



Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de diclofenaco de dietilamônio em pele humana por cromatografia líquida de alta eficiência

Silva, J.A.^{1*}; Bedor, D.C.G.²; Sousa, C.E.M.²; Santana, D.P.²; Egito, E.S.T.³

¹Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, UEPB

²Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE

³Departamento de Farmácia, Laboratório de Sistemas Dispersos (LASID), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, RN

Recebido 21/01/2010 / Aceito 03/06/2010

RESUMO

Foi desenvolvido e validado neste estudo um método analítico para quantificação de diclofenaco de dietilamônio em pele humana por cromatografia líquida de alta eficiência, segundo a Resolução 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Empregou-se cromatografia em fase reversa com coluna C18 150 x 4,6 mm, 5 µm Shimpack®, à temperatura de 40°C e fase móvel, constituída por mistura de acetonitrila e tampão fosfato de sódio 20 mM pH 3,0 (70:30, v/v) com fluxo de 1,2 mL min⁻¹. Os analitos foram detectados por UV a 280 nm e o método foi específico, preciso, exato, robusto e linear no intervalo de 0,05 a 20 µg mL⁻¹ (R² = 0,998), mostrando que pode ser utilizado em estudos de penetração cutânea *in vitro* tendo como modelo de membrana a pele humana.

Palavras-chave: Diclofenaco dietilamônio. Retenção cutânea. Validação.

INTRODUÇÃO

O diclofenaco de dietilamônio (DDA), apresentada na Figura 1, é um anti-inflamatório não esteroidal que funciona como potente inibidor da síntese das prostaglandinas. Quando administrado topicamente, penetra na pele em quantidade suficiente para atingir o local de ação de forma profunda, minimizando a toxicidade sistêmica (Magnette et al., 2004). O DDA é capaz de formar micelas e cristais líquidos liotrópicos em água (Kriwet & Mullergoymann, 1993) e interagir com os fosfolípidos da pele, além de contribuir para o aumento da fluidez do mesmo no estrato córneo fazendo com que os lipídios passem de uma forma

cristalina ordenada para uma forma líquida desordenada, aumentando, portanto, a permeabilidade cutânea (Escribano et al., 2003).

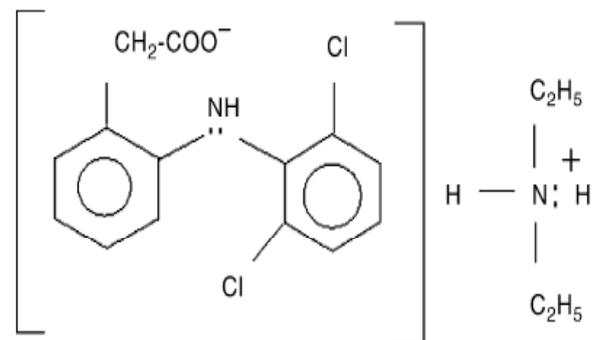


Figura 1. Estrutura química do diclofenaco de dietilamônio

Nos últimos anos, a necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade vem sendo cada vez mais reconhecida e exigida (Paula & Sena, 2007). Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, a metodologia deve sofrer uma avaliação denominada validação (Ribani et al., 2004). A validação de um método assegura a especificidade, exatidão e precisão de um ensaio analítico, tendo como objetivo garantir que o procedimento analítico forneça resultados reprodutíveis, confiáveis e que sejam adequados aos fins para os quais tenha sido planejado (Lavra et al., 2008).

Nos estudos *in vitro* de produtos dermatológicos, é importante considerar que as concentrações de fármacos, neste caso o DDA, por si só, não refletem a influência da formulação na atividade do produto. É necessário, portanto, que seja feita a determinação da quantidade de fármaco

Autor correspondente: Prof. Dr. José Aleksandro da Silva - Departamento Farmácia - Universidade Estadual Paraíba, PB - Coordenador do Curso Farmácia da UEPB - e-mail: alexuepb@yahoo.com.br

retido tanto no estrato córneo quanto na epiderme viável para nos levar a dados concretos que possam elucidar o grau de atividade tópica do produto (Sato et al., 2007) com fluxo alto, baixo ou inexistente através da pele (Shah et al., 1992).

Assim sendo, técnicas de separação, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), destacam-se em estudo de permeação cutânea *in vitro* pela capacidade de realizarem análises quali-quantitativas em amostras farmacêuticas (Ribani et al., 2004), como nas nanoemulsões de DDA.

Este estudo aborda a aplicação do método em uma técnica de extração do DDA em amostras de pele humana. Segundo a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), a eficiência da extração (recuperação) de um método analítico deve ser obtida através da comparação dos resultados analíticos de amostras “branco” acrescidas ao padrão e submetidas ao processo de extração com os resultados analíticos de soluções padrão não extraídas (Brasil, 2003). Sob esta perspectiva, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar uma metodologia analítica por CLAE para a determinação e extração do DDA em pele humana, o qual poderá ser utilizado em estudo de permeação e retenção cutânea.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram utilizados nesta pesquisa os seguintes compostos: Diclofenaco de dietilamônio (lote CDD 0045, Nortec Química, Brazil, pureza 99,5 %), metanol e acetonitrila grau cromatográfico (J. T Baker), fosfato de sódio monobásico (Merck), Água purificada do sistema Millipore Milli-Q® (Millipore Corporation – USA).

Métodos

Instrumentação e condições analíticas

Utilizou-se neste estudo um cromatógrafo líquido Shimadzu®, munido de forno de coluna (CTO 10Avp), detector de UV/VIS (SPD 10AVvp) configurado em 280 nm, mostruário automático (SIL 10ADvp), controlador do sistema (LCC 10Avp) e duas bombas (LC 10ADvp). A separação cromatográfica foi obtida usando uma coluna analítica tipo C18 150 x 4,6 mm, 5 µm Shimpack® (Shimadzu, Kyoto, Japão) acoplada a uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA, EUA). A fase móvel utilizada foi constituída de uma mistura de acetonitrila e tampão fosfato de sódio 20 mM (70:30, v/v), ajustado a pH 3,0 com ácido fosfórico, sendo em seguida filtrado, degaseificado e bombeado em uma vazão de 1,2 mL min⁻¹. O forno da coluna foi ajustado para 40°C e o volume de injeção foi de 30 µL, com tempo de corrida total de 3,5 minutos.

Desenvolvimento e validação do método analítico

O desenvolvimento do método teve início com a realização de uma varredura espectrofotométrica na região

do UV, em uma faixa de 250 a 350 nm do padrão do DDA, objetivando-se identificar em qual comprimento de onda o fármaco apresentava valores de absorvância máximos. O método de separação cromatográfica desenvolvido, capaz de quantificar o DDA nas amostras de pele humana, foi alcançado com um sistema de eluição isocrático, em coluna de fase reversa C18, 150 x 4,6 mm, partícula 5 µm com temperatura do forno da coluna ajustado para 40°C.

A validação da metodologia analítica foi conduzida segundo Resolução da ANVISA RE n° 899, que determina que os parâmetros seletividade (linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão e robustez) devem ser analisados.

A seletividade foi determinada pela avaliação da interferência de compostos da pele e da fita adesiva utilizada na separação do estrato córneo da epiderme. Amostras de pele (sem DDA) foram submetidas ao procedimento de extração através da técnica de *tape stripping* (Lira et al., 2008).

A linearidade do método foi verificada a partir da análise de três curvas analíticas em 9 níveis de concentração e em uma faixa de 0,05 a 20 µg mL⁻¹. Para a obtenção da curva analítica, uma solução padrão de 1,0 mg mL⁻¹ foi preparada pela dissolução de 10 mg de DDA em 10 mL de metanol. A partir desta solução, foram feitas diluições em triplicata, de forma a obter soluções de 0,05; 0,1; 0,4; 0,8; 1,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20 µg mL⁻¹. A linearidade foi estimada pela análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

A exatidão foi determinada por intermédio de análises em três diferentes concentrações (0,5, 1,0 e 1,5 µg mL⁻¹), em três repetições e expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

A precisão foi determinada por análises em seis repetições na concentração (1,0 µg mL⁻¹). A precisão do método foi avaliada em dois níveis: repetitividade (precisão intra-corrída) e precisão intermediária (precisão inter-corrídas), sendo expressas como coeficiente de variação (CV%) segundo a fórmula: $CV = DP/CMD$, em que DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada.

No parâmetro robustez foi analisada a possível influência de pequenas variações ocasionadas pela marca do solvente metanol, adquirido por diferentes fornecedores, e a temperatura do forno da coluna (30 e 40°C).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados de acordo com as equações $LD = DP \times 3/IC$ e $LQ = DP \times 10/IC$, em que DP é o desvio padrão dos coeficientes lineares obtidos com três curvas analíticas e IC é a média dos coeficientes angulares das respectivas curvas (Brasil, 2003).

Preparação da pele humana

O desenho consistiu de um estudo, no qual foram utilizadas peles humanas oriundas de cirurgias plásticas. Estas foram submetidas ao processo de lavagem com solução isotônica e água estéril e, em seguida, foi retirada a gordura subjacente com a ajuda de uma tesoura cirúrgica. A pele foi fragmentada em peças de 6 cm², seguindo-se a remoção do tecido gorduroso remanescente da pele. As secções de pele foram congeladas por até um mês antes de

serem utilizadas nos ensaios segundo metodologia adaptada de Lira (2007). O referido estudo foi conduzido após aprovação prévia do Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, sob ofício de nº333/2007, bem como do consentimento livre e esclarecido da paciente submetida à cirurgia plástica.

Recuperação do DDA na pele humana

Para avaliar a recuperação do DDA nas amostras da pele, o estrato córneo (EC) foi retirado de uma área de 1,15 cm² da pele com o uso de 15 fitas adesivas usando a técnica *tape stripping* (Lira et al., 2008). As fitas contendo o EC foram colocadas em tubos de ensaio e, em seguida, foram adicionados volumes conhecidos (100µL) de solução padrão de DDA em metanol em três concentrações diferentes (1000, 400 e 40 µg mL⁻¹). O metanol foi evaporado e, em seguida, adicionado a 5 mL do solvente extrator (metanol) para extração do DDA. Os tubos foram agitados em vortex por 2 minutos, submetidos a banho de ultrassom por 30 minutos, filtrados utilizando membranas com poro de diâmetro 0,45 µm e quantificados por CLAE (n=6).

A pele sem o EC foi picotada e transferida para tubos. A estes tubos foram adicionadas quantidades de solução padrão de DDA em metanol semelhantes às utilizadas anteriormente. O metanol foi evaporado e, em seguida, adicionado a 5 mL do solvente extrator (metanol) para extração do DDA. Os tubos foram colocados em homogeneizador de tecidos por 12 minutos e em banho de ultrassom por mais 30 minutos, seguido de filtração utilizando membranas com poro de diâmetro 0,45 µm e quantificação por CLAE (n=6). Os valores de recuperação (%) foram determinados pela equação 1 conforme Lira (2007).

Recuperação(%) = concentração obtida/concentração real x 100(1)

RESULTADOS

A varredura espectrofotométrica, 250-350 nm (Figura 2), realizada para a verificação do comprimento de onda adequado, demonstrou que o DDA apresentou pico máximo de absorvância em 282 nm, valor próximo ao encontrado pelo método desenvolvido por CLAE, que foi de 280 nm, e aos citados na literatura (Sintov & Botner, 2006; Parsaei et al., 2002; Kriwet & Muller-goymann, 1995).

A metodologia desenvolvida e validada mostrou-se em conformidade com as especificações da legislação vigente no Brasil (Brasil, 2003), obtendo um tempo de intra-corrida de 3,5 minutos, com tempo de retenção de 2,9 minutos para DDA. Adicionalmente, o método mostrou seletividade, já que as amostras de pele sem DDA não mostraram nenhum pico interferente no tempo de retenção do DDA (Figura 3).

O método proposto neste estudo apresentou linearidade em uma faixa de 0,05 a 20 µg mL⁻¹. A curva analítica ($y=0,944x+106,2$), obtida pelo método dos mínimos quadrados, apresentou um coeficiente de correlação (r) igual a 0,998, o que está em concordância com o critério mínimo aceitável pela ANVISA (Brasil, 2003) que é $r = 0,99$. O limite de detecção e o limite de quantificação foram de 0,003 µg mL⁻¹ e 0,05 µg mL⁻¹, respectivamente.

A precisão intra-corrida e a precisão intermediária foram avaliadas a partir da injeção em sextuplicata (Brasil, 2003; ICH, 2005), em que a concentração testada - 1,0 µg mL⁻¹ - foi escolhida por representar o ponto médio da curva analítica (0,05 a 20 µg mL⁻¹), cujos valores são expressos na Tabela 1.

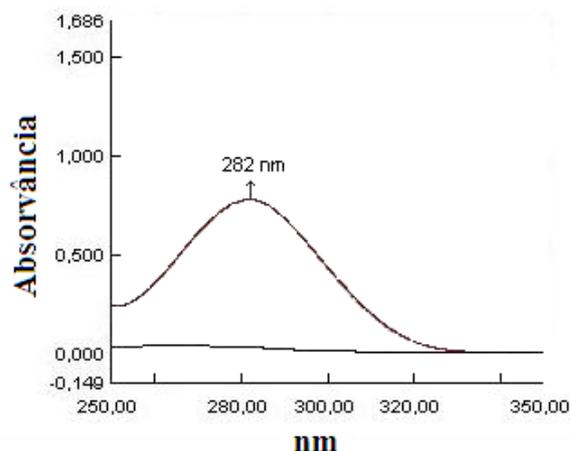


Figura 2. Varredura espectrofotométrica na região de 250-350 nm do padrão DDA (20 µg mL⁻¹).

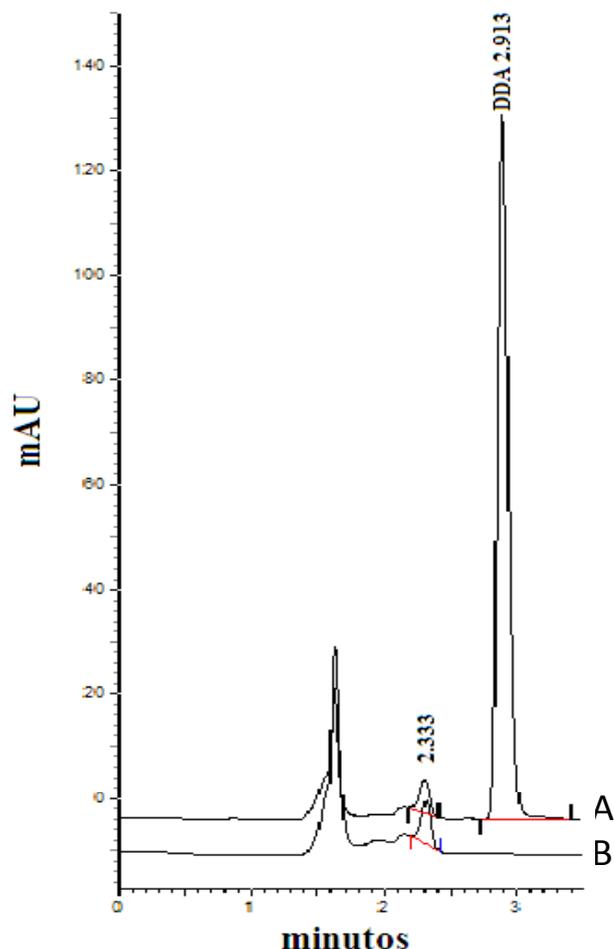


Figura 3. Representação do cromatograma de DDA (A) e da formulação placebo + pele humana + fita adesiva (B) para obtenção da seletividade do método em pele humana.

Tabela 1. Precisão intra-corrída e precisão intermediária do método validado.

Analistas	Dia	Concentração Nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração encontrada Média (n=6)	Precisão (%)	Exatidão (%)
Analista 1	Dia 1	1,000	0,948 \pm 0,04	4,25	94,8
	Dia 2	1,000	0,875 \pm 0,022	2,49	87,5
Analista 2	Dia 1	1,000	0,956 \pm 0,039	4,1	95,6
	Dia 2	1,000	0,897 \pm 0,008	0,9	89,7

A exatidão do método foi avaliada após a determinação da linearidade e da seletividade, sendo verificada a partir de 9 determinações, contemplando o intervalo linear do procedimento; ou seja, três réplicas de uma concentração baixa ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), três réplicas de uma concentração média ($1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e três réplicas de uma concentração alta ($1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Exatidão do método validado

Ensaio	Concentração Nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração encontrada Média \pm DP(n=3)	Exatidão %
Exatidão	0,500	0,501 \pm 0,052	100,2
	1,000	0,919 \pm 0,015	91,9
	1,500	1,557 \pm 0,031	103,8

Foi constatado, também, que o método possui robustez intrínseca, pois manteve sua resposta, em triplicata, em meio às variações da marca do metanol, fornecedores diferentes ($0,94 \pm 0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,93 \pm 0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente), e a temperatura da coluna 40 e 30°C ($0,93 \pm 0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,94 \pm 0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente).

Recuperação do DDA na pele humana

A Tabela 3 mostra os valores do DDA ($0,08$; $8,0$ e $20 \mu\text{g mL}^{-1}$) extraídos do EC e da epiderme+derme (ED) da pele humana, sendo que o método de extração do DDA desenvolvido mostrou-se adequado para estudo de permeação cutânea *in vitro*, além de ter sido seletivo para o fármaco estudado.

Tabela 3. Recuperação do DDA no estrato córneo e na epiderme + derme de pele humana

	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
	0,08 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (n=3)		8,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (n=3)		20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (n=3)	
	Média \pm DP	CV (%)	Rec. (%)	Média \pm DP	CV (%)	Rec. (%)
EC	0,099 \pm 0,015	14,77	91,93	7,191 \pm 0,48	6,68	80,32
ED	0,104 \pm 0,01	6,31	96,89	8,06 \pm 0,69	8,67	90,0
Solução	0,107 \pm 0,01	9,42	-	8,95 \pm 0,03	0,33	-
Padrão						

Rec = Recuperação, EC = Extrato Córneo, ED = Epiderme + Derme

DISCUSSÃO

Nos experimentos *in vitro* de liberação e penetração cutânea, a quantidade de fármaco a ser analisada, normalmente, é muito pequena, o que requer metodologias analíticas seletivas e de alta sensibilidade. Em razão disso, a CLAE tem sido empregada como método analítico de escolha na maioria dos estudos de liberação *in vitro* de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), conforme relatado no estudo de Silva et al. (2009).

As condições para o método cromatográfico foram primeiramente estabelecidas com o padrão de DDA e, após otimização dos parâmetros exigidos pela legislação (Brasil, 2003), foram aplicadas para o doseamento de DDA, incorporado nas amostras de pele. O DDA apresentou pico máximo de absorvância em 282 nm, valor próximo ao encontrado pelo método desenvolvido por CLAE, que foi de 280 nm. É importante assinalar que, em estudo realizado por Berbenni et al. (2001), foi discutido e relatado que valores de absorvância ligeiramente diferentes podem ser decorrentes de dissolução, solvatação, clivagem de retículo cristalino, conformações moleculares, pontes de hidrogênio, interação com solvente e variações de temperatura.

A metodologia desenvolvida e validada mostrou-se em conformidade com as especificações da legislação vigente no Brasil (2003). Os picos obtiveram boa resolução, com um tempo de corrida de apenas 3,5 minutos, o que é adequado para estudos de permeação cutânea *in vitro* devido ao grande número de picos neste tipo de amostra.

A seletividade ou especificidade é o primeiro passo para o desenvolvimento e validação de um método analítico e este parâmetro deve ser reavaliado continuamente durante a validação e o uso do método, pois, se a especificidade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (Ribani et al., 2004). A linearidade de um método demonstra que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do fármaco na amostra, dentro de um intervalo especificado (Lavra et al., 2008). Desse modo, o método proposto neste estudo apresentou linearidade em uma faixa de $0,05$ a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A administração de medicamento pela via cutânea destina-se à obtenção tanto de uma ação tópica como sistêmica, sendo primordial que se tenha uma definição de qual destas ações é desejada, visto que os critérios para avaliação destes produtos são conceitualmente diferentes (Sato et al., 2007). De um produto dermatológico destinado ao tratamento de inflamações cutâneas, exige-se sua retenção na pele, com fluxo alto, baixo ou inexistente através da pele (Shah et al., 1992).

De acordo com a legislação brasileira (Brasil, 2003), a recuperação é a eficiência de extração de um método analítico. A eficiência é expressa pelo quociente, entre o resultado analítico da amostra após o processo de extração e a solução padrão não extraída.

A determinação por CLAE do DDA recuperado da pele humana foi realizada após a extração direta em metanol. Este procedimento apresentou-se adequado, uma vez que o fármaco é solúvel neste solvente e os componentes da pele humana e da fita adesiva, que também foram extraídos, não interferiram no método analítico, conforme cromatograma da Figura 3. Segundo Causon (1997), é recomendado que a extração não exceda 20%. Por conseguinte, os resultados aqui apresentados mostram que os valores de extração de DDA na pele humana estão de acordo com os limites estabelecidos.

O método de extração de DDA desenvolvido mostrou-se adequado para estudo de permeação cutânea *in vitro*, o qual demonstrou melhores resultados de recuperação que o encontrado no estudo de Lopes (2005), que relatou uma recuperação de apenas 74 %. Além disso, o referido método de extração apresentou-se seletivo para o

DDA com uma técnica de execução simples, baixo tempo de análises e baixo custo operacional, o que é relevante para estudo de cinética de permeação *in vitro*.

Em conclusão, o método analítico proposto neste trabalho foi desenvolvido a fim de disponibilizar um procedimento analítico para quantificação de DDA em pele humana, devido à inexistência de métodos oficiais destinados a estes tipos de ensaios. Adicionalmente, o mesmo pode ser considerado como método alternativo para doseamento em formas farmacêuticas (nanoemulsões, emulgeis) por se tratar de um método simples, apresentando confiabilidade e segurança necessárias em procedimentos analíticos. Os parâmetros estudados garantiram rapidez, seletividade, linearidade, exatidão e precisão, apresentando-se, portanto, validado conforme a RE 899/2003 da ANVISA (Brasil, 2003) e sendo recomendado para estudo de permeação cutânea *in vitro*.

ABSTRACT

Development and validation of an analytical method for quantitation of diclofenac diethylamine in human skin by high performance liquid chromatography

An analytical method has been developed and validated for the quantitation of diclofenac diethylamine (DDA) in human skin by high performance liquid chromatography (HPLC), in accordance with Regulation 899/2003 of the National Sanitary Surveillance Agency (ANVISA). The HPLC column was a reversed-phase Shimpack® C18, with a 5 µm particle bed, measuring 150 x 4.6 mm i.d., eluted isocratically at 40°C with 20 mM sodium phosphate buffer (pH 3.0):acetonitrile (30:70, v/v), the mobile phase flowing at 1.2 mL min⁻¹. Analytes were measured by a UV detector set at 280 nm. The results revealed that the method was specific, precise, accurate, robust and linear (R²=0.998) in the range from 0.05 to 20 µg mL⁻¹. Therefore, it can safely be used to assess DDA *in vitro* penetration of human skin in kinetic studies.

Keywords: Diclofenac diethylamine. Human skin retention. Validation.

REFERÊNCIAS

- Berbenni V, Marini A, Bruni G, Cardiniet A. Thermoanalytical and spectroscopic characterization of solid-state retinoic acid. *Int J Pharm.* 2001; 221:123-41.
- Brasil. Resolução nº 899, de 29 maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos [Internet]. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder executivo, Brasília, DF, Diário Oficial da União, 02 jun 2003. Disponível em: https://anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm.
- Causon R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis; viewpoint and discussion. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1997; 689:175-80.
- Escribano E, Calpena AC, Queralt J, Obach R, Domenech J. Assessment of diclofenac permeation with different formulations: anti-inflammatory study of a selected formula. *Eur J Pharm Sci.* 2003; 19(4):203-10.
- International Conference on Harmonisation (ICH). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), 2005.
- Kriwet K, Mullergoymann CC. Binary diclofenac diethylamine water-systems–Micelles, vesicles and lyotropic liquid-crystals. *Eur J Pharm Biopharm.* 1993; 39(6):234-8.
- Kriwet K, Mullergoymann CC. Diclofenac Release from Phospholipid Drug Systems and Permeation through Excised Human Stratum-Corneum. *Int J Pharm.* 1995; 125(2):231-42.
- Lavra ZMM, Rolim-Neto PJ, Silva RMF, Medeiros FPM. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação simultânea de lamivudina, zidovudina e nevirapina em comprimidos dose-fixa combinada por cromatografia líquida de alta eficiência. *Quím Nova* 2008; 31(5):969-74.
- Lira AAM, Sester EA, Carvalho ALM, Strattmann RR, Albuquerque MM, Wanderley AG, Santana DP. Development of lapachol formulation: anti-inflammatory study of a selected formulation. *AAPS PharmSciTech.* 2008; 9(1):163-8.
- Lira AAM. Desenvolvimento, caracterização e avaliação de sistemas microestruturados para veiculação de ácido retinóico na pele. [Tese] Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2007.
- Lopes LB. Estratégias para o aumento da penetração cutânea de fármacos peptídeos: avaliação *in vitro* e *in vivo* de sistemas de liberação de moléculas carreadoras. [Tese] São Paulo: Departamento de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, 2005.
- Magnette JL, Kienzler JL, Sallin D. Diclofenac systemic exposure is not increased when topical diclofenac is applied to ultraviolet-induced erythema. *Eur J Clin Pharmacol.* 2004; 60:591-4.
- Parsaee S, Sarbolouki MN, Parnianpour M. *In vitro* release of diclofenac diethylammonium from lipid-based formulations. *Int J Pharm.* 2002; 241:185-90.
- Paula NK, Sena MM. Validação de metodologia analítica para o doseamento simultâneo de mebendazol e tiabendazol por cromatografia líquida de alta eficiência. *Quím Nova* 2007; 30(5):1359-61.
- Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quím Nova* 2004; 27(5):771-80.
- Sato MEO, Gomara F, Pontarolo R, Andrezza IF, Zaroni. Permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico. *Rev Bras Ciênc Farm.* 2007; 43(2):195-203.

Shah VP, Elkins J, Skelly JP. Relationship between in vivo skin blanching and *in vitro* release rate for betamethasone valerate creams. *J Pharm Sci.* 1992; 81(1):104-06.

Silva JA, Santana DP, Bedor DCG, Borba VFC, Lira AAM, Egito EST. Estudo de liberação e permeação *in vitro* do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. *Quím Nova* 2009; 32(6):1389-93.

Sintov AC, Botner S. Transdermal drug delivery using microemulsion and aqueous systems: Influence of skin storage conditions on the in vitro permeability of diclofenac from aqueous vehicle systems. *Int J Pharm.* 2006; 311(1-2):55-62.