

AVALIAÇÃO DO ESTUDO DE LIBERAÇÃO EM FORMULAÇÕES SEMISSÓLIDAS CONTENDO DIPROPIONATO DE BETAMETASONA

Palavras-Chave: *Genéricos, Corticosteroides tópicos, Célula de Franz*

Autores(as):

Lux Pires Ferreira Novaes da Silva, FCF – Unicamp

Prof. Dr. Paulo Cesar Pires Rosa, FCF - Unicamp

1. INTRODUÇÃO:

Corticosteroides tópicos são utilizados para tratamento de doenças inflamatórias, proliferativa ou de causa imunológica da pele, sendo também utilizados para aliviar os sintomas de prurido e queimaduras (Drake et al., 1996). São a base de tratamento de diversas patologias cutâneas, como por exemplo, a psoríase (Menter et al., 2008), queimadura solar, eczema atópico e dermatite seborreica (Costa, 2005). Por conta de seu crescente uso, se faz necessário o desenvolvimento de estudos de permeabilidade e biodisponibilidade desses medicamentos, a fim de comprovar sua eficácia.

O dipropionato de betametasona (DB) é um tipo de glicocorticoide sintético que tem ação metabólica, imunossupressora e anti-inflamatória. Ele se liga a receptores específicos de glicocorticóides dentro das células e, em seguida, se liga ao DNA para modificar a expressão dos genes. Esse processo leva à indução da síntese de proteínas antiinflamatórias e à inibição da síntese de mediadores inflamatórios específicos. Como resultado, ocorre uma redução geral na inflamação crônica e nas reações autoimunes (Pubchem, 2023).

A criação de novos produtos genéricos deve ser viável em questão de custos e de tempo, devido a concorrência do mercado. Para isso se faz necessária uma estrutura que exige a inclusão de vários indivíduos para ensaios clínicos (Benson, H.A.E., Watkinson, A.C., 2012). Entretanto, há métodos que avaliam a equivalência de produtos genéricos tópicos através de técnicas alternativas, como ensaios de permeação *in vitro* (Miranda M., 2018).

Métodos de discriminação da microestrutura do produto, como sua liberação e permeação *in vitro* são indispensáveis na produção de um produto genérico tópico (Roberts et al., 2017) e com o avanço das técnicas dos estudos de permeabilidade, há uma discussão sobre a substituição de modelos vivos para a realização desse tipo de estudo, uma vez que é necessário e possível a adoção de alternativas para o uso de pele humana devido aos problemas éticos e econômicos resultantes de sua aplicação (Neupane et al., 2020). Atualmente é possível realizá-los utilizando modelos *in vitro* que a simulem, o que dispensa seu uso. Nesse contexto, o modelo de Célula de Franz tem grande visibilidade, pois é uma alternativa para analisar a permeabilidade de medicamentos tópicos e é amplamente utilizado para esse fim.

A liberação promove a disponibilidade do fármaco para a absorção, dessa forma, um produto tópico deve ter ação termodinâmica comprovada para que o fármaco seja liberado para o estrato córneo. Tal liberação pode ser mensurada pelo estudo *in vitro* de liberação, utilizando células de Franz. No

desenvolvimento de uma formulação, seja na criação de um novo medicamento ou no caso de medicamentos cópia, como os genéricos, é de grande importância que a liberação *in vitro* do fármaco seja analisada, pois dessa forma é possível comparar o desempenho do novo medicamento em relação ao medicamento de referência. (ANVISA, 2019).

O objetivo deste projeto é comparar o perfil de liberação de dipropionato de betametasona em diferentes formulações de creme utilizando células de Franz.

2. MATERIAL E MÉTODOS:

2.1. Condição da análise

As amostras foram preparadas de acordo com as informações a seguir e foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV. Os parâmetros da análise estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros analíticos

Técnica analítica	HPLC	
Deteção	UV	
Comprimento de onda	240 nm	
Diluyente	Etanol:água (60:40)	
Fase Móvel A	Acetonitrila (100%)	
Fase Móvel B	Água purificada (100%)	
Fluxo	1,00 mL/min	
Coluna	C ₁₈ (100 X 4,6 mm – 5 µm)	
Temperatura da coluna	25 °C	
Volume de Injeção	10 µL	
Tempo de retenção	Aproximadamente 12,5 min para dipropionato de betametasona	
Tempo de corrida	15 minutos	
Condições cromatográficas	%A	%B
	50	50

3. VALIDAÇÃO

3.1. Adequabilidade do Sistema

A adequabilidade do sistema, ou *system suitability*, é definida segundo a RDC nº 166, de 14 de julho de 2017, publicada pela ANVISA, como um procedimento que deve ser realizado antes de uma corrida analítica, a fim de provar que o sistema está adequado para a análise desejada. Ela é determinada a partir de 5 injeções da solução padrão trabalho de dipropionato de betametasona 0,003 mg/mL.

3.2. Seletividade

A seletividade do método analítico é demonstrada pela sua capacidade de identificar e quantificar o ativo de interesse na presença de impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. A seletividade foi avaliada demonstrando que o método pode identificar e separar o ativo dos demais componentes da matriz e produtos de degradação.

3.3. Linearidade

A linearidade é a capacidade de um método analítico em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

A avaliação da linearidade envolveu a análise de seis concentrações diferentes de dipropionato de betametasona, com leituras realizadas em duplicata dentro de um intervalo entre 20% a 120%, o que corresponde a 0,0030 mg/mL de dipropionato de betametasona. Esse intervalo abrange concentrações na faixa de 0,0006 a 0,0036 mg/mL.

3.4. Precisão

A precisão descreve a proximidade dos resultados obtidos em uma série de preparos individuais de uma mesma amostra. É determinada em circunstâncias específicas de medição e comumente expressa pela repetibilidade e reprodutibilidade, usando o desvio padrão relativo. A precisão intracorrida (repetibilidade) é a concordância dos resultados em um curto período, com o mesmo analista e instrumentação. A precisão intermediária é a concordância dos resultados obtidos no mesmo laboratório, em dias diferentes, com analistas diferentes.

3.5. Exatidão

A exatidão do método analítico é a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor verdadeiro, que seria observado na ausência de erro. A exatidão é calculada como a porcentagem de recuperação de uma quantidade conhecida do padrão adicionada ao placebo, em relação aos valores de concentração da solução padrão. A exatidão foi determinada usando três concentrações (baixa, média e alta), preparadas em triplicata para o intervalo validado, a partir de três soluções estoques distintas.

3.6. Estabilidade

A estabilidade da solução é determinada pela recuperação e teor do ativo em uma faixa de tempo testada. Para ser considerada estável a recuperação do ativo deve estar entre 94 e 106%, enquanto o teor do ativo pode variar até 6%.

A estabilidade da solução de trabalho do padrão e da solução da amostra foi feita injetando-se o mesmo preparo da solução, na condição definida para análise, e avaliada em intervalos de tempos definidos pelo analista. Os intervalos de tempo para avaliação da estabilidade devem ser definidos com base na frequência de uso da solução e durabilidade do estudo em questão (24 e 48 horas).

Para este projeto, as soluções padrão e amostra foram injetadas nos tempos 0, 24 e 48 horas, e em cada um dos resultados foram calculados o teor de DB e a porcentagem de recuperação do ativo.

3.7. Robustez

A robustez é caracterizada como a capacidade que um método analítico possui em resistir a pequenas alterações em seus parâmetros. Na Tabela 2 estão descritas as variações de cada parâmetro.

Tabela 2. Condições nominais e suas respectivas variações

Parâmetro	Condição Nominal	Variação maior	Variação menor
Temperatura	25°C	27°C	23°C
Fluxo	1mL/min	1,1mL/min	0,9mL/min
Proporção fase móvel	50:50	48:52	52:48
pH	2,9	3,1	2,7
Coluna		Coluna 2	

O critério de aceitação de variação máxima é de 5%, portanto o método foi considerado robusto.

4. LIBERAÇÃO IN VITRO

Para a realização da liberação in vitro dos cremes de Dipropionato de betametasona, foi montado um sistema de 6 células de Franz acopladas em agitador magnético e mantido a temperatura constante através de aparelho de banho Maria termostático, como mostrado na Figura 1. Dentro de cada célula foi alocado um agitador, a fim de manter a solução homogênea.



Figura 1. Agitador magnético acoplado ao banho termostatzado

4.1. Parâmetros de análise

Para a realização da análise de liberação *in vitro* foram utilizados os parâmetros descritos na Tabela 3. Seguindo esses parâmetros, foi iniciado o procedimento da análise, em que suas etapas estão descritas na Figura 2.

Tabela 3. Parâmetros da análise de liberação *in vitro*

Parâmetro	Condição
Meio receptor	etanol:água 60:40 v/v
Volume	10 ml
Membrana	Acetato de celulose 0,45 μ m
Velocidade de agitação	1500 rpm
Volume de amostragem	500 μ l
Tempos de amostragem	15min, 30min, 45min, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 24, 27, 30 horas
Massa do creme no compartimento doador	0,5 g
Temperatura do meio	32°C

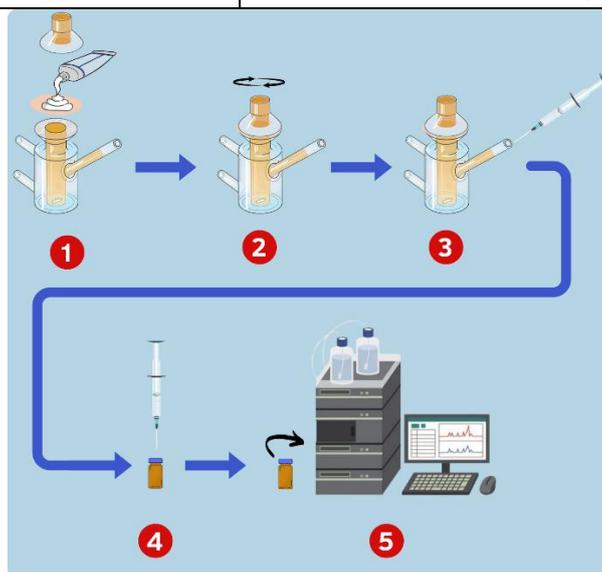


Figura 2. Esquema da análise de liberação *in vitro*. 1) Aplicação da amostra de creme no compartimento receptor da célula de Franz. 2) Agitação da solução a 32°C. 3) Coleta da amostra. 4) Envase da amostra em vial. 5) Análise da amostra em CLAE-UV

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A relação da média de porcentagem de DB liberada em cada creme para as 6 células de Franz está presente na Tabela 4. Nela é comparada a quantidade de princípio ativo presente na amostra inicial com a quantidade de DB presente na amostra extraída a cada momento. Em seguida, os resultados de concentração foram plotados no gráfico presente na Figura 3, a fim de comparar a curva de liberação dos diferentes cremes.

Tabela 4. Porcentagem de DB liberada ao longo do tempo com base na massa de creme inicial

Cremes	Liberação (%)													
	15m	30m	45m	1h	2h	3h	4h	5h	6h	9h	12h	24h	27h	30h
Referência	1,62	2,51	4,05	5,85	11,20	13,27	17,35	19,73	24,37	30,08	35,22	51,71	50,55	48,95
Genérico 1	0,00	0,21	0,36	0,76	1,74	2,15	3,21	4,68	6,17	9,51	12,43	21,39	23,94	26,23
Genérico 2	0,76	1,43	1,92	2,34	3,32	4,72	5,30	6,22	7,43	9,59	11,91	17,61	19,66	18,99

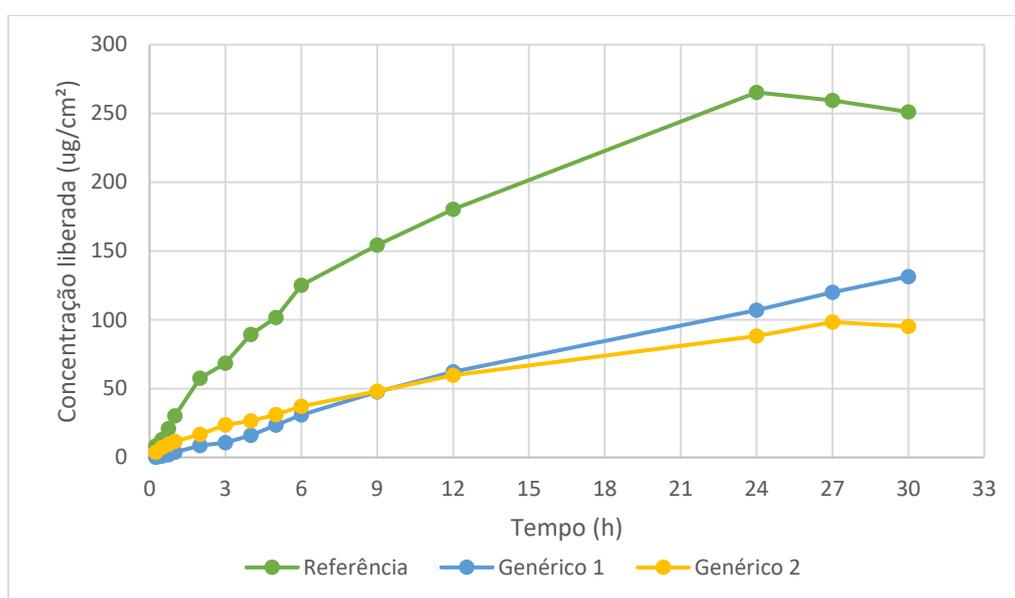


Figura 3. Gráfico comparativo da liberação de DB nos 3 diferentes cremes

Os resultados deste estudo indicam que a concentração de ativo liberada foi maior no creme de referência, sugerindo que os cremes genéricos analisados possam não cumprir os requisitos de desempenho *in vitro* exigidos no teste. São necessários mais estudos para analisar os fatores que possam ter influenciado nessa diferença considerável na liberação do ativo.

Essa diferença ressalta a importância de realizar análises de liberação *in vitro* na produção de medicamentos semissólidos genéricos. Diante dessas discrepâncias, a recomendação da ANVISA sobre a realização dessa análise para o registro de novos medicamentos tópicos genéricos no guia nº 20/2019 se mostra pertinente (ANVISA, 2019).

6. CONCLUSÕES

Conclui-se que o medicamento de referência demonstrou maior eficiência na liberação do princípio ativo, enquanto os cremes genéricos apresentaram uma menor porcentagem de liberação.

São necessários mais estudos para uma análise completa dos fatores que podem influenciar a diferença observada na liberação do princípio ativo nos cremes genéricos analisados.

7. BIBLIOGRAFIA

- ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n° 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 25 jul. 2017. Seção 1, p. 30-32.
- ANVISA. Guia 20, versão 1: Requisitos de qualidade para produtos tópicos e transdérmicos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2019.
- Benson, H.A.E., Watkinson, A.C., 2012. Topical and transdermal drug delivery: Principles and practice. John Wiley & Sons.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC n° 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 25 jul. 2017. Seção 1, p. 30-32.
- Costa, A. D., Machado, S., & Selores, M. (2005). Corticóides tópicos - Considerações sobre a sua aplicação. *Revista Portuguesa De Medicina Geral E Familiar*, 21(4), 367–73. <https://doi.org/10.32385/rpmgf.v21i4.10155>
- Drake LA, Dinehart SM, FarmerER, Goltz RW, Graham GF, HordinskyMK, et al. Guidelines of care for the use of topical glucocorticosteroids. *J AmAcad Dermatol* 1996 Oct; 35 (4): 615-9.
- Margarida Miranda, João José Sousa, Francisco Veiga, Catarina Cardoso, Carla Vitorino, Bioequivalence of topical generic products. Part 1: Where are we now?, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 123, 2018, Pages 260-267, ISSN 0928-0987, <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.07.050>.
- Menter, A., Gottlieb, A., Feldman, S. R., Van Voorhees, A. S., Leonardi, C. L., Gordon, K. B., Lebwohl, M., Koo, J. Y., Elmets, C. A., Korman, N. J., Beutner, K. R., & Bhushan, R. (2008). Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: Section 1. Overview of psoriasis and guidelines of care for the treatment of psoriasis with biologics. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 58(5), 826–850. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2008.02.039>
- Neupane, R., Boddu, S. H. S., Renukuntla, J., Babu, R. J., & Tiwari, A. K. (2020). Alternatives to Biological Skin in Permeation Studies: Current Trends and Possibilities. *Pharmaceutics*, 12(2),152. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020152>
- Roberts, M., Mohammed, Y., Namjoshi, S., Jung, N., Chaitanya, K., Cheruvu, S., Windbergs, M., Liu, X., Benson, H.A.E., Naegel, A., Wittum, R., Stokes, J., Shewan, H., Ghosh, P., Ramezanli, T., Raney, S., Grice, J.E., 2017. Correlation of physicochemical characteristics and in vitro permeation test (IVPT) results for acyclovir and metronidazole topical products FDA Workshop on Bioequivalence Testing of Topical Drug Products, in: FDA Workshop on Bioequivalence Testing of Topical Drug Products. Maryland.