.

Tendo isso em vista, com os dados obtidos na Tabela 2 é possível concluir que para o método de liberação em célula de Franz, a solução receptora adequada precisaria ter no mínimo 20% de etanol, já que foi a solução que apresentou volume adequado de condição *sink*, considerando que o volume de meio comportado pelo equipamento é de 7 mL.

Por outro lado, para o método por aparato 4, como a capacidade do volume é de 100 mL, conclui-se que 10% de etanol na solução receptora seria suficiente para manter a condição *sink*.

Vale ressaltar que a estabilidade da amostra também foi avaliada durante o ensaio de solubilidade, onde a mesma se manteve estável durante as 24h de experimento, independente da solução receptora utilizada.

Portanto, a partir desses resultados a pomada de triancinolona acetônida foi avaliada pelos métodos em célula de difusão vertical (célula de Franz) e célula de fluxo contínuo (aparato 4).

3.2. Método por célula de difusão vertical (célula de Franz)

No método por célula de difusão vertical foram avaliadas as membranas nylon 0,45 µm e a de celulose para tubos de diálise. Não foram testadas outras membranas

uma vez que eram as únicas disponíveis que se adequavam para o equipamento em questão. Para esta avaliação, foi utilizada como solução receptora saliva simulada (70%) + (30%) de etanol. Conforme já discutido, a solução receptora saliva simulada (80%) + (20%) apresentou volume de condição *sink* adequado para as análises na célula de Franz, no entanto, para a avaliação da membrana foi decidido seguir com uma concentração de etanol maior para garantir que houvesse melhor solubilidade do IFA e assim escolha mais adequada da membrana. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 1, que demonstra a quantidade liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) por tempo (h).

Na Figura 1 é possível observar que a membrana nylon 0,45 μm se mostrou mais adequada para avaliação da triancinolona acetonida, uma vez que apresentou maior liberação desde o segundo tempo de coleta. Quanto ao valor de r , a membrana de Nylon apresentou 0,9980, enquanto a de diálise 0,9928, ou seja, a membrana de Nylon apresentou taxa de liberação mais linear quando comparada a membrana de diálise.

A partir da escolha da membrana, as concentrações crescentes de etanol foram avaliadas no método por célula de difusão vertical. Os resultados estão apresentados na Figura 2, que traz a quantidade liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) por tempo (h) onde é visível que a maior taxa de liberação foi obtida com a solução receptora contendo maior concentração de etanol (30%).

Por outro lado, os dados demonstram que não houve diferença significativa da quantidade de fármaco liberado a partir da forma farmacêutica para as soluções com 10; 15 e 20% de etanol, uma vez que após 6 horas de análise, a quantidade liberada foi inferior a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

No entanto, é possível observar que a taxa de liberação foi proporcional a quantidade de etanol na solução, já que no ensaio com menor quantidade de etanol (10%) a taxa liberada foi menor.

Portanto, os dados obtidos em célula de Franz corroboram com os resultados obtidos na solubilidade, onde a taxa de liberação aumentou proporcionalmente à concentração de etanol utilizada na solução receptora. Assim, conclui-se que a concentração de etanol influencia tanto na solubilidade da matéria-prima, quanto no produto acabado, impactando diretamente na porcentagem de liberação do IFA a partir da forma farmacêutica.

3.3. Método por célula de fluxo contínuo (aparato 4)

No método desenvolvido por aparato 4 o teste inicial, assim como para a célula de Franz, foi a avaliação da adequabilidade das membranas disponíveis. Algumas membranas testadas não se demonstraram aplicáveis ao produto, uma vez que se romperam durante a análise, ou seja, não foram capazes de sustentar a quantidade de amostra. Isto ocorreu com a membrana de diálise, de éster de celulose 8 μm e de poliethersulfona 0,45 μm , conforme demonstrado nas Figuras 3; 4 e 5, respectivamente. Isto provavelmente aconteceu porque o medicamento de referência apresenta pectina e gelatina como excipientes na sua formulação. Estes excipientes são muito higroscópicos, sendo assim, aumentam a hidratação do produto, intumescendo e fazendo com que ocorra o rompimento das membranas.

Vale ressaltar ainda que isto aconteceu para as análises do aparato 4. Nas análises da célula de Franz houve sim intumescimento das amostras, no entanto, não ocasionou o rompimento das membranas. Isto ocorreu em decorrência de que a água presente na solução receptora age como um agente intumescedor, dessa forma, como no aparato 4 há uma proporção maior de água em relação a quantidade de pomada do que na célula de Franz, o rompimento aconteceu apenas no aparato 4. Dessa forma, é justificável as membranas terem rompido apenas para o aparato 4.

A única membrana que permaneceu íntegra durante a avaliação do perfil de liberação do medicamento referência foi a de nylon 0,45 μm (Figura 6), uma vez que foi a que sustentou a amostra pelo tempo de análise. Portanto, conclui-se que para ambos os equipamentos, a membrana mais adequada foi a de nylon 0,45 μm .

A partir da seleção da membrana, foi avaliada a performance da formulação contendo triancinolona acetonida no gradiente de etanol para o medicamento de referência, conforme demonstrado na Figura 7.

Nota-se que no aparato 4 não houve diferenças na quantidade de fármaco liberada quanto na avaliação da célula de Franz. Conforme já discutido, para a célula de Franz, o fármaco se encontra em condição *sink* apenas na solução com 20% de etanol, no entanto, para o aparato 4, na solução com 10% de etanol o IFA já se encontrava em condição *sink*.

Ainda, no aparato 4 também foi possível observar a influência do etanol na liberação do IFA, já que com a maior concentração de etanol houve a maior taxa de liberação. Sendo assim, foi realizado um teste T de Student entre as quantidades liberadas em 20 e 30% de etanol a fim de verificar se havia diferença significativa, utilizando o alfa igual a 0,05.

O teste T apresentou p-valor igual a 0,02, ou seja, as médias são estatisticamente diferentes, dessa forma, foi confirmado que a quantidade com 30% de etanol ocasionou em maior liberação do IFA.

Além disso, verifica-se que apesar do IFA estar em condição sink com 10% de etanol, esta condição de análise demonstrou baixa liberação do fármaco em todos os tempos avaliados. Sabe-se que os excipientes da formulação podem afetar a solubilização e/ou liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica. Sendo assim, apesar do IFA ter boa solubilização nesta condição, não houve a solubilização da matriz da pomada, dessa forma, o fármaco não foi liberado, apesar de estar em condição *sink*.

Portanto, tendo em vista os resultados, é possível observar que a solução receptora contendo saliva simulada a 70% e etanol a 30% foi a mais adequada para a triancinolona acetônida tanto em aparato 4 (Figura 7), quanto em célula de Franz (Figura 2), já que apresentou o perfil de liberação com quantidades crescentes de fármaco liberado pelo tempo.

A partir destes resultados posteriormente foram comparados os perfis de liberação obtidos entre a célula de Franz e o aparato 4 sob as mesmas condições, ou seja, utilizando a membrana de nylon 0,45 μm e a saliva simulada (70%) e etanol (30%) como solução receptora.

3.4. Avaliação das precisões dos métodos desenvolvidos

O DPR calculado a partir da repetibilidade dos resultados obtidos em célula de Franz foi igual a 11,25%, conforme apresentado na Tabela 3. Enquanto o DPR calculado para a precisão intermediária deste equipamento foi de 18,85%, conforme demonstrado na Tabela 4. Para o aparato 4, o DPR obtido entre as amostras da repetibilidade foi igual a 5,15%, conforme apresentado na Tabela 5, e da precisão intermediária foi de 6,98%.

Estes resultados demonstram que o aparato 4 apresenta resultados mais precisos do que a célula de Franz. Isto foi observado também durante a rotina laboratorial, onde a análise por célula de Franz se demonstrou mais dependente de analista, pois a forma como a amostra, a solução receptora e a membrana são colocadas no equipamento deve ser muito cautelosa, uma vez que podem gerar interferência na análise.

Já o aparato 4 é uma técnica mais robusta e não apresenta muita interferência de analista, no entanto deve-se levar em consideração que é uma técnica com um custo mais elevado.

3.5. Análise estatística dos resultados

Os resultados da avaliação da semelhança entre os resultados obtidos em Célula de Franz e Aparato 4 estão apresentados nas Tabelas 7 e 8, onde a Tabela 7 traz as razões entre as inclinações obtidas na célula de Franz e no aparato 4, célula por célula, enquanto a Tabela 8 traz os mesmos valores de forma ordenada e suas respectivas porcentagens.

A USP (10) traz que para ser considerado semelhante, as porcentagens da 8ª a 29ª razão ordenada devem estar entre 75 e 133%. Conforme disposto na Tabela 8, a 8ª razão apresentou 81,98% e a 29ª apresentou 109,11%, portanto, estão dentro do intervalo determinado pela USP. Sendo assim, considera-se que os resultados do perfil de liberação do medicamento referência são semelhantes quando avaliados na célula de Franz ou no aparato 4 quando avaliados sob mesmas condições, isto é, com a mesma solução receptora e a mesma membrana.

Dessa forma, como os equipamentos são semelhantes, deve-se levar em consideração as vantagens e desvantagens de cada um. Conforme já discutido, os resultados das amostras obtidas a partir do aparato 4 apresentaram menor DPR em comparação as amostras obtidas a partir da célula de Franz, portanto, o aparato 4 se mostra um equipamento mais preciso que a célula de Franz.

Sendo assim, após a análise dos métodos, o produto teste foi avaliado frente ao medicamento de referência em aparato 4. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 9 e 10.

A partir dos resultados obtidos, verifica-se que as razões das inclinações ficaram fora do critério de aceitação preconizado pela USP. Por outro lado, a USP dispõe ainda que caso os resultados não atendam ao critério de 75 a 133% para as 8ª a 29ª razões ordenadas a partir da performance de 6 células, deve-se avaliar adicionalmente a performance de 12 células, resultando um total de 18 células e 324 razões. Dessa forma, os resultados das 18 células avaliadas devem demonstrar que as inclinações das 110ª a 215ª razões devem estar dentro do critério de 75 a 133%, para respeitar o intervalo de confiança de 90%.

Sendo assim, foram avaliadas 18 células no total, onde os resultados estão demonstrados nas Tabelas 11 e 12. Conforme pode ser observado na Tabela 12, as inclinações da 110ª a 215ª razões obtiveram porcentagens de 89,77 a 103,45%, ou seja, todas se encontraram dentro da faixa de 75 a 133%. Portanto, a partir destes resultados é possível concluir que o produto candidato a genérico apresentou perfil de liberação semelhante ao medicamento de referência, estando apto a ser registrado na Anvisa.

4. Conclusão

Por meio dos resultados obtidos no estudo, é possível verificar que apesar de ambos os equipamentos serem utilizados para avaliação do perfil de liberação de semissólidos, a comparação entre os resultados obtidos nos dois equipamentos é um desafio, uma vez que as amostras se encontram em condições diferentes. Conforme discutido ao longo do trabalho, a proporção entre a quantidade de amostra e quantidade de solução receptora é diferente nos equipamentos, ocasionando em uma concentração de trabalho diferente.

Todavia, verifica-se que apesar da diferença de concentração entre as amostras, a quantidade liberada apresenta semelhança entre os equipamentos aparato 4 e célula de Franz. No entanto, cabe ressaltar ainda que o aparato 4 apresentou melhor repetibilidade e precisão intermediária, portanto, foi o equipamento escolhido para avaliar o perfil de liberação do produto, onde foi possível observar que o medicamento candidato a genérico demonstrou perfil de liberação semelhante ao medicamento de referência.

5. Referências

1. SANZ, R. et al. Enhancing Topical Analgesic Administration: Review and Prospect for Transdermal and Transbuccal Drug Delivery Systems. *Current Pharmaceutical Design*, 2015, 21, 2867-2882
2. MARWAH, H. et al. Permeation enhancer strategies in transdermal drug delivery. *Drug Deliv*, 2016; 23(2): 564–578. Informa Healthcare USA, Inc. DOI: 10.3109/10717544.2014.935532
3. Chang, R.K.; Raw, A.; Lionberger, R.; Yu, L. Generic Development of Topical Dermatologic Products, Part II: Quality by Design for Topical Semisolid Products. *AAPS J.* 2013, 15, 674–683.
4. Namjoshi, S. Quality by Design: Development of the Quality Target Product Profile (QTPP) for Semisolid Topical Products. *Pharmaceutics* 2020, 12, 287; doi:10.3390/pharmaceutics12030287
5. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia sobre requisitos de qualidade para produtos tópicos e transdérmicos. Guia nº 20/2019 – versão 2, de 10/02/2021.
6. Araújo LU, Albuquerque KT, Kato KC, Silveira GS, Maciel NR, Spósito PÁ, Barcellos NM, Souza Jd, Bueno M, Storpirtis S. Medicamentos genéricos no Brasil: panorama histórico e legislação [Generic drugs in Brazil: historical overview and legislation]. *Rev Panam Salud Publica.* 2010 Dec;28(6):480-92. Portuguese. doi: 10.1590/s1020-49892010001200010. PMID: 21308175.
7. Ilić, T.; Pantelić, I.; Savić, S. The Implications of Regulatory Framework for Topical Semisolid Drug Products: From Critical Quality and Performance Attributes towards Establishing Bioequivalence. *Pharmaceutics* 2021, 13, 710. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050710>
8. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 753, DE 28 DE SETEMBRO DE 2022. Dispõe sobre o registro de medicamentos de uso humano com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como novos, inovadores, genéricos e similares. *Diário Oficial da União*, outubro de 2022.
9. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 749, DE 5 DE SETEMBRO DE 2022. Dispõe sobre isenção de estudos de bioequivalência /biodisponibilidade relativa. *Diário Oficial da União*, setembro de 2022.

10. The United States Pharmacopeia. (1724) Semisolid Drug Products—Performance Tests. DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_M5695_01_01
11. Sidhu G, Preuss CV. Triamcinolone. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2022. PMID: 31335029.
12. SANTER, V. et al. Controlled non-invasive iontophoretic delivery of triamcinolone acetone amino acid ester prodrugs into the posterior segment of the eye. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2018.
13. The United States Pharmacopeia. Triamcinolone. DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_M84640_04_01
14. Aulton, Michael E. Aulton delineamento de formas farmacêuticas / Michael E. Aulton , Kevin M. G. Taylor ; [tradução Francisco Sandro Menezes]. - 4 ed. - Rio de Janeiro : Elsevier, 2016.
15. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lista de medicamentos de referência. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/medicamentos/medicamentos-de-referencia/arquivos/lista-a-incluidos-16_06_2023.pdf. Acesso em 09/07/2023.
16. MARQUES, M. R. C.; VIEIRA, F. P.; BARROS, A. C. S. Ensaios de dissolução e comparação de perfis de dissolução. In: VIEIRA, Fernanda Pires; REDIGUIERI, Camila Fracalossi; REDIGUIERI, Carolina Fracalossi. A regulação de medicamentos no Brasil. Porto Alegre: Artmed, 2013. 672 p., cap. 16, p. 237-272.
17. MARQUES, M. R. C, LOEBENBERG R and ALMUKAINZI, M. Simulated Biological Fluids with Possible Application in Dissolution Testing. Dissolution Technologies, August 2011.
18. USP. The United States Pharmacopeia. (1092) the dissolution procedure: development and validation. DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_M643_05_01.
19. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de Dissolução Aplicável a Medicamentos Genéricos, Novos e Similares. Guia nº 14/2018 – versão 2, de 03/11/2021.
20. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da União, julho de 2017.

6. Declaração de financiamento

O financiamento do estudo foi realizado por empresa privada.

7. Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

8. Contribuição dos autores

Maria Raquel Cambuí Muraguchi: experimentos, análises, interpretação dos resultados e redação.

Rúbia Casagrande: metodologia, administração do projeto, interpretação dos resultados, redação, revisão e edição.

Sandra Regina Georgetti: auxílio na interpretação dos resultados, revisão e edição.

Marcela Maria Baracat: auxílio na interpretação dos resultados, revisão e edição.

Renata Micheli Martinez: auxílio na interpretação dos resultados, revisão e edição.

9. Tabelas

Tabela 1: Ensaio de compatibilidade dos filtros para a matéria-prima de triancinolona acetonida.

		Interferência (%)						
		Solução Receptora						
Composição do filtro	SS	SS (95%) + Et (5%)	SS (90%) + Et (10%)	SS (80%) + Et (20%)	SS (70%) + Et (30%)	SS (60%) + Et (40%)	SS (50%) + Et (50%)	SS (40%) + Et (60%)
PVDF 0,45 µm	15,07	20,42	23,37	1,16	1,38	1,41	0,10	0,40
PVDF 0,45 µm c/ 2 mL de descarte	16,37	20,46	23,65	0,85	0,51	0,21	0,18	0,61
PET 0,45 µm	16,41	0,71	0,27	1,17	0,44	0,25	0,33	1,39
PET 0,45 µm c/ 2 mL de descarte	16,67	21,98	24,88	0,02	0,15	0,35	0,19	0,64

SS: Saliva Simulada

Tabela 2: Solubilidade da triancinolona acetonida matéria-prima em saliva simulada.

Solução Receptora	Solubilidade (mg/mL)	Célula de Difusão vertical		Aparato 4	
		Volume da solução saturada (mL)	Volume da condição <i>sink</i> (mL)	Volume da solução saturada (mL)	Volume da condição <i>sink</i> (mL)
SS	0,02	15,00	45,00	60,00	180,00
SS (95%) + Et (5%)	0,03	10,00	30,00	40,00	120,00
SS (90%) + Et (10%)	0,05	6,00	18,00	24,00	72,00
SS (80%) + Et (20%)	0,14	2,14	6,43	8,57	25,71
SS (70%) + Et (30%)	0,62	0,48	1,45	1,94	5,82
SS (60%) + Et (40%)	1,23	0,24	0,73	0,98	2,94
SS (50%) + Et (50%)	2,00	0,15	0,45	0,60	1,80
SS (40%) + Et (60%)	2,52	0,12	0,36	0,48	1,44

SS: Saliva Simulada

Tabela 3: Repetibilidade dos resultados da célula de Franz.

Célula	Quantidade liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Média das sextuplicatas ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	DPR das sextuplicatas (%)
1	36,39	33,50	11,25
2	37,05		
3	27,28		
4	35,83		
5	33,34		
6	31,09		

Tabela 4: Precisão intermediária dos resultados da célula de Franz.

Célula	Quantidade liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) – Dia 1	Quantidade liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) – Dia 2	Média das 12 amostras ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	DPR das 12 amostras (%)
1	36,39	25,35	30,30	18,85
2	37,05	22,28		
3	27,28	19,02		
4	35,83	30,92		
5	33,34	32,05		
6	31,09	32,99		

Tabela 5: Repetibilidade dos resultados do aparato 4.

Célula	Quantidade liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Média das sextuplicatas ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	DPR das sextuplicatas (%)
1	27,93	29,62	5,15
2	27,48		
3	30,77		
4	30,38		
5	30,15		
6	31,03		

Tabela 6: Precisão intermediária dos resultados do aparato 4.

Célula	Quantidade liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) – Dia 1	Quantidade liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) – Dia 2	Média das 12 amostras ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	DPR das 12 amostras (%)
1	27,93	30,43	29,13	6,98
2	27,48	29,94		
3	30,77	26,70		
4	30,38	32,02		
5	30,15	26,61		
6	31,03	26,06		

Tabela 7: Razões obtidas entre as inclinações da Célula de Difusão Vertical/Aparato 4, utilizando o medicamento de referência.

		Aparato 4					
		1	2	3	4	5	6
Célula de difusão vertical	1	0,8994	1,0842	1,1758	0,8994	1,0842	1,1758
	2	0,9051	1,0911	1,1832	0,9051	1,0911	1,1832
	3	0,6642	0,8007	0,8683	0,6642	0,8007	0,8683
	4	0,8807	1,0616	1,1513	0,8807	1,0616	1,1513
	5	0,7937	0,9567	1,0375	0,7937	0,9567	1,0375
	6	0,8198	0,9883	1,0717	0,8198	0,9883	1,0717

Tabela 8: Ordem crescente da 8^a a 29^a razão das inclinações da Célula de difusão vertical/Aparato 4 e porcentagens das razões, utilizando o medicamento de referência.

Sequência	Razões Ordenadas	Razões multiplicadas por 100 (%)
8	0,8198	81,98
9	0,8683	86,83
10	0,8683	86,83
11	0,8807	88,07
12	0,8807	88,07
13	0,8994	89,94
14	0,8994	89,94
15	0,9051	90,51
16	0,9051	90,51
17	0,9567	95,67
18	0,9567	95,67
19	0,9883	98,83
20	0,9883	98,83
21	1,0375	103,75
22	1,0375	103,75
23	1,0616	106,16
24	1,0616	106,16
25	1,0717	107,17
26	1,0717	107,17
27	1,0842	108,42
28	1,0842	108,42
29	1,0911	109,11

Tabela 9: Média da quantidade liberada das 6 células avaliadas entre o medicamento teste e o medicamento de referência nos diferentes tempos testados

Tempo (h)	Teste ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	Referência ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)
1	9,32	9,72
2	13,58	15,88
3	16,95	20,14
4	21,25	25,38
5	24,64	29,21
6	27,28	32,79
Média r	0,9951	0,9984

Tabela 10: Ordem crescente da 8ª a 29ª razão das inclinações do medicamento de referência/teste e porcentagens das razões

Sequência	Razões Ordenadas	Razões multiplicadas por 100 (%)
8	0,5188	51,88
9	0,5534	55,34
10	0,5534	55,34
11	0,5534	55,34
12	0,5534	55,34
13	0,7498	74,98
14	0,7498	74,98
15	0,7914	79,14
16	0,7914	79,14
17	0,8095	80,95
18	0,8095	80,95
19	0,8380	83,80
20	0,8380	83,80
21	0,8545	85,45
22	0,8545	85,45
23	0,8903	89,03
24	0,8903	89,03
25	0,9048	90,48
26	0,9048	90,48
27	0,9497	94,97
28	0,9497	94,97
29	0,9497	94,97

Tabela 11: Média da quantidade liberada das 18 células avaliadas entre o medicamento teste e o medicamento de referência nos diferentes tempos testados

Tempos (h)	Teste ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Referência ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
1	4,67	5,91
2	9,71	11,26
3	15,12	15,90
4	19,51	20,93
5	23,25	24,76
6	27,08	28,88
Média r	0,9928	0,9943

Tabela 12: Ordem crescente da 110^a a 215^a razão das inclinações do medicamento de referência/teste e porcentagens das razões

Sequência	Razões Ordenadas	Razões multiplicadas por 100 (%)
110	0,8977	89,77
111	0,8992	89,92
112	0,9022	90,22
113	0,9035	90,35
114	0,9035	90,35
115	0,9037	90,37
116	0,9037	90,37
117	0,9037	90,37
118	0,9037	90,37
119	0,9037	90,37
120	0,9038	90,38
121	0,9092	90,92
122	0,9106	91,06
123	0,9106	91,06
124	0,9121	91,21
125	0,9121	91,21
126	0,9127	91,27
127	0,9137	91,37
128	0,9143	91,43
129	0,9161	91,61
130	0,9191	91,91
131	0,9206	92,06
132	0,9212	92,12
133	0,9228	92,28
134	0,9244	92,44
135	0,9264	92,64
136	0,9264	92,64
137	0,9272	92,72
138	0,9314	93,14
139	0,9318	93,18
140	0,9330	93,30
141	0,9334	93,34
142	0,9340	93,40
143	0,9401	94,01
144	0,9427	94,27
145	0,9450	94,50

146	0,9460	94,60
147	0,9495	94,95
148	0,9495	94,95
149	0,9495	94,95
150	0,9495	94,95
151	0,9515	95,15
152	0,9568	95,68
153	0,9568	95,68
154	0,9577	95,77
155	0,9593	95,93
156	0,9624	96,24
157	0,9625	96,25
158	0,9625	96,25
159	0,9625	96,25
160	0,9625	96,25
161	0,9634	96,34
162	0,9649	96,49
163	0,9649	96,49
164	0,9655	96,55
165	0,9655	96,55
166	0,9658	96,58
167	0,9665	96,65
168	0,9665	96,65
169	0,9699	96,99
170	0,9738	97,38
171	0,9755	97,55
172	0,9756	97,56
173	0,9756	97,56
174	0,9772	97,72
175	0,9772	97,72
176	0,9773	97,73
177	0,9830	98,30
178	0,9835	98,35
179	0,9846	98,46
180	0,9846	98,46
181	0,9863	98,63
182	0,9890	98,90
183	0,9891	98,91
184	0,9907	99,07

185	0,9937	99,37
186	0,9953	99,53
187	0,9965	99,65
188	0,9965	99,65
189	0,9983	99,83
190	0,9994	99,94
191	1,0017	100,17
192	1,0033	100,33
193	1,0043	100,43
194	1,0058	100,58
195	1,0093	100,93
196	1,0109	101,09
197	1,0136	101,36
198	1,0138	101,38
199	1,0138	101,38
200	1,0150	101,50
201	1,0155	101,55
202	1,0155	101,55
203	1,0161	101,61
204	1,0202	102,02
205	1,0215	102,15
206	1,0245	102,45
207	1,0253	102,53
208	1,0256	102,56
209	1,0268	102,68
210	1,0268	102,68
211	1,0296	102,96
212	1,0322	103,22
213	1,0322	103,22
214	1,0345	103,45
215	1,0345	103,45

10. Figuras

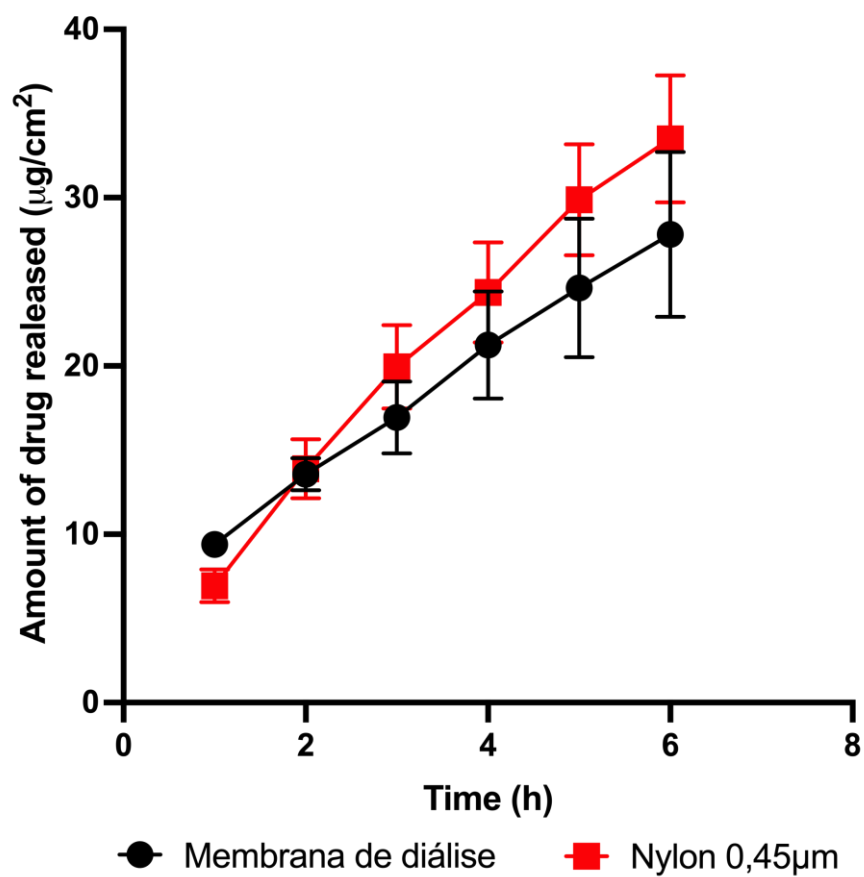


Fig. 1: Perfil de liberação de pomada de triancinolona acetônida em célula de Franz. Quantidade liberada de fármaco ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) *versus* tempo (h) com ●:membrana de diálise; ■: nylon 0,45 μm . Os resultados são expressos pela média $\pm$ desvio padrão de 6 células. Foi utilizado o medicamento de referência.

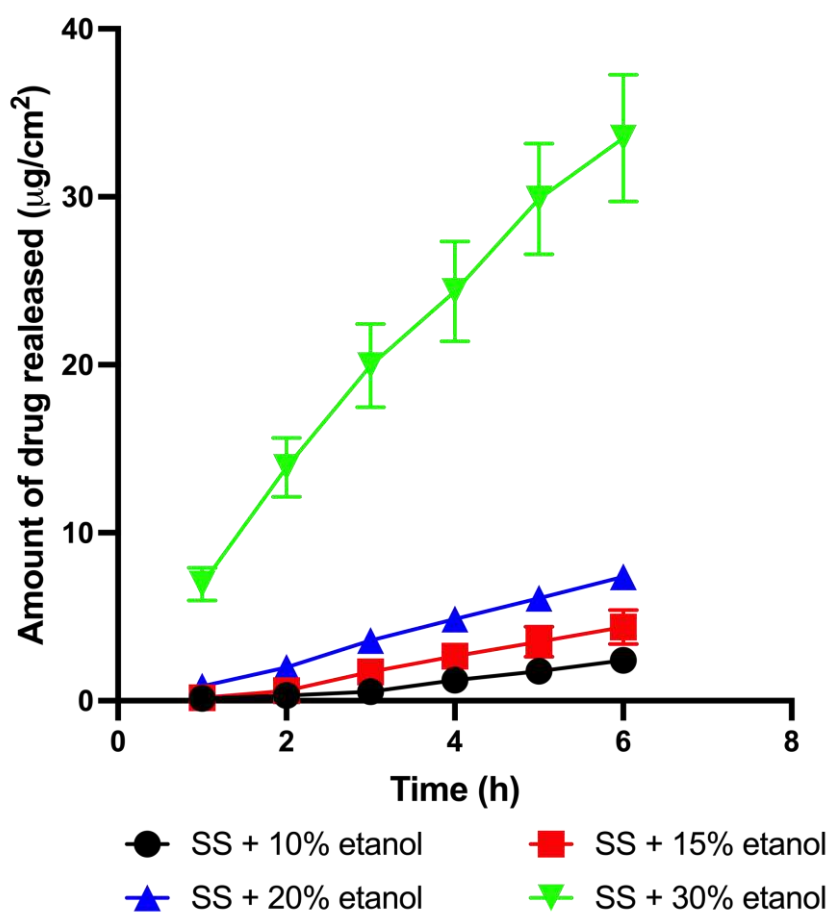


Fig. 2: Perfil de liberação de pomada de triancinolona acetônida em célula de difusão do tipo Franz utilizando diferentes soluções receptoras. Os resultados são expressos pela média $\pm$ desvio padrão de 6 células. Foi utilizado o medicamento de referência.



Fig. 3: Membrana de Diálise

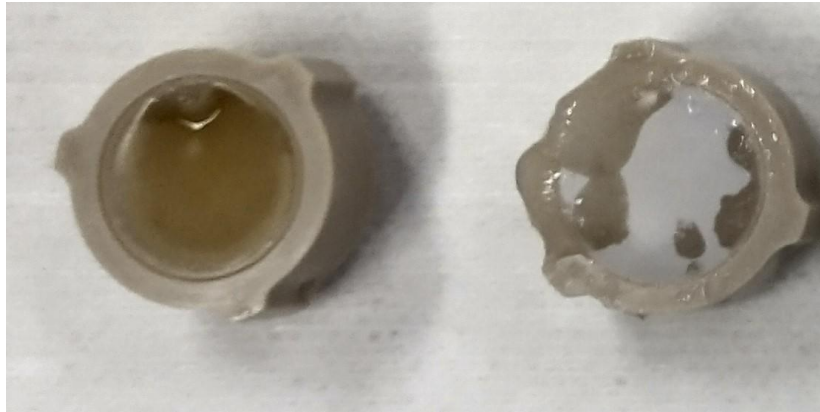


Fig. 4: Membrana de éster de celulose 8 μm .



Fig. 5: Membrana de poliethersulfona 0,45 μm .

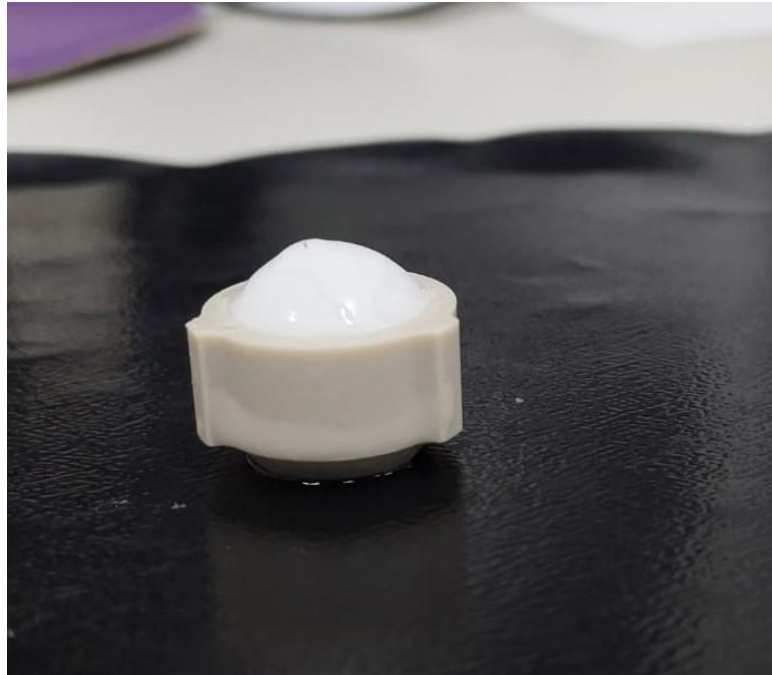


Fig. 6: Membrana de Nylon 0,45 μm

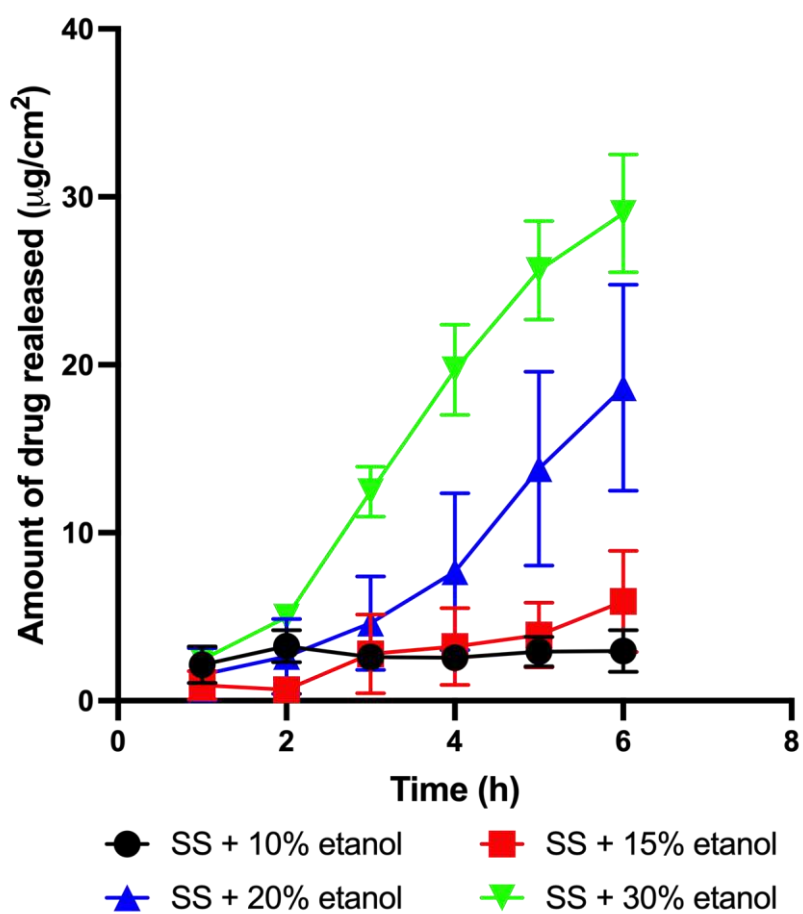


Fig. 7: Perfil de liberação de pomada de triancinolona acetônida em aparato 4. Os resultados são expressos pela média $\pm$ desvio padrão de 6 células. Foi utilizado o medicamento de referência.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir de todos os resultados obtidos no presente estudo, verifica-se que a solubilidade da triancinolona acetonida aumenta conforme o aumento da concentração de etanol absoluto na solução receptora. Isto ocorre não só para a matéria-prima, como foi possível observar no estudo de solubilidade, como também para o produto acabado, onde foi possível observar o aumento da liberação do IFA em célula de Franz e aparato 4.

É possível observar que quando avaliado em célula de Franz, apesar da solução receptora com 20% de etanol já estar em condição *sink*, houve aumento significativo da liberação triancinolona acetonida apenas na solução com 30% de etanol. Portanto, foi a condição mais adequada para a avaliação do perfil de liberação em célula de Franz.

Por outro lado, para o aparato 4 (100 mL), a condição com 10% de etanol já estava em condição *sink*. No entanto, a solução que apresentou melhor taxa de liberação também foi a com 30% de etanol.

Para o teste de liberação, a membrana utilizada é de suma importância. Para triancinolona acetonida, a membrana mais adequada foi a de nylon 0,45 μm . Durante o estudo foi observado o rompimento de várias membranas avaliadas. Provável que o rompimento ocorra devido à pectina e a gelatina presentes na formulação do medicamento de referência. Estes excipientes são muito hidrocópicos, sendo assim, aumentam a hidratação da pomada, intumescendo e levando ao rompimento das membranas.

Em relação a comparação entre o método em aparato 4 e célula de Franz, é possível verificar apesar de ambos os equipamentos serem utilizados para avaliação do perfil de liberação de semissólidos, a comparação entre os resultados obtidos nos dois equipamentos é um desafio, uma vez que as amostras são encontradas em condições diferentes. Conforme discutido ao longo do trabalho, a proporção entre a quantidade de amostra e quantidade de solução receptora é diferente nos equipamentos, ocasionando em uma concentração de trabalho diferente.

Todavia, verifica-se que apesar da diferença de concentração entre as amostras, a quantidade liberada apresenta semelhança entre os equipamentos

aparato 4 e célula de Franz. No entanto, cabe ressaltar ainda que o aparato 4 apresentou melhor repetibilidade e precisão intermediária., portanto, foi o equipamento escolhido para avaliar o perfil de liberação do produto.

Por fim, quando a formulação genérica proposta foi avaliada frente ao medicamento de referência, apresentou liberação semelhante, portanto, estaria apta a ser registrada na Anvisa.

6. REFERÊNCIAS

AFAQ, F.; ADHAMI, V. M.; MUKHTAR, H. **Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 571, n. 1–2 SPEC. ISS., p. 153–173, 2005.

ARAÚJO L. *et al.* **Medicamentos genéricos no Brasil: panorama histórico e legislação.** Rev Panam Salud Publica. 2010 Dec;28(6):480-92. 2010.

ARRUNÁTEGUI, L. *et al.* **Biopharmaceutics classification system: importance and inclusion in biowaiver guidance.** Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 51, n. 1, jan./mar., 2015.

ASPEN. ONCILON-A OROBASE. Bula do medicamento de referência. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/sistemas/bulario-eletronico>. Acesso em: 19/02/2023.

AULTON, M, TAYLOR, K. **Delineamento de formas farmacêuticas.** 4 ed. Rio de Janeiro. Elsevier, 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia nº 14: Guia de Dissolução Aplicável a Medicamentos Genéricos, Novos e Similares, versão 02.** Diário Oficial da União. Brasília, DF, 2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Lista A – Lista de medicamentos de referência.** Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/medicamentos/medicamentos-de-referencia/lista-de-medicamentos-de-referencia> . Acesso em 19/02/2023.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Nota Técnica 003 – Dispõe sobre a avaliação da solubilidade de fármacos e o desenvolvimento de métodos de dissolução para estudos de equivalência farmacêutica e de perfil de dissolução comparativo.** Diário Oficial da União. Brasília, DF, 2013.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO**

DE 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da União, julho de 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 749 de 05 de set de 2022 que dispõe sobre isenção de estudos de bioequivalência/biodisponibilidade relativa.** Diário Oficial da União. Brasília, DF. 2022a

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 753 de 28 de set de 2022 que dispõe sobre o registro de medicamentos de uso humano com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como novos, inovadores, genéricos e similares.** Diário Oficial da União. Brasília, DF. 2022b.

CAMPOS, R.; HUMBER, M. **Aspectos teóricos relacionados à reologia farmacêutica.** Visão Acadêmica, Curitiba, v.11, n.1, Jan. - Jun./2010 - ISSN 1518-5192.

CAVALCANTI, P. **Avaliação da utilização do aparato usp 4 como método de dissolução para fármacos com baixa solubilidade aquosa administrados pela via oral.** Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, 2019.

DIAZ-DEL, I et al. **Comparison of the lipid composition of porcine buccal and esophageal permeability barriers.** Archives of Oral Biology (2005) 50, 981—987. Elsevier, 2005.

FISHER, G. J. et al. **Pathophysiology of Premature Skin Aging Induced by Ultraviolet Light.** New England Journal of Medicine, v. 337, n. 20, p. 1419–1429, 1997.

FONSECA, M. J. V. et al. **Evaluation of the potential of Brazilian propolis against UV-induced oxidative stress. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine,** v. 2011, 2011a.

FRANZ, T. **Percutaneous absorption. On the relevance in vitro data.** The Journal of Investigative Dermatology, 64: 190-195. 1975.

KHAVKIN, J.; ELLIS, D. A. F. **Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology** Facial Plastic Surgery Clinics of North America, 2011.

LAHOUD, M.; CAMPOS, R. **Aspectos teóricos relacionados à reologia farmacêutica.** Visão Acadêmica, Curitiba, v.11, n.1, Jan. - Jun./2010

MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica.** Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, 2003.

MARQUES, M.; LOEBENBERG R. and ALMUKAINZI, M. **Simulated Biological Fluids with Possible Application in Dissolution Testing.** Dissolution Technologies, August 2011.

MOREIRA, V. **Desenvolvimento e avaliação da atividade anti-inflamatória de filmes poliméricos de quitosana contendo pentoxifilina para uso tópico.** Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Campina Grande, PB, 2018.

PRAÇA, F. **Liberação e permeação in vitro de produtos transdérmicos: um estudo de aparatos e de condições experimentais.** Tese de doutorado em Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, SP, 2010.

SANZ, R. *et al.* **Enhancing Topical Analgesic Administration: Review and Prospect for Transdermal and Transbuccal Drug Delivery Systems.** Current Pharmaceutical Design, 2015.

SANTER, V.; CHEN, Y.; KALIA, Y. **Controlled non-invasive iontophoretic delivery of triamcinolone acetonide amino acid ester prodrugs into the posterior segment of the eye.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 132 (2018) 157–167. Elsevier, 2018.

SCHMITT, P. **Influência de excipientes farmacêuticos sobre a eficácia de sistemas conservantes.** Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade do Vale do Itajaí. Itajaí, SC, 2015.

SERAFIM, M. *et al.* **A utilização da forma farmacêutica transdérmica como possibilidade terapêutica na medicina antroposófica.** *Arte Médica Ampliada*, 2013.

SIDHU G, PREUSS CV. **Triamcinolone.** 2022 Mar 24. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 31335029.

THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA. **<711> Dissolution.** DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_M99470_03_01, 2022a.

THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA. **<1724> Semisolid drug products—performance tests.** DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_M5695_02_01, 2022B.

THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA. **Triamcinolone acetonide.** DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_M84700_04_01, 2022c.

THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA. **Triamcinolone acetonide ointment.** DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_M84750_01_01, 2022d.

7. ANEXOS

Anexo I – Informações sobre submissão do artigo a revista AAPS PharmSciTech