

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO DE FORMA FARMACÊUTICA
NANOEMULSIONADA PARA ADMINISTRAÇÃO
INTRAVENOSA DE CARBAMAZEPINA**

Regina Gendzelevski Kelmann

Forianópolis
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmácia

**DESENVOLVIMENTO DE FORMA FARMACÊUTICA
NANOEMULSIONADA PARA ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA DE
CARBAMAZEPINA**

*Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Farmácia como
requisito parcial à obtenção do grau de
Mestre em Farmácia*

Orientadora: Profa. Dra. Leticia Scherer Koester
Co-orientador: Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira

Regina Gendzelevski Kelmann

Forianópolis
2006

À minha mãe, Maria Gendzelevski,
pelo exemplo de vida, força e coragem

Agradecimentos

Ao meu pai, Henrique Adolpho Kelmann, que hoje não compreende mais muito bem o que acontece em minha vida, mas que durante anos foi incentivador do meu desenvolvimento intelectual e cultural, sendo um exemplo para mim.

À minha mãe, que sempre me apoiou em minhas decisões e faz tudo para que eu me torne uma pessoa melhor.

Um agradecimento mais do que especial à melhor orientadora que existe nesse mundo, Profa.. Dra. Letícia Scherer Koester que, além de orientadora, é uma amiga. Agradeço seus conselhos e as conversas que tínhamos quando eu ficava desanimada pelos experimentos que não davam certo ou por problemas pessoais.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira, pela colaboração, sendo com o fornecimento de matérias-primas assim como em considerações importantíssimas nos experimentos e resultados.

Á Prof. Msc. Fabiana E. B. da Silva, minha orientadora de iniciação científica, que ajudou no despertar da minha vocação para a pesquisa.

Ao Prof. Dr. Marcos Antônio Segatto Silva, pelas conversas e conselhos.

A todos amigos do laboratório de controle de qualidade e “agregados”, Ariane, Bruno, Fábio, Monika, Patrik, Rafael, Talize e Tatiane, pela amizade e apoio. Faço um agradecimento especial a Gislaine, cuja colaboração na realização deste trabalho foi de muita importância.

Aos amigos do LAFESC, em especial à Liemar.

A FAPESC, Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina e a Pró-Reitoria de Pesquisa da UFSC (Programa Funpesquisa) pelo apoio financeiro.

“A mente que se abre a uma nova idéia nunca voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS	
Objetivo geral	5
Objetivos específicos.....	5
CAPÍTULO 1	
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
1. Emulsões parenterais	7
1.1 Composição e seleção de excipientes.....	10
1.1.1 Óleos.....	10
1.1.2 Tensoativos.....	11
1.1.3 Demais adjuvantes.....	13
1.2 Técnicas de preparo	14
1.3 Caracterização das nanoemulsões	16
1.3.1 Tamanho de gotícula da fase interna.....	16
1.3.2 Potencial zeta.....	17
1.3.3 Viscosidade.....	17
2 Carbamazepina	18
2.1 Uso Terapêutico.....	18

2.2 Farmacocinética.....	19
2.3 Características Físico-Químicas	20
2.4 Desenvolvimento de formas farmacêuticas injetáveis contendo carbamazepina	21
3 Planejamento Fatorial no desenvolvimento de formas farmacêuticas	22

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES PARENTERAIS CONTENDO CARBAMAZEPINA: ESTUDO DA INFLUENCIA DO POLIMORFISMO DO FÁRMACO NA VIABILIDADE DAS FORMULAÇÕES	24
--	----

Publicação: Development of nanoemulsions for intravenous administration of carbamazepine: the influence of drug polymorphism 26

CAPITULO 3

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO DE NANOEMULSÕES PARENTERAIS CONTENDO CARBAMAZEPINA.....	41
--	----

Publicação: Determination of carbamazepine in parenteral nanoemulsions: development and validation of a HPLC method 43

CAPITULO 4

DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES PARENTERAIS CONTENDO CARBAMAZEPINA.....	54
---	----

Publicação: Development and characterization of carbamazepine parenteral emulsions prepared by spontaneous emulsification process 56

DISCUSSÃO GERAL	85
------------------------------	-----------

CONCLUSÕES.....	90
------------------------	-----------

REFERÊNCIAS	92
--------------------------	-----------

ANEXOS.....	104
--------------------	------------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Exemplos de medicamentos encontrados no mercado farmacêutico na forma de nanoemulsões lipídicas para administração parenteral.....	9
Tabela 1.2: Solubility of CBZ in various oils at 25°C	32
Tabela 2.2: Particle size (nm) and polydispersity index measures for CBZ emulsions (3.0 mg/mL)	32
Tabela 1.3: Results from the precision of the method.....	51
Tabela 2.3: Recovery of CBZ standard solution added to emulsion samples.....	51
Tabela 1.4: Variables and levels of 22 factorial design for preparation of CBZ nanoemulsions.....	63
Tabela 2.4: Experimental arrangement.....	63
Tabela 3.4: Results of viscosity, drug content and drug association of CBZ lipid emulsions.....	72
Tabela 4.4: Results of the characterization of M-L-6 CBZ nanoemulsion	76
Tabela 1.(A I): Resultados para caracterização da carbamazepina	107
Tabela 2.(A II): Intensidades relativas nos diferentes ângulos para difração de raios X	109

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Estrutura química da Lecitina	12
Figura 2.1: Estrutura química do polissorbato 80, poloxâmero 188 e óleo de rícino polietoxilado	13
Figura 3.1: Estruturas química e molecular da carbamazepina (5Hdibenz[b,f]azepino-5-carboxamida)	18
Figura 1.2: DSC thermal profiles of CBZ bulk material and precipitated crystals from emulsions at heating rate of 10 °C min ⁻¹	34
Figura 2.2: (A) FTIR spectra for the precipitated crystals from the four nanoemulsions developed and from the bulk material. (B) Enlarged OH stretching region (3000-3800 cm ⁻¹).....	35
Figura 3.2: Photomicrographs of CBZ crystals from all developed nanoemulsions	36
Figura 1.3: Structure of carbamazepine.....	46
Figura 2.3: Chromatograms of: (A) individual methanol solutions containing CBZ and formulations excipients; and (B) chromatograms of individual methanol solutions containing only the formulations excipients	50
Figura 1.4: Structure of carbamazepine.....	59
Figura 2.4: CBZ solubility in castor oil, MCT:castor oil mixture and MCT	68
Figura 3.4: Results of mean droplet size (\pm S.D.) and polydispersity index values (\pm S.D.) of CBZ nanoemulsions.....	70

Figura 4.4: Zeta potential results of CBZ nanoemulsions.....	71
Figura 5. Plots of AB interactions; (A) Drug content, (B) Association Efficiency, (C) Droplet size, (D) Polydispersity index, (E) Potential Zeta, (F) Viscosity. Darker line: variable B at low level; Slighter line: variable B at high level.....	74
Figura 5.4 Transmission electron photomicrograph of the M-L-6 CBZ nanoemulsion	76
Fig. 6.4 In vitro release profile of M-L-6 CBZ nanoemulsion from dialysis bag in phosphate buffer pH= 7.4.Detail: Higuchi plot.....	78
Figura 1.(A I): Espectro de absorção da CBZ no infravermelho	108
Figura 2.(A I): Espectro de absorção da CBZ na região do ultravioleta.....	108
Figura 3.(A I): Gráfico representativo da análise de difração de raios X	109
Figura 4.(A I): Curva TG da carbamazepina e atmosfera dinâmica de N2 e razão de aquecimento de 10 °C/min.....	110
Figura 5(A I) Curva DSC da carbamazepina	111

LISTA DE ABREVIATURAS

A/O	Água em óleo
CBZ	Carbamazepina
CLAE ou HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
IR	Infrared
O/A	Óleo em água
p/p	Peso/peso
p/v	Peso/volume
PI	Índice de polidispersidade
TCM ou MTC	Triglicerídeos de cadeia média
TG	Termogravimetria
UV	Ultravioleta

RESUMO

A carbamazepina (CBZ), fármaco pouco hidrossolúvel e de primeira escolha nos tratamentos da epilepsia psicomotora e neuralgia do nervo trigêmeo, não apresenta forma farmacêutica parenteral disponível aos pacientes, o que pode se fazer necessário em situações de emergência, como tratamento intensivo ou coma. O presente trabalho visa o desenvolvimento de um sistema nanoemulsionado, pela técnica de emulsificação espontânea, para administração parenteral de CBZ. Um primeiro grupo de formulações foi preparado, visando a incorporação de 3 mg/mL de fármaco, porém durante o período de armazenamento ocorreu o aparecimento de precipitados cristalinos, o que foi atribuído à transição polimórfica da CBZ, sugerindo a necessidade de alterações na concentração do fármaco, tensoativos e fase oleosa. Para avaliar a influência do tipo de óleo e tipo de tensoativo sobre as características das formulações (tamanho de gotícula, índice de polidispersidade, potencial zeta, teor e taxa de associação do fármaco, e viscosidade), foi empregado um delineamento fatorial 2². Um método por CLAE foi desenvolvido e validado para o doseamento das formulações, que foram desenvolvidas com 2 mg/mL de CBZ. Estas apresentaram características compatíveis com a via parenteral, porém ainda foram encontrados precipitados cristalinos após três meses de armazenamento. A formulação considerada mais promissora, composta por lecitina de soja como tensoativo, e mistura de óleo de rícino e triglicerídeos de cadeia média (1:1, p/p), como fase oleosa, foi otimizada e suas características foram novamente avaliadas, incluindo o emprego de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e a realização de um estudo de liberação *in vitro*. A formulação apresentou tamanho de gotícula em torno de 150 nm e índice de polidispersidade de 0,2, o que foi confirmado pela análise realizada por MET. Estas características, assim como o potencial zeta (- 40 mV) e o teor (acima de 93 %), mantiveram-se estáveis mesmo após três meses de armazenamento. A cinética de liberação da CBZ a partir da formulação obedeceu à equação de Higuchi ($r^2 > 0,99$).

Palavras-chave: carbamazepina, nanoemulsões, administração parenteral

DEVELOPMENT OF A CARBAMAZEPINE NANOEMULSION FOR PARENTERAL DELIVERY

ABSTRACT

Carbamazepine (CBZ), a widely used anticonvulsant drug, is an example of a poorly soluble drug, are available only as tablets, suspensions and capsules in the pharmaceutical market. No parenteral treatment is available for patients. In this context, the aim of this study was to development carbamezepine nanoemulsions by spontaneous emulsification process, as an alternative for patients who can not take this drug orally. A first group of formulations was prepared with a drug content of 3.0 mg/mL, nevertheless, during the storage time, these formulations presented drug precipitates as a result of a polymorphic transition. An optimization of oily phase, drug content and emulsifier proportion resulted in a second group of 2.0 mg/mL of CBZ formulations. The development of these nanoemulsions was made by applying a 2² factorial design to study the influence of type of oil and lipophilic emulsifier on nanoemulsions characteristics (droplet size, zeta potential, viscosity, drug content and association to the oily phase). A HPLC method was developed and validated for the quantitative determination of carbamazepine (CBZ) in the nanoemulsions. The emulsions characteristics were acceptable for parenteral route but drug precipitates were still observed after three months of storage. The nanoemulsion composed by a mixture of castor oil and MCT (1:1, w/w) as oily core and soybean lecithin as lipophilic emulsifier seemed to be the most promising formulation. So, this was optimized and characterized again, including a transmission electronic microscopy (TEM) analysis and an *in vitro* drug delivery study. The last formulation presented a mean droplet size of about 150 nm, confirmed by TEM analysis and polydispersity index of 0.2. These characteristics, as well as zeta potencial (-40 mV) and drug content (above 93%) remained stable even after three months of storage. The Higuchi was the model which best characterized this release profile ($R^2 > 0.99$).

Keywords: carbamazepine, nanoemulsions, parenteral delivery.

INTRODUÇÃO GERAL

Emulsões lipídicas vêm sendo utilizadas com sucesso há mais de cinquenta anos como fonte de calorias e ácidos graxos na nutrição parenteral. Suas propriedades físico-químicas, biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade as tornam excelentes veículos para administração de fármacos (BENITA e LEVY, 1993; WRETLIND, 1999; FLOYD, 1999).

Para serem compatíveis com a via parenteral, esses sistemas precisam ter como característica principal o reduzido tamanho das gotículas de óleo, que deve ser inferior a 1 μm , geralmente na faixa de 100-500 nm, o que denomina essas formas farmacêuticas como nanoemulsões (BENITA e LEVY, 1993)

A administração parenteral de fármacos pouco solúveis é um desafio tecnológico e as nanoemulsões do tipo óleo em água (O/A) podem contornar esse problema pela incorporação do fármaco no interior das gotículas de óleo, evitando o uso de solventes e co-solventes (propilenoglicol, etanol, dimetilsulfóxido, polietilenoglicol) que, muitas vezes, são responsáveis pelo aparecimento de reações indesejáveis como dor, inflamação e precipitação do fármaco durante a administração, além do fato de serem dose-limitantes em função de sua toxicidade (LEVY e BENITA, 1989; YALIN *et al.*, 1997; LUNDBERG *et al.*, 2003)

A carbamazepina é o fármaco de primeira escolha para o tratamento da epilepsia e neuralgias craniofaciais e movimenta, no Brasil, US\$ 23 milhões por ano. Somente o Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos, FIOCRUZ) produz anualmente 43 milhões de comprimidos deste fármaco (CASTELÕES, 2002). Cabe ressaltar que a carbamazepina faz parte da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (Rename), elaborada pelo Ministério da Saúde. Esses fatos denotam o interesse tanto da indústria farmacêutica como de órgãos federais por este fármaco.

A carbamazepina está disponível no mercado farmacêutico sob as formas de comprimidos, cápsulas e suspensões orais (LUND,1994; KOROLKOVAS, 2004; BRASIL, 2006; FDA, 2006). A obtenção de uma formulação de uso parenteral, é desejável, pois em situações adversas ou em casos específicos, como cirurgias em

pacientes epiléticos, tratamento intensivo ou coma, a administração intravenosa pode tornar-se uma opção terapêutica necessária (BECIREVICAN-LACAN *et al.*, 2002; AKKAR e MÜLLER, 2003a; MÜLLER *et al.*, 2004).

Em função das características físico-químicas deste fármaco como baixa hidrossolubilidade, baixa molhabilidade e a existência de quatro formas polimórficas e um diidrato (KOBAYASHI *et al.*, 2000; RUSTICHELLI *et al.*, 2000), o desenvolvimento de uma forma farmacêutica para administração parenteral necessita do emprego de estratégias farmacotécnicas que permitam a concepção de uma formulação para uso intravenoso.

Levando-se em consideração as potencialidades dos sistemas nanoemulsionados na administração intravenosa de fármacos pouco solúveis, investigar a viabilidade de veiculação da carbamazepina numa nanoemulsão lipídica pode ser em um meio interessante para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica de uso intravenoso, até o presente ainda não disponível comercialmente. Poucos estudos foram realizados com este fármaco, com esse propósito, e o emprego da técnica de emulsificação espontânea na obtenção das nanoemulsões não foi descrito até o presente momento, para a carbamazepina.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar nanoemulsões contendo carbamazepina, com vistas à administração intravenosa.

Objetivos específicos

- Investigar a viabilidade de desenvolvimento de nanoemulsões contendo carbamazepina pela técnica de emulsificação espontânea;
- Selecionar óleos nos quais o fármaco apresenta a maior solubilidade visando à preparação de nanoemulsões;
- Selecionar excipientes adequados visando à via de administração parenteral;
- Desenvolver diferentes formulações com auxílio de um delineamento fatorial;
- Desenvolver e validar uma metodologia analítica para o doseamento da carbamazepina em nanoemulsões;
- Caracterizar e avaliar as formulações quanto à influência dos diferentes óleos e tensoativos sobre as propriedades físicas, químicas e físico-químicas das nanoemulsões preparadas.

CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Emulsões parenterais

Emulsões são definidas como sistemas heterogêneos onde um líquido é disperso em outro sob a forma de pequenas gotículas. Devido à existência de uma tensão na interface das duas substâncias, em função das duas faces terem forças de atração diferentes, um terceiro componente, o tensoativo, é acrescentado, atuando na redução da tensão interfacial, e promovendo uma barreira contra a coalescência (FLOYD, 1999; LACHMAN, 2001). Na terminologia das emulsões, a fase dispersa é conhecida como fase interna e o meio dispersante como fase externa ou contínua. As emulsões que têm a fase externa aquosa são conhecidas como emulsões de óleo em água (O/A). Em contrapartida, as emulsões que têm fase interna aquosa e fase externa oleosa são denominadas água em óleo (A/O) (ALLEN *et al.*, 2005).

O interesse pelo desenvolvimento de emulsões parenterais é descrito desde 1920 e tem como base a existência dos quilomicros, partículas de diâmetro entre 0,5-1,0 µm provenientes das lipoproteínas, que apresentam em sua composição triglicerídeos, colesterol e fosfolipídios sendo, portanto, gotículas de gordura circulantes no sangue (KESSLER, 2001). Entre 1940 e 1950, muitos estudos enfocando a formulação, preparação e uso de emulsões parenterais foram desenvolvidos e, somente em 1960, um produto tornou-se comercialmente disponível, o Lipomul[®] (EUA) ou Infonutrol[®] (Europa), desenvolvido com vistas à nutrição parenteral, mas que em pouco tempo foi retirado do mercado em função de severas reações adversas (WRETLIND, 1999; KESSLER, 2001).

A primeira emulsão parenteral lançada no mercado e considerada segura, denominada Intralipid[®], foi desenvolvida por Arvid Wretlind e Oscar Schuberth, em 1961, com objetivo de prover ácidos graxos essenciais e ser fonte de calorias a pacientes que não poderiam fazer uso de nutrição enteral. O sucesso deste estudo veio em função de que os pesquisadores focaram o desenvolvimento da emulsão parenteral na utilização de matérias primas altamente purificadas, especialmente fosfolipídeos, e na produção de emulsões com tamanho de gotícula semelhante ao tamanho dos

quilomicrons, isto é, menor que 1µm, o que as torna nanoemulsões (KESSLER, 2001; HARDY, 2003).

A formulação e o processo de preparação desenvolvidos para a emulsão Intralipid[®] deram início à investigação de emulsões O/A como veículos de administração de fármacos pouco solúveis em água, porém somente com o surgimento de novos excipientes pôde-se estabilizar a associação do fármaco às emulsões (KESSLER, 2001).

Na década de 1970, foi lançado no mercado o primeiro medicamento, disponibilizado até os dias de hoje, veiculado numa nanoemulsão parenteral, o Diazemuls[®] (diazepam). Hoje, passadas três décadas, existem poucos medicamentos disponíveis para administração intravenosa, sob essa forma farmacêutica, apesar de uma série de vantagens que esses sistemas apresentam, tais como a redução da toxicidade, em comparação com sistemas que utilizam solventes ou co-solventes, e por conseqüência aumento da estabilização de fármacos que possam sofrer hidrólise ou oxidação. Outras possíveis vantagens, que ainda precisam ser mais exploradas seriam a sua ação como vetores e a liberação controlada de fármacos (BENITA e LEVY, 1993; FLOYD, 1999; WRETLIND, 1999 KESSLER, 2001). A tabela apresentada a seguir apresenta exemplos de medicamentos encontrados sob esta forma farmacêutica.

Tabela 1. Exemplos de medicamentos encontrados no mercado farmacêutico na forma de nanoemulsões para administração parenteral.

Nome comercial	Fármaco	Indicação	Mercado	Referências
Diazemuls [®]	Diazepam	Sedativo	Europa, Canadá, Nova Zelândia	SWEETMAN, 2006;
Diprivan [®] Propovan [®]	Propofol	Anestésico	Mundial (Brasil)	SWEETMAN, 2006;
Etomidate-Lipuro [®]	Etomidato	Hipnótico	Europa, Japão	AKKAR e MULLER, 2003a
Lipotalon [®]	Palmitato de dexametasona	Antiinflamatório	Alemanha	WABEL, 1998
Liple [®]	Alprostadil (Prostaglandina E ₁)	Inibidor de agregação plaquetária, Vasodilatador	Japão	SWEETMAN, 2006;
Ropion [®]	Flurbiprofeno acetil	Antiinflamatório não esteróide	Japão	SWEETMAN, 2006;
Vitalipid [®]	Vitaminas A, D, E e K	Nutrição parenteral	Europa, Ásia, Austrália e África do Sul	SWEETMAN, 2006;

1.1 Composição e seleção de excipientes para nanoemulsões parenterais

A composição das nanoemulsões geralmente envolve a combinação de três a cinco componentes para formar as fases aquosa, oleosa e interfacial. A adição de um co-tenssoativo, auxilia na diminuição da tensão interfacial para valores abaixo dos limites proporcionados pelo agente emulsivo primário. É importante ressaltar que a orientação para sistemas O/A ou A/O é principalmente dependente das propriedades físico-químicas do tensoativo (CUNHA JUNIOR *et al.*, 2003, OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Quando se visa à administração de fármacos pouco solúveis em água, uma vantagem relevante das nanoemulsões sobre soluções parenterais é o custo reduzido, uma vez que os solventes utilizados para a obtenção de soluções de fármacos lipofílicos são mais caros e potencialmente tóxicos. Assim, a diluição do fármaco em um solvente seguro e barato, a água, é altamente desejável desde que a eficácia do produto não seja afetada (LACHMAN *et al.*, 2001).

Com a finalidade de atingir os requisitos necessários para a administração intravenosa, os excipientes utilizados na preparação das nanoemulsões parenterais devem ser não irritantes e atóxicos, devendo-se ter atenção especial aos dois componentes majoritários da formulação, o óleo e o tensoativo (BENITA e LEVY, 1993; FLOYD, 1999).

1.1.1 Óleos

A seleção adequada do óleo utilizado como fase interna é o primeiro passo no desenvolvimento de uma nanoemulsão e a solubilidade do fármaco a ser incorporado é o parâmetro que rege essa escolha.

Os óleos utilizados para a preparação de nanoemulsões parenterais devem possuir elevado grau de pureza, para evitar possíveis reações, como irritações, que poderiam ocorrer com o uso daqueles de pureza inferior (BENITA e LEVY, 1993; FLOYD, 1999; KESSLER, 2001).

Dentre os óleos utilizados na preparação de nanoemulsões parenterais podemos citar: óleo de soja (LEVY e BENITA, 1989; YU *et al.*, 1993; MIZUSHIMA, 1996; JUMMA e MÜLLER, 1998; KIBBE, 2000; SZNITOWSKA *et al.*, 2001; SEKI *et al.*, 2004; 2006; WANG *et al.*, 2006), óleo de rícino (JUMMA e MÜLLER, 1998; JUMMA *et al.*, 1998; FLOYD, 1999; CUNHA JUNIOR *et al.*, 2003; TAMILVANAN, 2004), triglicerídeos de cadeia média (BENITA E LEVY, 1993; YU *et al.*, 1993; FLOYD, 1999; KLANG *et al.*, 1994; JUMMA e MÜLLER, 1998; KIBBE, 2000; BOUCHEMAL *et al.*, 2004; SADURNÍ *et al.*, 2005), óleo de côco (WANG *et al.*, 2006; HUNG *et al.*, 2006) óleo de gergelim (JUMMA e MÜLLER, 1998; WANG *et al.*, 2006), óleo de amêndoas, (JUMMA e MÜLLER, 1998), esqualeno (WANG *et al.*, 2006), óleo de foca (CUI *et al.*, 2006), e oleato de etila, (YU *et al.*, 1993; PARK *et al.*, 1999; KIBBE, 2000, WU *et al.*, 2006).

Apesar de diversos tipos de óleos serem utilizados em estudos de desenvolvimento de nanoemulsões parenterais, o óleo presente na maioria dos produtos comerciais é o óleo de soja ou a mistura deste com triglicerídeos de cadeia média (TCM ou MCT - do inglês: *medium chain triglycerides*), a exemplo do Lipotalon[®] e Etomidate-Lipuro[®], respectivamente. (WABEL, 1998, HELLMICH *et al.*, 2004).

1.1.2 Tensoativos

Apenas um limitado número de tensoativos é considerado seguro para administração parenteral, sendo os mais empregados o poloxâmero 188, polissorbato 80 e as lecitinas (BENITA e LEVY, 1993; WABEL, 1998; MÜLLER e KERCK, 2004).

Os tensoativos de natureza anfótera, como as lecitinas, apresentam baixa toxicidade e são substâncias freqüentemente utilizadas na produção de nanoemulsões injetáveis (YU *et al.*, 1993; FLOYD, 1999; MEDINA *et al.*, 2001; SZNITOWSKA *et al.*, 2001). Esses tensoativos precisam apresentar elevada pureza, pois suas propriedades físicas e emulsionantes dependem da composição e concentração dos fosfolípidos e ácidos graxos presentes. Devido a elevada lipofilicidade, as lecitinas não têm capacidade de formar nanoemulsões com baixa tensão interfacial, assim, o emprego de co-tensoativos

é aconselhado para promover a estabilização da nanoemulsão (PARK *et al.*, 1999). As lecitinas de soja e de gema de ovo (figura 1) estão disponíveis comercialmente para a produção de formas farmacêuticas de uso parenteral (LAWRENCE e REES, 2000).

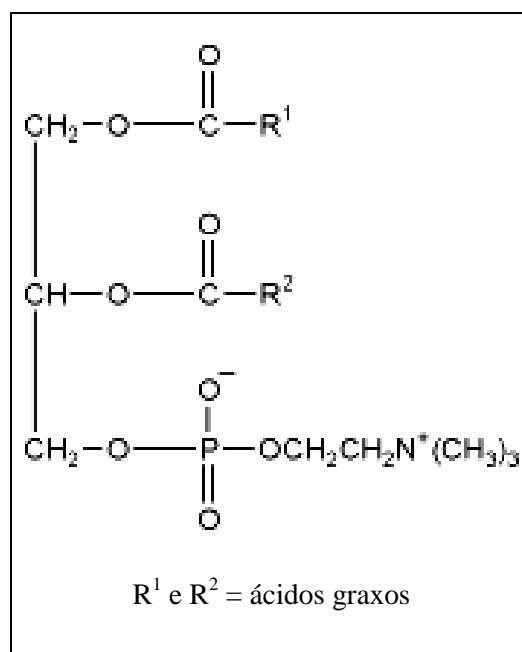


Figura 1: Estrutura química da Lecitina (KIBBE, 2006)

Os tensoativos de natureza não iônica, como os copolímeros de polioxietileno e propileno (poloxâmeros), polissorbatos e polietilenoglicóis (PEG) são também utilizados na preparação de nanoemulsões parenterais (STRICKLEY, 2004; HAN *et al.*, 2004). Entre os principais representantes deste grupo, destacam-se o poloxâmero 188 e o polissorbato 80 (figura 2). A utilização desses dois emulsificantes como co-tensoativos é amplamente difundida em função da baixa viscosidade apresentada por estes componentes, o que não alteraria a viscosidade do produto final, e pela formação de uma barreira estérica na interface, impedindo a agregação das gotículas de óleo (BENITA e LEVY, 1993; CUNHA JUNIOR *et al.*, 2003; TAMILVANAN e BENITA, 2004). Abrol e colaboradores (2005) descreveram que o uso do polissorbato 80 associado com lecitina de soja promove uma maior estabilização e redução do tamanho de gotícula da fase interna de uma nanoemulsão contendo o flavonóide silimarina. Um outro representante dos tensoativos não iônicos comumente utilizado na preparação de emulsões e solubilização de substâncias lipofílicas é o óleo de rícino polietoxilado, que apesar de ser responsável por reações de hipersensibilidade ainda é

muito utilizado em formulações parenterais, principalmente para solubilização de fármacos antineoplásicos utilizados em quimioterapia (CONSTANTINIDES *et al.*, 2000; TIJE *et al.*, 2003; CONSTANTINIDES, *et al.*, 2004; BAKER e NAGUIB, 2005).

Emulsionantes iônicos são geralmente tóxicos na administração parenteral, e como uma concentração relativamente elevada destes componentes é necessária para a estabilização da grande área de interface formada entre as fases oleosa e aquosa, a utilização destes não é recomendada (CUNHA JUNIOR *et al.*, 2003).

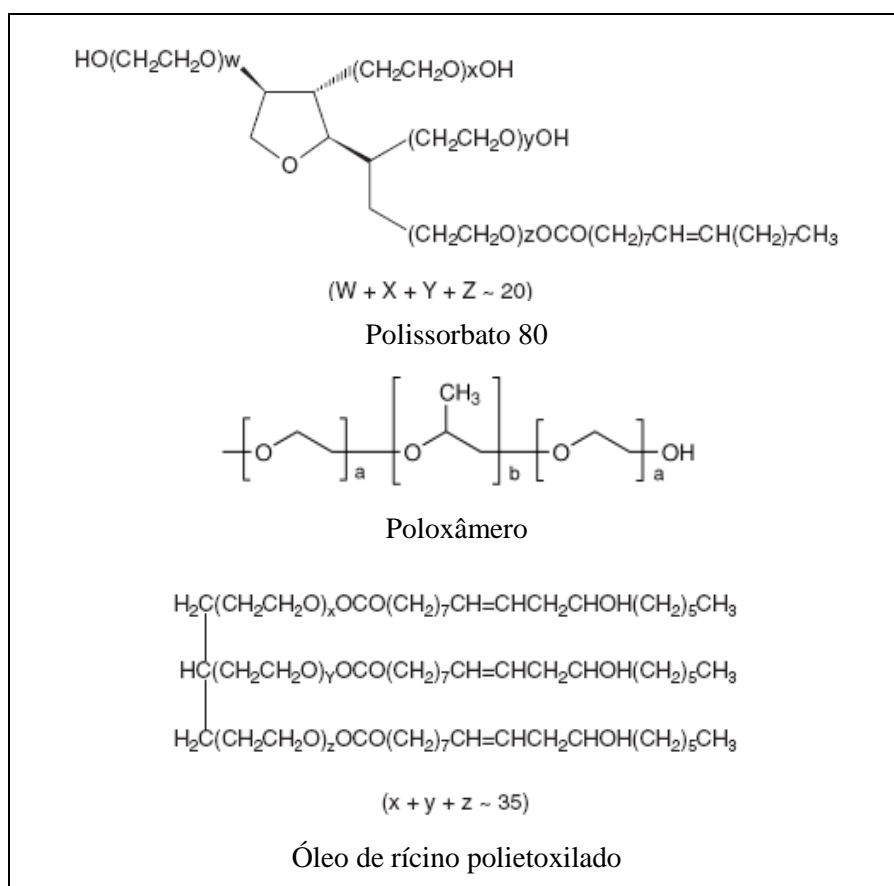


Figura 2: Estrutura química do polissorbato 80, poloxâmero 188 e óleo de rícino polietoxilado (TIJIE *et al.*, 2003; KIBBE, 2006).

1.1.3 Demais adjuvantes

O pH das formulações é geralmente ajustado com soluções aquosas de HCl ou NaOH (FRONZA, *et al.*, 2004). Em relação a este parâmetro, o pH ideal de uma nanoemulsão parenteral deve estar entre 6 e 7, o que mantém a integridade física do

sistema, diminuindo a hidrólise dos ésteres de ácidos graxos dos óleos e fosfolipídios, quando estes são utilizados (BENITA e LEVY, 1993), e torna o sistema compatível fisiologicamente. Esta faixa de pH também permite a ionização os grupamentos fosfato na superfície do filme de lecitina, estabilizando melhor a interface. Valores de pH abaixo de 5 devem ser evitados, pois resultam no decréscimo da repulsão eletrostática das gotículas da fase interna, promovendo o aumento do tamanho de gotícula e a coalescência (BENITA e LEVY, 1993; FLOYD, 1999).

Com o processo de emulsificação, o óleo não exerce nenhum efeito osmótico, desta forma, o ajuste da isotonicidade ($280\text{-}300\text{mOsm kg}^{-1}$) deve ser realizado no produto final (FLOYD, 1999). Agentes como sorbitol, xilitol e, mais comumente, glicerina, na concentração entre 2,25-2,5% (p/v) são utilizados com essa finalidade (LEVY e BENITA, 1989; YU *et al.*, 1993; MIZUSHIMA, 1996; JUMAA e MÜLLER, 1999; HARDY, 2003).

As características da água utilizada em formulações para administração parenteral de fármacos deve apresentar as especificações de “água para injetáveis”, preconizados pelas farmacopéias (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; USP, 2005)

1.2 Técnicas de preparo

1.2.1 Métodos Físicos

A preparação da nanoemulsão é basicamente iniciada através da emulsificação clássica, isto é, preparam-se duas fases, uma lipofílica e outra hidrofílica, que são aquecidas separadamente ($70\text{ }^{\circ}\text{C}$) e vertidas, uma sobre a outra, sob agitação, seguida da redução do diâmetro médio das gotículas realizado através de métodos físicos (KESSLER, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2002; FRONZA *et al.*, 2004). A preparação de formulações por esta técnica foi descrita para diversos fármacos por Sznitowska e colaboradores (2001), assim como para o diazepam (LEVY e BENITA, 1989), tetrazepam (JUMMA e MÜLLER, 2001), clometiazol (Nordén *et al.*, 2001) e, mais recentemente, para a nalbufina (WANG *et al.*, 2006).

1.2.2 Incorporação extemporânea

O segundo método descrito é a incorporação de fármaco a uma emulsão pré-formada (KESSLER, 2001). A utilização desta técnica foi descrita por Strickley e Anderson (1993) para a incorporação de um fármaco experimental derivado do tiocarbamato (NSC 629243) nas emulsões Liposyn II[®] e Intralipid[®] e por Cohen e colaboradores (1996), que avaliaram a incorporação da anfotericina B em uma emulsão Intralipid[®]. Yalin e colaboradores (1997) também avaliaram a incorporação do lorazepam em uma nanoemulsão previamente desenvolvida. Esse procedimento de preparo geralmente necessita a utilização de um solvente orgânico para assegurar a completa solubilização do fármaco, o que representa uma limitação desta técnica, uma vez que é comum a ocorrência de fenômenos de instabilidade como a precipitação do fármaco na fase externa, floculação e coalescência. Além disso, a adição de um solvente pode comprometer a integridade do sistema (FLOYD, 1999).

Recentemente foi desenvolvida uma tecnologia patenteada, denominada SolEmuls[®], onde não é necessária uma previa solubilização do fármaco. Esta metodologia prevê a mistura do fármaco, na forma de pó finamente disperso, na nanoemulsão comercial. A utilização desta técnica foi descrita para incorporação de itraconazol (AKKAR E MÜLLER, 2003b), anfotericina B (MÜLLER *et al.*, 2004), carbamazepina (AKKAR e MÜLLER, 2003a; MÜLLER *et al.*, 2004) e silimarina (ABROL *et al.*, 2005).

1.2.3 Emulsificação espontânea

A emulsificação espontânea é uma alternativa interessante para estudos de desenvolvimento, uma vez que permite a preparação de pequenos volumes de formulação. Outra vantagem desta técnica é que a preparação das nanoemulsões é realizada sem necessidade de aquecimento das fases, o que é interessante para fármacos termolábeis. Por esse método, o fármaco lipofílico é dissolvido em um solvente orgânico juntamente com o óleo que constitui a fase interna da nanoemulsão e com um tensoativo lipofílico. A fase aquosa é composta, além de água, de um tensoativo hidrofílico. Após a preparação das duas fases, verte-se a fase orgânica sobre

a aquosa sob agitação moderada, e o solvente orgânico é retirado por evaporação à pressão reduzida (YU *et al.*, 1993; POUTON, 1997; TEIXEIRA *et al.*, 2002; BOUCHEMAL *et al.*, 2004). Estudos utilizando esta técnica de preparo foram descritos para os fármacos diazepam e anfotericina B (YU *et al.*, 1993), flubiprofeno (PARK *et al.*, 1999), penicilina G (SANTOS-MAGALHAES *et al.*, 2000), ácido all-trans-retinóico (HWANG *et al.*, 2004).

1.3 Caracterização das nanoemulsões

1.3.1 Tamanho de gotícula da fase interna

O tamanho de gotícula da fase oleosa é uma das características mais importantes na caracterização de uma nanoemulsão parenteral, uma vez que é necessário que a formulação seja compatível com o diâmetro dos vasos sanguíneos (FLOYD, 1999). Gotículas com tamanho superior a 1 µm são clinicamente inaceitáveis, pois certamente seriam responsáveis por embolia (BENITA e LEVY, 1993). O tamanho de gotícula também constitui um dos parâmetros importantes na avaliação da estabilidade física da formulação, uma vez que os fenômenos como floculação e coalescência podem ser monitorados pela evolução do diâmetro médio bem como pela distribuição deste (LEVY e BENITA, 1989; BENITA e LEVY, 1993; FLOYD, 1999).

Dentre os fatores que influenciam o diâmetro das gotículas de óleo estão as técnicas de preparação e a composição da formulação. A incorporação de fármacos pode influenciar o diâmetro e a distribuição das gotículas. Na aplicação da técnica de emulsificação espontânea, os fatores responsáveis pela alteração nos diâmetros de gotícula podem ser a velocidade de migração do solvente orgânico na fase aquosa, a concentração da fase oleosa e o volume de cada uma das fases (TEIXEIRA *et al.*, 2002). A adição extemporânea do fármaco numa nanoemulsão pré-formada pode ter como consequência um aumento no diâmetro das gotículas (COHEN *et al.*, 1996).

1.3.2 Potencial zeta

Os tensoativos estabilizam a interface da emulsão não apenas com a formação de uma barreira mecânica, mas também através da produção de uma carga elétrica de

superfície, denominada potencial zeta, que tem a habilidade de produzir forças repulsivas entre as gotículas de óleo evitando a coalescência. (BENITA e LEVY, 1993; FLOYD, 1999).

O potencial zeta reflete a composição da interface da emulsão, seja em relação aos tensoativos formadores do filme interfacial ou em relação a presença de fármacos associados a interface (FRONZA *et al.*, 2004). A utilização de tensoativos aniônicos determina que quanto mais negativo o potencial zeta se apresenta, maior a rede de cargas das gotículas e por conseqüência, mais estável é a formulação. Valores inferiores a - 30 mV sugerem alto grau de estabilidade física. As lecitinas, exemplos tensoativos amplamente empregados em nanoemulsões, têm como componentes majoritários os fosfolipídios que levam à formação de formulações com potencial zeta elevado valor absoluto, entre -40 e -50 mV.

1.3.3 Viscosidade

Apesar de pouco descrita na literatura, a avaliação da viscosidade da formulação é de grande importância, uma vez que, formulações viscosas costumam ser dolorosas ao paciente (JUMAA e MÜLLER, 1998). Além disso, a viscosidade também é um parâmetro que deveria ser avaliado no monitoramento da estabilidade física da emulsão, uma vez que elevados valores de viscosidade podem ser indicativos de coalescência (PRINDERRE *et al.*, 1998).

A viscosidade é altamente influenciada pela composição das nanoemulsões. É descrito que o óleo da fase interna e também sua concentração na formulação levam ao aumento dessa característica na formulação (LEVY e BENITA, 1989; JUMAA e MÜLLER, 1998). Outro fator que altera esse parâmetro é a natureza do tensoativo, assim como sua concentração. Tanto o óleo como o tensoativo estão fortemente ligados ao tamanho de gotícula que, geralmente, é diretamente proporcional aos valores de viscosidade, isto é, quanto maior o tamanho de gotícula, maior a viscosidade (JUMAA e MÜLLER, 1998)

2 Carbamazepina

2.1 Uso Terapêutico

Após sua introdução lenta na terapêutica, a carbamazepina foi aceita como fármaco de primeira escolha na profilaxia das crises epilépticas e no tratamento de neuralgia trigêmea e glossofaríngea. Também é eficaz em distúrbios maníacos depressivos como alternativa para os casos que não respondem ao lítio. Utilizada também no tratamento de distonias e diabetes insípido, é indicada para o uso isoladamente ou em associação com outros fármacos anticonvulsivantes (BRODIE e JOHNSON, 1997; KORLOKOVAS, 2004; SWEETMAN, 2006; MCEVOY *et al.*, 2006). A carbamazepina apresenta a estrutura tricíclica dos iminoestilbenos (figura 3) e certa semelhança estrutural com o fenobarbital, a fenitoina e o clonazepam (BRODIE E JOHNSON, 1997; MCNAMARA, 2001; USP, 2005).

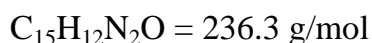
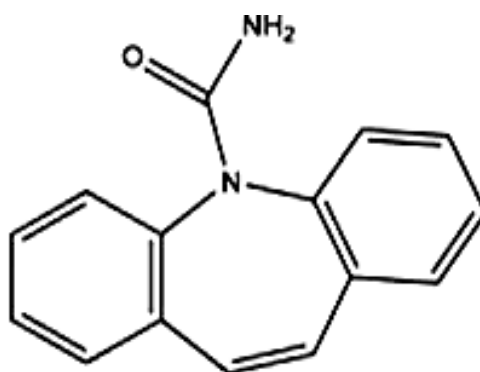


Figura 3: Estruturas química e molecular da carbamazepina (5Hdibenz[b,f]azepino-5-carboxamida).

Independentemente da patologia, o tratamento com a carbamazepina deve ser iniciado com uma posologia diária baixa, sendo esta aumentada lentamente até que se obtenha o efeito farmacológico desejado. A determinação dos níveis plasmáticos pode ajudar no estabelecimento da posologia adequada. Inicialmente, a dose pode variar entre 100 a 200 mg ao dia, aumentando-se lentamente a dose, e em alguns pacientes,

uma dose de 1600 ou mesmo 2000 mg/dia pode ser apropriada (BRODIE e JOHNSON, 1997; WHO, 2002).

Devido à ausência de uma forma farmacêutica de uso parenteral, há poucas informações sobre a posologia indicada por esta via. Mas de acordo com Akkar e Muller (2003a), e considerando-se a biodisponibilidade e o perfil plasmático da dose oral de 200 mg, estima-se que a dose adequada para uma injeção intravenosa de carbamazepina deva ser 20 a 50 mg.

2.2 Farmacocinética

Como o índice terapêutico da carbamazepina é relativamente estreito, a sua biodisponibilidade e eliminação são fatores que devem ser considerados. Após administração por via oral, a carbamazepina é absorvida no intestino com uma biodisponibilidade estimada de 80-90 %. Entretanto, esta é lenta e irregular, e o pico plasmático médio da substância inalterada ocorre em até 10 horas após uma dose oral única inicial (BRODIE e JOHNSON, 1997; SWEETMAN, 2005; KORLOKOVAS, 2004).

O volume aparente de distribuição do fármaco varia de 0,8 a 2,0 l/kg. A carbamazepina encontra-se 70 % a 80 % ligada às proteínas plasmáticas (KORLOKOVAS, 2004 ; BRODIE e JOHNSON, 1997; MCNAMARA, 2001; SWEETMAN, 2006).

A carbamazepina é amplamente metabolizada no fígado, onde a biotransformação via epóxido é a mais importante. O metabólito carbamazepina-10-11-epóxido tem um terço da atividade anticonvulsivante do fármaco matriz, apresentando atividade antidepressiva e antineurálgica (MCNAMARA, 2001; KORLOKOVAS, 2004; SWEETMAN, 2006).

A meia-vida do fármaco após uma dose única pode ser de até de 48 horas, mas após administração repetida por várias semanas, a meia vida cai substancialmente. Isso ocorre porque a carbamazepina induz sua própria biotransformação (BRODIE e JOHNSON, 1997; KORLOKOVAS, 2004).

Após a administração de uma dose oral única de 400 mg de carbamazepina, cerca de 72 % são excretados na urina e 28 % nas fezes. Na urina, cerca de 2 % da dose são recuperados como substância inalterada e cerca de 1 % como metabólito 10,11-epóxido, farmacologicamente ativo (BRODIE e JOHNSON, 1997; SWEETMAN, 2006).

2.3 Características Físico-Químicas

Quanto às suas propriedades físicas, o fármaco é caracterizado por ser um pó cristalino branco amarelado, com ponto de fusão entre 189 °C a 193 °C. É praticamente insolúvel em água e éter, levemente solúvel em etanol e acetona, solúvel em clorofórmio e propilenoglicol (LUND, 1994; CLARKE'S, 2006).

A carbamazepina possui pelo menos quatro formas polimórficas (I, II, III, IV) e um diidrato. A forma III é também conhecida como monoclinica (β), enquanto a I é conhecida como trigonal (α) e a II é denominada tricíclica (γ) (KANENIWA *et al.*, 1984; KRAHN e MIELCK, 1987 *apud* KOBAYASHI *et al.*, 2000)¹.

Foi demonstrado que as formas α e β , quando submetidas à umidade transformam-se no diidrato (KANENIWA *et al.*, 1984; KRAHN e MIELCK, 1987 *apud* KOBAYASHI *et al.*, 2000)¹. Estudos de dissolução revelaram que a dissolução inicial das duas formas anidras (α e β) foi maior que a do diidrato, e ambos transformam-se rapidamente na forma diidratada (KANENIWA *et al.*, 1987 *apud* NOKHODCHI *et al.*, 2005)². O estresse físico aplicado durante o processo de fabricação, como a micronização, também afetam a transição de uma forma cristalina em outra (VILLAFUERTE-ROBLES, 1982 *apud* NOKHODCHI *et al.*, 2005)³.

O estudo do polimorfismo desse fármaco é de extrema importância, uma vez que a forma encontrada como referência na USP (United States Pharmacopoeia), é o polimorfo β (GOSSELIN, 2003). Assim, diversos trabalhos já foram realizados com o

¹ Kaneniwa, N., Yamaguchi, T., Watari, N., Otsuka, M. Hygroscopicity of carbamazepine crystalline powders. *Yakugaku Zasshi* 104, 184–190, 1984.

Krahn, F.U., Mielck, J.B. Relations between several polymorphic forms and the dihydrate of carbamazepine. *Pharm. Acta Helv.* 62, 247–254, 1987.

² N. Kaneniwa, J. Ichikawa, T. Yamaguchi, K. Hayashi, N. Watari, M. Sumi, *Yakugaku Zasshi* 107 (1987) 808.

³ L. Villafuerte-Robles, Zur polymorphic and mechanischen Earbeitung des carbamazepin, Ph.D. Thesis, Hamburg University, Hamburg, 1982

objetivo de caracterizar essas formas polimórficas utilizando-se as mais diversas técnicas analíticas, tais como: microscopia eletrônica, difração de raios X, espectrofotometria na região do infravermelho, calorimetria exploratória diferencial, termogravimetria e ressonância magnética nuclear (SURYANARAYANAN e WIEDMANN, 1990; HAN e SURYANARAYANAN, 1997; PHADNIS *et al.*, 1997; KOBAYASHI, 2000; RUSTICHELLI *et al.*, 2000; MURPHY *et al.*, 2002; SETHIA e SQUILLANTE, 2002; GOSSELIN, 2003; MCGREGOR *et al.*, 2004; NOKHODCHI *et al.*, 2005).

2.4 Desenvolvimento de formas farmacêuticas injetáveis contendo carbamazepina

A maioria dos estudos de desenvolvimento de formas farmacêuticas contendo carbamazepina são focados na administração por via oral. Os trabalhos existentes relacionados com o desenvolvimento de formas para administração intravenosa da carbamazepina utilizam como veículo soluções contendo o fármaco complexado com hidroxipropil- β -ciclodextrina, que é um oligossacarídeo cíclico derivado do amido, utilizado para aumentar a solubilidade de fármacos em meios aquosos (STEULET *et al.*, 1990; LÖSCHER *et al.*, 1995; LÖSCHER e HOENACK, 1997; BREWSTER *et al.*, 1997). Outros autores utilizam co-solventes para solubilizar o fármaco, a citar os trabalhos realizados por Levy e colaboradores que, em 1975, utilizaram uma mistura de etanol, propilenoglicol e água para administração parenteral de carbamazepina em macacos e por Tauboll e colaboradores (1990), que realizaram um estudo utilizando o glicofurol como solvente e avaliaram a atividade antiepilética da carbamazepina em gatos.

A incorporação de carbamazepina em nanoemulsões foi estudada por Sznitowska e colaboradores (2001), que realizaram um estudo de estabilidade onde foi avaliado o efeito da presença deste e de outros fármacos, em nanoemulsões preparadas pela técnica de microfluidização. Os resultados demonstraram que a formulação contendo carbamazepina foi estável mesmo após autoclavagem porém foi observada a precipitação de cristais do fármaco.

A preparação de nanoemulsões parenterais contendo um complexo de carbamazepina com hidroxipropil- β -ciclodextrinas foi realizada por Becirevic-Lacan e colaboradores (2001), com a incorporação do fármaco, as formulações desenvolvidas, permaneceram fisicamente estáveis por no máximo um mês.

Mais recentemente, uma nanoemulsão parenteral contendo carbamazepina foi desenvolvida por Akkar e Müller (2003a) através da tecnologia SolEmuls[®], descrita anteriormente. Por meio desta técnica, os autores obtiveram emulsões nas quais a carbamazepina está presente em concentrações de 0,5, 1,0, 5,0 e 10,0 mg/ml. Entretanto, precipitados cristalinos de fármaco não dissolvido foram observados nas duas formulações contendo a maior concentração de fármaco. Foi observado que com o aumento da concentração de carbamazepina houve uma diminuição do tamanho de gotícula. Para a otimização das formulações, foi proposto que uma formulação contendo 3 mg/ml seria alternativa adequada, uma vez que, na concentração de 1 mg/ml a emulsão apresentou-se estável e, em 5 mg/ml, foi observada a presença de cristais do fármaco, porém essa concentração intermediária não foi testada pelos pesquisadores.

3 Planejamento Fatorial no desenvolvimento de formas farmacêuticas

O desenvolvimento de uma forma farmacêutica permite a utilização de ferramentas que otimizam este estudo, e dentre elas está o planejamento fatorial. Planejamentos como este são de grande utilidade em investigações preliminares, quando se deseja saber se determinados fatores têm ou não influência sobre a resposta. São planejamentos simples de serem executados e podem ser ampliados para formar um planejamento mais complexo, que é necessário quando se quer conhecer melhor a relação entre a resposta e os fatores (BUTTON, 2001).

Um experimento fatorial com k fatores, cada um deles com 2 níveis, é denominado experimento fatorial 2^k . O processo experimental dessa técnica consiste em realizar testes onde para cada réplica completa do experimento, todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores são pesquisadas. A principal vantagem desse planejamento é utilizar um número reduzido de experimentos para a obtenção das

estimativas dos efeitos dos fatores com elevada precisão (WERKEMA, 1996; BARROS NETO *et al.*, 1996).

No desenvolvimento de nanoemulsões parenterais, alguns trabalhos citam a utilização de delineamentos experimentais. Prinderre e colaboradores (1998) propuseram a aplicação de dois delineamentos fatoriais seqüenciais para a otimização do processo de preparação e avaliação da estabilidade de emulsões O/A. A utilização de planejamento fatorial também foi utilizada por Yalin e colaboradores (1997) para avaliação da concentração de lorazepam em nanoemulsões em função do pH da formulação e o tempo de armazenamento. A otimização das características de uma nanoemulsão contendo lorazepam também foi descrita por Medina e colaboradores (2001) aplicando um delineamento fatorial 2^5 , onde as variáveis eram tipo e concentração de tensoativo, porcentagem de fase oleosa e a influência da filtração e esterilização sobre a formulação final.

***CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES PARENTERAIS
CONTENDO CARBAMAZEPINA: ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO
POLIMORFISMO DO FÁRMACO NA VIABILIDADE DAS FORMULAÇÕES***

Introdução

O desenvolvimento de uma nanoemulsão requer a avaliação de uma série de parâmetros que permitam a concepção de uma formulação estável. O ponto de partida para esse procedimento é a escolha adequada do óleo que vai compor a fase interna da nanoemulsão. Esta escolha deve ser realizada a partir de estudos de solubilidade do fármaco (FLOYD, 1999; FRONZA *et al.*, 2004; BOUCHEMAL *et al.*, 2004). A composição qualitativa e quantitativa dos demais excipientes também deve ser criteriosa e compatível com a via de administração (JUMMA e MÜLLER, 1998; BOUCHEMAL *et al.*, 2004; HUNG *et al.*, 2006)

A carbamazepina é um fármaco que apresenta polimorfismo, propriedade de certas substâncias apresentarem mais de uma forma de cristalização. Para este fármaco, já foram descritas pelo menos quatro formas polimórficas: I (ou α), II (ou γ), III (ou β) e IV, além de um diidrato (KANENIWA *et al.*, 1984; KRAHN e MIELCK, 1987 *apud* KOBAYASHI *et al.*, 2000). A transição polimórfica pode ser um outro fator que pode alterar as características de uma formulação nanoemulsionada.

A incorporação de carbamazepina em uma nanoemulsão lipídica foi estudada por Akkar e Müller (2003a). Os autores investigaram a veiculação de 0,5, 1,0, 5,0 e 10,0 mg/mL de carbamazepina, sendo que a formulação contendo 1 mg/mL apresentou-se a mais promissora em função do não aparecimento de cristais de fármacos precipitados durante o período de armazenagem. A formulação com 5 mg/ml apresentou precipitação cristalina de CBZ porém, em quantidades muito menores do que a formulação de 10 mg/mL. Desta forma, os autores sugerem que a incorporação de 3mg/mL de CBZ apresenta-se como uma possível estratégia para o desenvolvimento de uma formulação parenteral de pequeno volume.

Diante do exposto, este capítulo apresenta um estudo da viabilidade de preparação de uma emulsão parenteral contendo 3 mg/ml de carbamazepina, conforme proposto por Akkar e Muller (2003a).

PUBLICAÇÃO: Preliminary study on the development of nanoemulsions for carbamazepine intravenous delivery: investigation of drug polymorphic transition

Submetido à Drug Development and Industrial Pharmacy

Preliminary study on the development of nanoemulsions for carbamazepine intravenous delivery: investigation of drug polymorphic transition

Regina G. Kelmann⁴, Gislaine Kuminek¹, Helder F. Teixeira², Letícia S. Koester^{1*}

⁴ Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Controle de Qualidade, Florianópolis, SC, Brazil.

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Farmácia, Laboratório de Farmacotécnica, Porto Alegre, RS, Brazil.

*Author to whom correspondence should be addressed; e-mail: leticiakoester@gmx.net. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Campus Universitário – Trindade, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Bloco K, 3o andar, Laboratório de Controle de Qualidade, sala 207, 88.040-900, Florianópolis, SC, Brazil.

ABSTRACT Carbamazepine (CBZ) is available in pharmaceutical market as tablets, capsules and oral suspensions not having a parenteral formulation for clinical use. Parenteral emulsions are a good alternative to poorly water soluble drugs, such as CBZ. In this way, four different emulsions containing 3 mg/mL of CBZ were developed, but during a period of storage drug crystals precipitates appeared. To investigate this phenomenon, differential scanning calorimetry, infrared spectroscopy and light microscopy were employed. The results suggested a polymorphic transition from β form to dehydrate form, resulting in drug precipitation although the emulsions themselves remained stable during at least three months.

KEYWORDS Intravenous nanoemulsions, carbamazepine, polymorphism

Shortened version for title: CBZ polymorphic transition in nanoemulsions

INTRODUCTION

Carbamazepine (CBZ) is used for the management of epilepsy and several psychiatric diseases (Genaro, 2000; Goodman et al., 2001; Sweetman, 2006). The drug is available for patients as tablets, capsules and oral suspensions (Orange Book, 2006). However, up to now, there is no parenteral formulation commercially available, which would be desirable in cases when a parenteral administration is necessary such as coma, swallowing problems or emergencies.

Several investigations have been undertaken over the last 30 years with the aim to develop intravenous pharmaceutical dosage forms for CBZ delivery. The use of organic co-solvents, complexation with cyclodextrins and the incorporation of CBZ in emulsions were investigated (Akkar & Müller, 2003; Becirevic-Lacan et al., 2002; Brewster et al., 1997; Levy et al., 1975; Loscher et al., 1995; Sznitowska et al., 2001; Tauboll et al., 1990).

Intravenous emulsions are a source of calories and essential fatty acids for patients, and for at least 50 years, their low toxicity and their effectiveness for drug solubilization make them a good alternative to the delivery of poorly water soluble drugs (Benita & Levy, 1993), such as CBZ. In recent years, three studies describe the incorporation of CBZ into pre-formed emulsions as a strategy for the drug parenteral administration. Sznitowska and co-workers (2001) evaluated the presence of different drugs, including CBZ, on the stability of parenteral emulsions. With CBZ emulsion, recrystallization was observed after autoclaving.

In another study, Becirevic-Lacan and co-workers (2002) prepared emulsions with either CBZ alone or CBZ complexed with hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) by using the classical method of mixing oil (isopropyl miristate), emulsifier (polysorbate 20) and water phases under speed stirring. The formulations presented a mean droplet size ranging from 598 nm to 1638 μ m, not being recommended for parenteral administration, and were physically stable for only one month.

Akkar and Müller (2003) proposed the use of a patented technology (SolEmuls[®]), which, according to the authors, promotes the localization of drugs in the interfacial area of emulsions by adding a finely dispersed drug powder (nanocrystals) into a pre-formed emulsion (Intralipid[®]) followed by high-pressure homogenization. This technology was able to incorporate 1mg/ml of CBZ into emulsions but the authors suggested that 3.0 mg/ml would result in an acceptable volume for i.v. bolus administration, considering the drug blood profile. The preformed emulsion employed is composed by medium chain triglycerides and egg lecithin, which comprise most of lipophilic components employed in the currently available parenteral nanoemulsions. Drug precipitation was observed in higher drug loadings and no other oils and emulsifiers have been tested.

In the present work, we continued investigations in order to obtain feasible 3 mg/ml CBZ nanoemulsions by testing different oil cores and emulsifiers as well as by employing a

spontaneous emulsification process. As far as we are concerned, this method has not been investigated up to now with the goal to develop CBZ submicron emulsions.

Unfortunately, after a short period of storage, drug crystals could be observed at the bottom of the storage vials. Once previous literature reports the occurrence of CBZ polymorphic transitions in aqueous environment (Kaneniwa et al., 1984; Kaneniwa et al., 1987; Kobayashi et al., 2000; Krahn & Mielck, 1987; Lowes et al., 1987; Otsuka et al., 2000; Ruschichelli et al., 2000; Tian et al., 2006a), and no investigation concerning this phenomenon in nanoemulsions has been performed until now, we aimed to study this event by optical microscopy, thermal analysis and infrared spectroscopy.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Bulk CBZ (99.1%) was purchased from Henrifarma (São Paulo, Brazil). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q[®] Plus apparatus by Millipore (Billerica, USA). The excipients tested for the preparation of emulsions were soybean lecithin (Lipoid S75[®]) and medium chain triglycerides (MCT), kindly gifted by Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany); purified castor oil, soybean oil and olive oil, purchased from Sigma Aldrich (Seelze, Germany); purified sesame seed oil, peanut oil, polyoxyl 35 castor oil (Etocas 35 HV[®]) and polysorbate 80 (Crillet 4[®]), kindly donated by Croda (Campinas, Brazil); and, glycerol purchased from Nuclear (São Paulo, Brazil). All other reagents were of analytical grade.

Determination of CBZ solubility in different oils

The selected oils were castor oil, olive oil, soybean oil, sesame seed oil, peanut oil and MCT. An excess amount (10 mg) of CBZ was added to 5 g of each oil, and kept under moderate magnetic stirring at room temperature during 24 hours. The equilibrated sample was centrifuged at 15000 rpm for 20 min to separate the undissolved drug. The choice of the best oil was made by visual observation, using a qualitative criteria based on United States Pharmacopoeia (USP) “Description and Relative Solubility” chapter (USP, 2005).

Preparation of CBZ nanoemulsions

Preliminary tests were performed in order to obtain feasible formulations. Some parameters as organic solvents proportions as well as the need of a hydrophilic emulsifiers used as co-surfactant to stabilize the emulsions were verified. Four different formulations were prepared using different combinations of oil (castor oil or MCT) and lipophilic emulsifier (soybean lecithin or polyoxyl 35 castor oil). The formulations were named as follows: the emulsion composed by castor oil and soybean lecithin (C-L); composed by castor oil and polyoxyl 35 castor oil (C-C35); composed by MCT and soybean lecithin (MTC-L); and composed by MCT and polyoxyl 35 castor oil (MTC-C35). Polysorbate 80 was used in all formulations as hydrophilic surfactant. The final composition of emulsions (% w/v) was made up of oil 10, lipophilic surfactant 4, hydrophilic surfactant 4, glycerol 2.25, and distilled water up to 100.

The emulsions were prepared according to the method described by Yu and co-workers (1993). Briefly, CBZ was dispersed in the oil, mixed with the lipophilic emulsifier and dissolved in a acetone:ethanol (50:50 v/v) solution (oily phase). The hydrophilic emulsifier was dissolved in water (aqueous phase). The oily phase was then slowly added into the aqueous phase under moderate magnetic stirring. The aqueous phase immediately turned milky with opalescence as a result of the nanoemulsion produced. The solvents were removed under reduced pressure. The amount of CBZ added on the preparations corresponded to 3.0 mg/ml of drug content on the final formulation. The emulsions were stored at 4 °C.

Characterization of nanoemulsions

The formulations were characterized with respect to physical appearance and mean particle size, which was assessed in a Malvern Nanosizer/Zetasizer® nano-ZS ZEN 3600 (Malvern Instruments, USA). All analyses were made in triplicate after adequate dilution in ultra-filtered purified water (0.22 µm).

Characterization of CBZ polymorphic transition

Drug crystals precipitates observed in the emulsions were collected after three months and dried in a vacuum desiccator for further analysis by differential scanning calorimetry (DSC), infrared spectroscopy (IR) and optical microscopy. In DSC analysis, a Shimadzu DSC-60 cell was used, and approximately 2 mg of samples were weight out and placed in sealed aluminum pans. An empty aluminum pan was used as reference. The temperature range was 25 °C to 500 °C with heating rate of 10 °C/min in dynamic nitrogen atmosphere with the flow rate of 50 ml/min. Fourier transform infrared (FT-IR) spectra were recorded on a Perkin-Elmer Model 1600 apparatus using KBr discs in the range of 4000–400 cm^{-1} . All results were compared to that of bulk CBZ. The morphology of the crystals was observed in a light microscopy Olympus PME 3 associated with a Moticom 1300 camera and a Moticom Images Advanced 3.1. software, which allowed the registration of the images.

RESULTS AND DISCUSSION

Solubility study of CBZ

The solubility of CBZ in various types of oils was investigated in order to select the most appropriate oily phase. Such study is a preliminary requirement in emulsions development. Once CBZ is sparingly soluble in water, it is desirable to achieve its greatest solubility into the oily core of the nanoemulsion. As can be seen in Table 1, among the investigated oils, CBZ was more soluble in MCT and castor oil. In this way, both of them were chosen as oil components of the formulations.

TABLE 1 Solubility of CBZ in various oils at 25°C .

Oil	CBZ solubility
Castor oil	++
MCT	++
Soybean oil	+
Olive oil	+/-
Peanut oil	--
Sesame seed oil	--

++ sparingly soluble, + slightly soluble, +/- very slightly soluble, -- practically insoluble

Characterization of CBZ nanoemulsions

The particle size is the most important physicochemical property of emulsions because it dictates the compatibility with the parenteral route. According to Table 2, the mean droplet size of emulsions ranged from about 113 to 210 nm, while the PI varied from 0.09 to 0.37, in agreement with results previously reported for emulsions obtained by spontaneous emulsification procedure (Bouchemal et al., 2004; Yu et al., 1995).

TABLE 2 *Particle size (nm) and polydispersity index measures for CBZ nanoemulsions (3.0 mg/ml).*

Formulations	Droplet size (nm)	Polydispersity index (PI)
C-L	157.5 ± 1.0	0.18 ± 0.004
C-C35	209.9 ± 0.7	0.26 ± 0.012
MCT-L	113.4 ± 1.7	0.37 ± 0.048
MCT-C35	175.2 ± 4.3	0.09 ± 0.042

Nevertheless, in about a week under storage, it was possible to observe the start of drug precipitation on the bottom of the container. In order to have better insight whether drug polymorphism could origin this phenomenon, drug crystals were investigated by DSC, IR spectroscopy and optical microscopy.

The DSC characterization of CBZ bulk powder presented in Figure 1 shows a first event corresponding to the melting of β form (174.6 °C), followed by exothermic crystallization as α polymorph (175.8°C), which subsequently melted at 190.6 °C (Kobayashi et al., 2000; Koester et al., 2003; Rustischelli et al., 2000). The DSC analysis of the precipitated crystals (Figure 1) shows that all samples have a similar behavior but different from the bulk material. A large endothermic event can be observed between 54.1 °C and 99.4 °C, which corresponds to the water associated to the crystals. A second endothermic event, the melting point of CBZ, occurs at 190.7 °C followed by sample degradation.

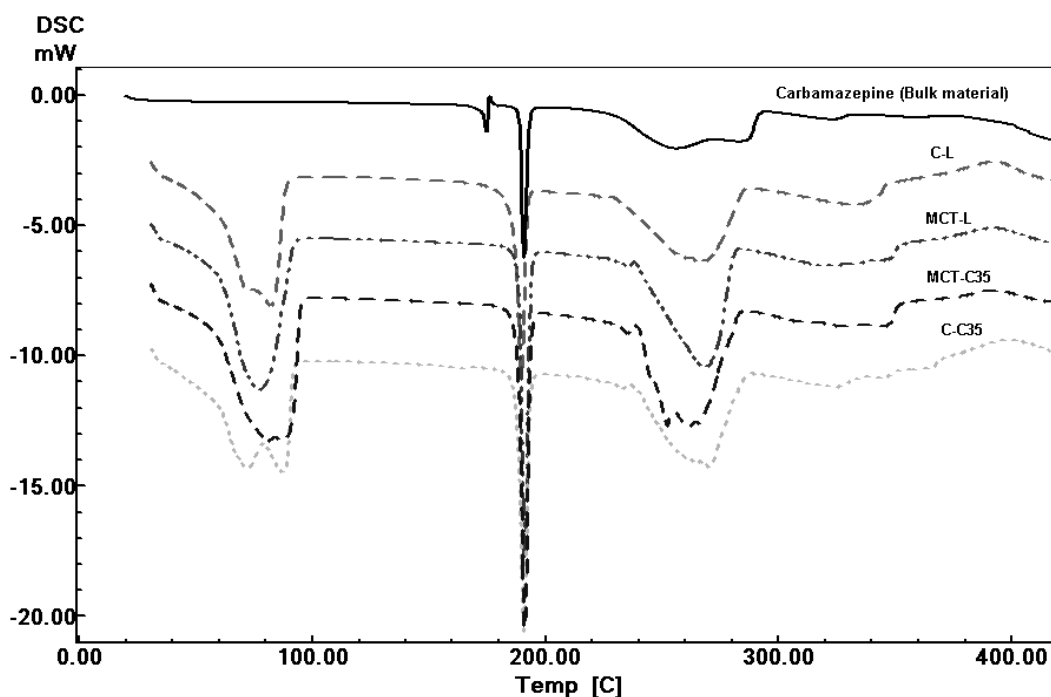


FIGURE 1 DSC thermal profiles of CBZ bulk material and precipitated crystals from emulsions at heating rate of 10 °C min⁻¹.

The analysis of CBZ crystals by DSC suggests that the polymorph found on the crystals would be no longer the β form previously characterized on the bulk powder but the dehydrated form (Han & Suryanarayanan, 1997; Nair et al., 2002; Otsuka et al., 1999). It is important to notice that the β form is the polymorph indicated by USP (Gosselin et al., 2003; Phadnis et al., 1997). This polymorphic transition occurred probably because CBZ is in an aqueous environment, and it is reported that polymorphic forms α and β convert to the dihydrate under this condition (Nair et al., 2002; Otsuka et al., 1999; Tian et al., 2006a).

Since DSC may not provide enough evidence of the existence of polymorphism, even though CBZ thermal behavior has been fully reported, including the influence of the operative heating rate (Lowes et al., 1987; Nair et al., 2002; Otsuka et al., 1999; Rustichelli et al., 2000), a FTIR analysis was also performed, which corroborated the DSC results. The FTIR analysis (Figure 2) showed a sharp peak at 3460 cm⁻¹ (-NH valence vibration) on the bulk material, characteristic of anhydrous CBZ. The crystals analysis demonstrated the presence of a broad peak in the OH stretching region of 3300-3400 cm⁻¹. Bands at 3460 cm⁻¹, 1674 cm⁻¹ (-CO-R vibration), 1603 and 1593 cm⁻¹ (range of -

C=C- and -C=O vibration and -NH deformation) could be seen in all samples (Koester et al., 2003; Ruschichelli et al., 2000; Tian et al., 2006a). The loss of the water associated to the crystals is observed by the broad peak on the OH stretching region. This broad peak overlaps the -NH vibration (Reffner et al., 2005).

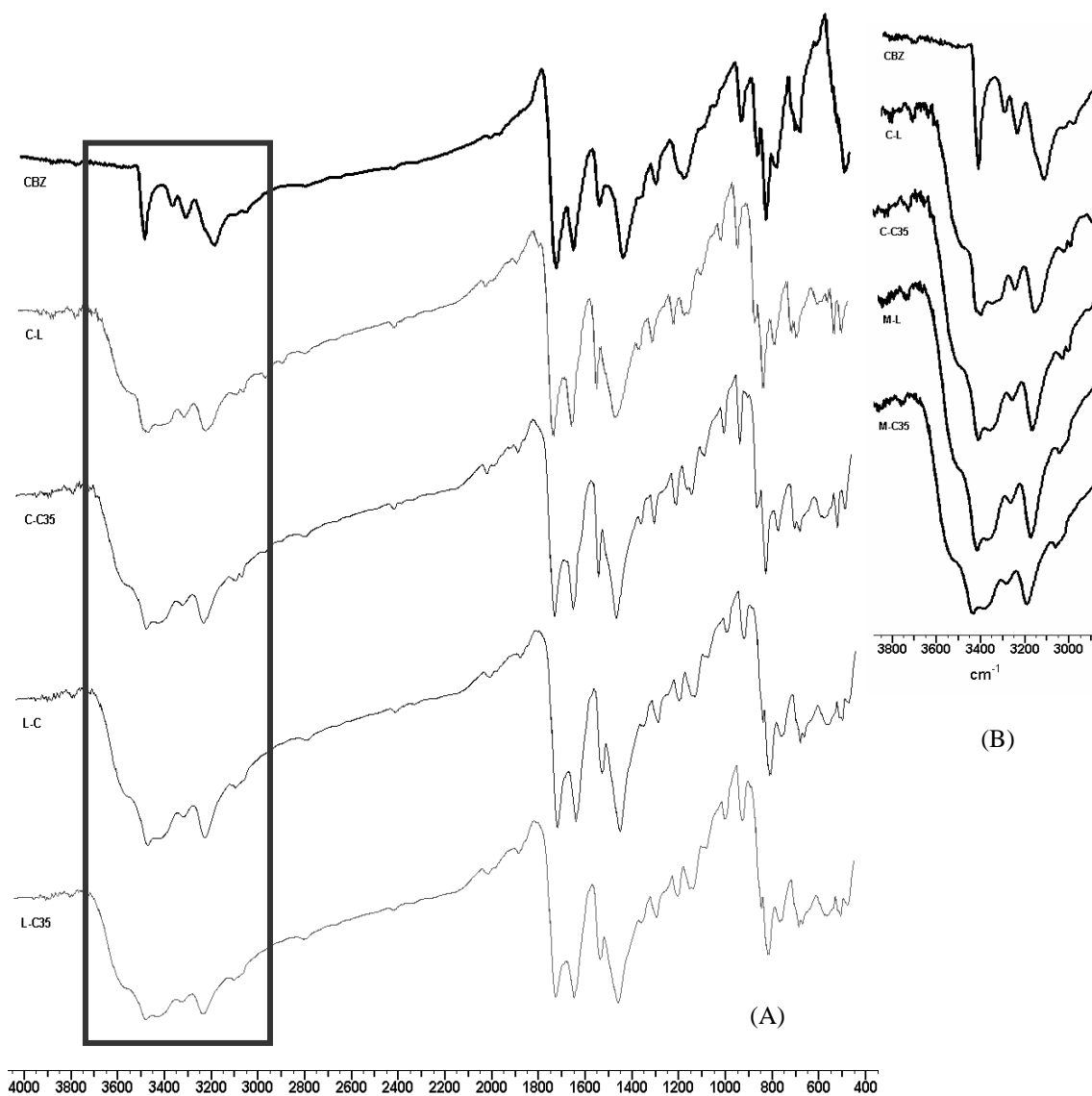


FIGURE 2 (A) FTIR spectra for the precipitated crystals from the four nanoemulsions developed and from the bulk material. (B) Enlarged OH stretching region (3000-3800 cm⁻¹).

Moreover, the photomicrographs of the crystals are shown in the Figure 3 and reveal that all crystal samples have a needle-like morphology, characteristic of the dehydrated form, differently from the β -polymorph which presents a prismatic morphology (Luhtala, 1992; Murphy et al., 2002; Tian et al., 2006a; Tian et al., 2006b).

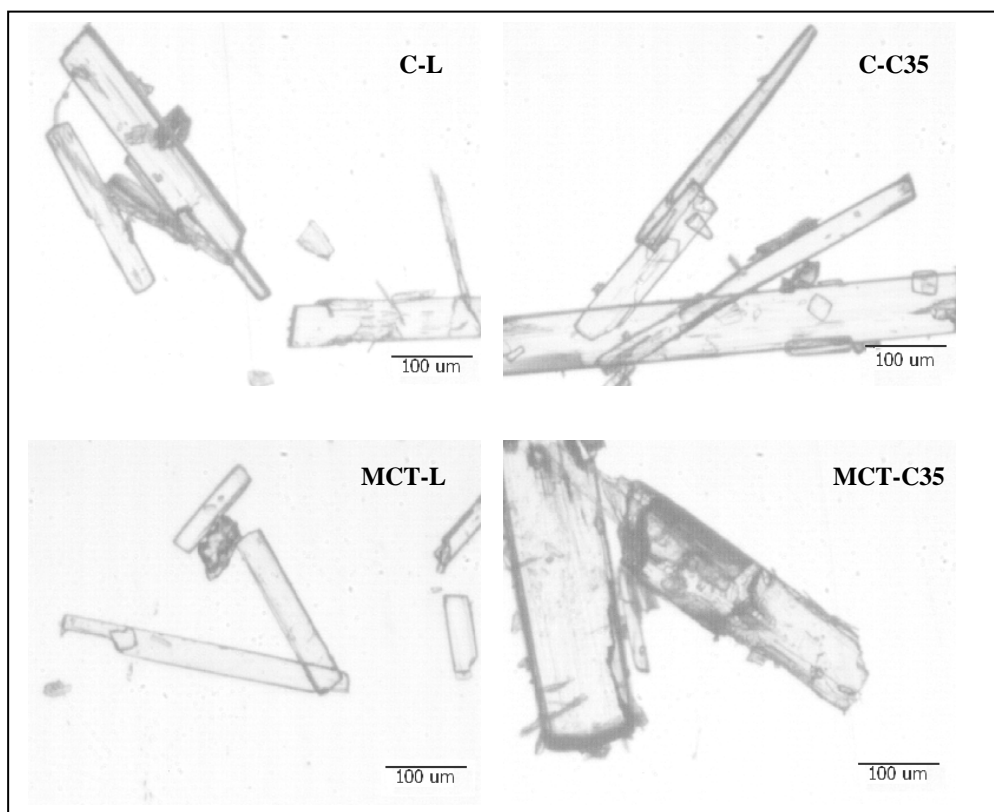


FIGURE 3 Photomicrographs of CBZ crystals from all developed nanoemulsions

The results obtained in this work suggest that drug precipitation is a result of a polymorphic transition, once the dihydrate is the less soluble form of CBZ and the solubility of the anhydrous carbamazepine is approximately twice that of its dihydrate form (Kobayashi et al., 2000; Luhtala, 1992). This polymorphic transformation may be a result of CBZ association within the oil-water interface. This is reported for drugs like CBZ which are poorly soluble in water as well as in the registered oils (Akkar & Müller, 2003; Yu et al., 1993). Akkar and Müller (2003) attributed this preferred location to CBZ solubility as well as to the method employed (high-pressure homogenization), but according to the present results, it is suggested that spontaneous emulsification method lead to the same phenomenon.

CONCLUSION

In conclusion, the viability of producing 3.0 mg/ml CBZ nanoemulsions was not achieved. A late-appearing drug precipitation was detected in the aqueous phase, which was characterized as the less soluble polymorphic form of CBZ, the dihydrate. Additional studies are under development to optimize a suitable submicron emulsion for parenteral delivery of CBZ.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Funpesquisa/UFSC and “Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina” (FAPESC), Brazil. We would like to thank the Brazilian Government for the scholarship of R.G. Kelmann (CAPES) and G. Kuminek (PIBIC/CNPq).

REFERENCES

- Akkar, A.; Müller, R.H. Formulation of intravenous carbamazepine emulsions by SolEmuls[®] technology. *Eur J Pharm Biopharm.* **2003**, *55*, 305-312.
- Becirevic-Lacan, M.; Jug, M.; Bacic-Vrca, V.; Cetina-Cizmek, B. Development of o/w emulsion formulation for carbamazepine by using modified cyclodextrins. *Acta Pharm.* **2002**, *52*, 149-159.
- Benita, S.; Levy, M.Y. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. *J Pharm Sci.* **1993**, *82*, 1069-1079.
- Bouchemal K.; Briançon, S.; Perrier, E.; Fessi, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. *Int. J. Pharm.* **2004**, *280*, 241–251
- Brewster, M.E.; Anderson, W.R.; Estes, K.S.; Bodor, N. Development of aqueous parenteral formulations for carbamazepine through the use of modified cyclodextrins. *J Pharm Sci.* **1991**, *80*, 380-383.
- Genaro, A.R. (Ed.) Remington: The Pharmaceutical Sciences and Practice of Pharmacy. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, 2000.

- Goodman, L.S., Gilman, A. G., Hardman, J. G, Limbird, L. E. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. McGraw-Hill Book Co., New York, NY, 2001.
- Gosselin, P.M.; Thibert, R.; Preda, M.; McMullen, J.N. Polymorphic properties of micronized carbamazepine produced by RESS. *Int J Pharm.* **2003**, *252*, 225-233.
- Han, J.; Suryanarayanan, R. Applications of pressure differential scanning calorimetry in the study of pharmaceutical hydrates: I. Carbamazepine dihydrate. *Int J Pharm.* **1997**, *157*, 209-218.
- Kaneniwa, N.; Ichikawa, J.; Yamaguchi, T.; Hayashi, K.; Watari, N.; Sumi, M. Dissolution behaviour of carbamazepine polymorphs. *Yakugaku Zasshi.* **1987**, *107*, 808-813.
- Kaneniwa, N.; Yamaguchi, T.; Watari, N.; Otsuka, M. Hygroscopicity of carbamazepine crystalline powders. *Yakugaku Zasshi.* **1984**, *104*, 184-190.
- Kobayashi, Y.; Ito, S.; Itai, S.; Yamamoto, K. Physicochemical properties and bioavailability of carbamazepine polymorphs and dihydrate. *Int J Pharm.* **2000**, *193*, 137-146.
- Koester, L.S.; Mayorga, P.; Pereira, V.P.; Petzhold, C.L.; Bassani, V.L. Carbamazepine/BCD/HPMC Solid Dispersions. II. Physical Characterization. *Drug Dev Ind Pharm.* **2003**, *29*, 145-154.
- Krahn, F.U.; Mielck, J.B. Relations between several polymorphic forms and the dihydrate of carbamazepine. *Pharm Acta Helv.* **1987**, *62*, 247-254.
- Levy, R.H.; Lockard, J.S.; Green, J.R.; Friel, P.; Martis, L. Pharmacokinetics of carbamazepine in monkeys following intravenous and oral administration. *J Pharm Sci.* **1975**, *64*, 302-307.
- Loscher, W.; Honack, D.; Richter, A.; Schulz, H.U.; Schurer, M.; Dusing, R.; Brewster, M.E. New injectable aqueous carbamazepine solution through complexing with 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: tolerability and pharmacokinetics after intravenous injection in comparison to a glycofurol-based formulation. *Epilepsia.* **1995**, *36*, 255-61.
- Lowes, M.M.J.; Caira, M.R.; Lotter, A.P.; Vanderwatt, J.G. Physicochemical properties and X-ray structural studies of the trigonal polymorph of carbamazepine. *J Pharm Sci.* **1987**, *76*, 744-752.
- Luhtala, S. Effect of sodium lauryl sulphate and polysorbate 80 on crystal growth and aqueous solubility of carbamazepine. *Acta Pharm Nord.* **1992**, *4*, 85-9.

- Murphy, D.; Rodríguez-Cintrón, F.; Langevin, B.; Kelly, R.C.; Rodríguez-Hornedo, N. Solution-mediated phase transformation of anhydrous to dihydrate carbamazepine and the effect of lattice disorder. *International Journal of Pharmaceutics*. **2002**, *246*, 121-134.
- Nair, R.; Gonen, S.; Hoag, S.W. Influence of polyethylene glycol and povidone on the polymorphic transformation and solubility of carbamazepine. *Int J Pharm*. **2002**, *240*, 11-22.
- Orange Book, Approved Drug Products with Therapeutic Equivalence Evaluations (24th ed.), Food and Drug Administration, USA. Available at: <<http://www.fda.gov/cder/ob/default.htm>>, 2006.
- Otsuka, M.; Ofusa, T.; Matsuda, T. Effect of binders on polymorphic transformation kinetics of carbamazepine in aqueous solution, *Coll Surf B*. **2000**, *17*, 145-152.
- Otsuka, M.; Ofusa, T.; Matsuda, T. Effect of environmental humidity on the transformation pathway of carbamazepine polymorphic modifications during grinding. *Coll Surf B*. **1999**, *13*, 263-273.
- Phadnis, N.; Cavatur, R.K.; Suryanarayanan, R. Identification of drugs in pharmaceutical dosage forms by X-ray powder diffractometry. *J Pharm Biom Anal*. **1997**, *15*, 929-943.
- Reffner, J. A.; Seelenbinder, J.A.; Tobler, C.H. Advances in Infrared Microprobe Instrumentation: Integration of Image Analysis and Molecular Spectroscopy. *Microsc Microanal*. **2005**, *11*(2).
- Rustichelli, C.; Gamberini, G.; Ferioli V.; Gamberini, M. C.; Ficarra R.; Tommasini, S. Solid-state study of polymorphic drugs: carbamazepine. *J Pharm Biom Anal*. **2000**, *23*, 41-54.
- Sweetman, S.C. (Ed), *Martindale: The Complete Drug Reference*. Pharmaceutical Press, London, UK, (electronic version) in <<http://www.medicinescomplete.com/mc/martindale/current/>>, 2006.
- Sznitowska, M.; Janicki, S.; Dabrowska, E.; Zurowska-Pryczkowska, K. Submicron emulsions as drug carriers: Studies on destabilization potential of various drugs. *Eur J Pharm Sci*. **2001**, *12*, 175-179.
- Taubol, E.; Lindström, S.; Klem, W.; Gjerstad, L. A new injectable carbamazepine solution – antiepileptic effects and pharmaceutical properties. *Epilepsy Research* **1990**, *7*, 59-64.
- Tian, F.; Zeitler, J.A.; Strachan, C.J.; Saville, D.J.; Gordon, K.C.; Rades, T. Characterizing the conversion kinetics of carbamazepine polymorphs to the dihydrate in aqueous suspension using Raman spectroscopy. *J Pharm Biom Anal*. **2006a**, *40*, 271-280.

Tian, F.; Sandler, N.; Gordon, K.C.; McGoverin, C.M.; Reay, A.; Strachan, C.J.; Saville, D.J.; Rades,

T. Visualizing the conversion of carbamazepine in aqueous suspension with and without the presence of excipients: A single crystal study using SEM and Raman microscopy. *Eur J*

Pharm Biopharm, *in press*, **2006b**.

USP28/NF23. United States Pharmacopeia & National Formulary. Rockville: United States

Pharmacopeial Convention, 2005.

Yu, W.; Tabosa Do Egito, E.S.; Barrat, G.; Fessi, J.P.; Devissaguet, J.P.; Puisieux, F. A novel

approach to the preparation of injectable emulsions by spontaneous emulsification process. *Int*

J Pharm. **1993**, *89*, 39-146.

**CAPITULO 3: VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
DOSEAMENTO DE NANOEMULSÕES PARENTERAIS CONTENDO
CARBAMAZEPINA**

Introdução

A validação de uma metodologia tem como objetivo principal assegurar que determinado procedimento analítico selecionado forneça resultados reprodutíveis e confiáveis, que sejam adequados aos fins para os quais tenha sido planejado (GARFIELD, 1994).

Diversos métodos são descritos para a determinação de carbamazepina em formas farmacêuticas de uso oral (AL-ZEIN *et al.*, 1999; ABDEL-HAMID, 2000; KOESTER *et al.*, 2003; YUAN *et al.*, 2003; GAVINI *et al.*, 2006) e materiais biológicos (SARIS *et al.*, 1997; MANDRIOLI *et al.*, 2001; KOESTER *et al.*, 2004; GAVINI *et al.*, 2006; YOSHIDA *et al.*, 2006) porém, mesmo com alguns trabalhos enfocando o desenvolvimento de uma forma farmacêutica nanoemulsionada contendo este fármaco, não há relato na literatura de nenhum método analítico para o doseamento da carbamazepina nesta forma farmacêutica.

Diante do exposto, o presente capítulo tem como objetivo descrever o desenvolvimento e a validação de uma metodologia analítica para o doseamento de carbamazepina nas formulações desenvolvidas.

PUBLICAÇÃO: *Determination of carbamazepine in parenteral nanoemulsions: Development and validation of an HPLC method*

Submetido à Chromatographia

Determination of carbamazepine in parenteral nanoemulsions: Development and validation of an HPLC method

R. G. Kelmann^a, G. Kuminek^a, H. F. Teixeira^b, L. S. Koester^a✉

^a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Campus Universitário – Trindade, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Bloco K, Laboratório de Controle de Qualidade, sala 207, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil.

^b Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Farmácia, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

✉ e-mail: leticiakoester@gmx.net

Abstract

A high performance liquid chromatographic (HPLC) method was developed and validated for the quantitative determination of carbamazepine (CBZ) in intravenous nanoemulsions. The method validation yielded good results with respect to linearity, specificity, precision and accuracy. The method was carried out on a RP-18 column with a mobile phase composed of methanol-water (70:30, v/v) subjected to a gradient of acetonitrile after drug elution, and detection at 286 nm. The linearity in the range of 10.0–50.0 µg/mL presented a determination coefficient (r^2) of 0.9996, calculated by least-squares regression; the R.S.D. values for intra-day and inter-day precision for % recovered were <0.44 and <1.21% respectively; and the recovery of CBZ from the sample matrix ranged from 94.3 to 104.9%.

Keywords

Column liquid chromatography

carbamazepine

nanoemulsions

parenteral

validation

Introduction

Carbamazepine (CBZ) (Fig. 1) is an extensively used drug for the management of epilepsy and psychiatric diseases [1,2]. Nevertheless, as a result of its low water solubility (< 200 µg/mL) [3] there is no parenteral formulation commercially available [4], which would be desirable in cases such as coma, swallowing problems or emergency.

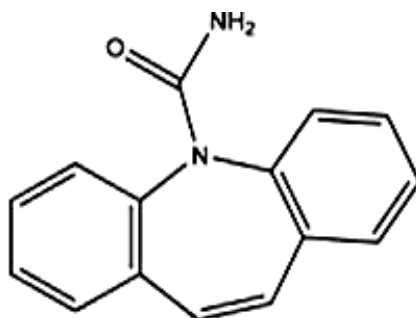


Fig. 1. Structure of CBZ

A novel pharmaceutical dosage form, consisting of an intravenous nanoemulsion of CBZ, is under development by our research group. Lipid emulsions have been widely studied for parenteral feeding and drug delivery, especially for drugs with poor water solubility [5-8]. The composition of such kind of formulation is complex, once it presents oils, lipophilic and/or hydrophilic emulsifiers, and other stabilizing excipients.

A literature survey reveals the absence of analytical methods for CBZ assay in such systems. In fact, a small number of HPLC methods have been described for the quantitation of drugs in parenteral emulsions [9-11].

The purpose of the present work was to develop and validate an HPLC method for CBZ determination in nanoemulsions composed by different excipients.

Experimental

Materials and reagents

CBZ reference standard (99%) was obtained from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil). CBZ raw material was purchased from Henrifarma (São Paulo, Brazil). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q[®] Plus apparatus (Millipore, Billerica, USA). HPLC grade acetonitrile and methanol were purchased from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). The excipients used in the preparation of the emulsions were soybean lecithin (Lipoid S75[®]) and medium chain triglycerides (MCT), kindly gifted by Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany); purified castor oil, purchased from Sigma Aldrich (Seelze, Germany), polysorbate 80 and polyoxyl 35 castor oil (Etocas 35 HV[®]) kindly donated by Croda (Campinas, Brazil). Glycerol was purchased from Nuclear (São Paulo, Brazil).

Four different formulations were prepared using different combinations of oils and lipophilic emulsifiers. The formulations were numbered as follows: the emulsion composed by castor oil and soybean lecithin (#1); castor oil and polyoxyl 35 castor oil (#2); MCT:castor oil mixture and soybean lecithin (#3); MCT:castor oil mixture and polyoxyl 35 castor oil (#4). Polysorbate 80 was used in all formulations as hydrophilic surfactant. The final composition of emulsions (% *w/v*) was made up of oil 10, lipophilic surfactant 4, hydrophilic surfactant 4, glycerol 2.25, and distilled water up to 100. The formulations were prepared with and without CBZ (2 mg/mL).

Apparatus and chromatographic conditions

The HPLC apparatus consisted of a Shimadzu LC-10A system (Kyoto, Japan) equipped with a model LC-10AT pump, an SPD-10AV variable-wavelength detector (set at 286 nm), an SCL-10Avp system controller, Rheodyne 7125 injection valve with a 20 μ l loop and C18 Polaris cartridge (150 mm \times 4 mm i.d., 5 μ m particle size, 100 Å pore diameter, end-capped). The mobile phase consisted of a methanol-water (70:30 v/v) isocratic flow rate until 6.0 minutes of run (drug detection). After that, a linear gradient of acetonitrile was started, reaching 100% of acetonitrile after two minutes and remaining in this way for more 10 minutes until return to the initial condition. The gradient flow is used with the objective of eluting the lipophilic compounds retained on the column. The LC system was operated at

flow-rate of 0.7 mL min⁻¹; the sensitivity was 0.5 AUFS and the chart speed was 0.5 cm min⁻¹ and 40±1°C (Shimadzu CTO 10AS).

Standard solution

The stock solution of CBZ was prepared by dissolving 25.0 mg in 25.0 mL of methanol, resulting in a 1.0 mg/mL solution of CBZ. From this solution, a working standard solution of 100.0 µg/mL was prepared. This solution was then diluted as needed to prepare five different standard solutions from 10 to 50 µg/mL of CBZ.

Sample preparation

The four different developed nanoemulsions were assayed using the conditions described in this document. A 1.0 mL volume of CBZ emulsion was diluted in methanol until the concentration of 30.0 µg/mL. The result solution was filtered through a 0.45 µm membrane and injected in the HPLC.

Method validation

Validation was based on the ICH Harmonized Tripartite Guideline, Q2(R1) [12], taking into account the characteristics which are relevant to its performance considering the assay of a drug in a final dosage form, in this case, nanoemulsions.

The specificity was evaluated by analyzing solutions containing the excipients employed for the preparation of CBZ emulsions. The system response was examined for the presence of interference or overlaps with the CBZ responses.

The linearity was assessed by injecting five standard solutions in the concentration range of 10-50 µg/mL, each in three replicates. A calibration curve was constructed and the proposed method was evaluated by linear regression. Characteristic parameters for regression equation ($y = ax + b$) were obtained by least-squares method.

The detection and quantification limits were calculated based on the standard deviation of the response and the slope, using the calibration curve data.

The intra-day precision (repeatability) was evaluated by assaying six emulsion samples (30.0 $\mu\text{g/mL}$), during the same day and under the same experimental conditions. Inter-day precision was evaluated by assaying solutions on 3 different days. The % R.S.D was calculated.

An accuracy study was carried out by applying the developed method to assay CBZ in emulsions where the emulsions (placebos) were spiked with known amounts of CBZ, at 3 different levels (lower, medium and upper concentration) corresponding to 20.0 $\mu\text{g/mL}$, 30.0 $\mu\text{g/mL}$ and 40.0 $\mu\text{g/mL}$. Samples were diluted, filtered and analyzed. At each level of spiking, three independent experiments were performed.

Results and Discussion

A reversed phase HPLC method was proposed as a suitable method for quantitative determination of CBZ in emulsions. The chromatographic conditions were adjusted in order to obtain efficient routine analysis. Two proportions of the mobile phase A (methanol-water) were evaluated: 75:25 (v/v), like a previous reported study [13], and 70:30 (v/v). Under the second alternative, the assayed drug was baseline resolved from the solvent front peak, differently from the first proportion.

The chromatograms shown in Fig. 2 demonstrate that the method is specific and no interference from the excipients, which are also detected by UV, was observed for the determination of CBZ (retention time: 4.0 minutes). Due to the apolarity of the excipients, they are retained in the column during the elution of the mobile phase A (methanol-water, 70:30, v/v), and are eluted only with an acetonitrile gradient. This procedure contributes to prolong the longevity of the column and prevent any interference from the excipients in subsequent analysis.

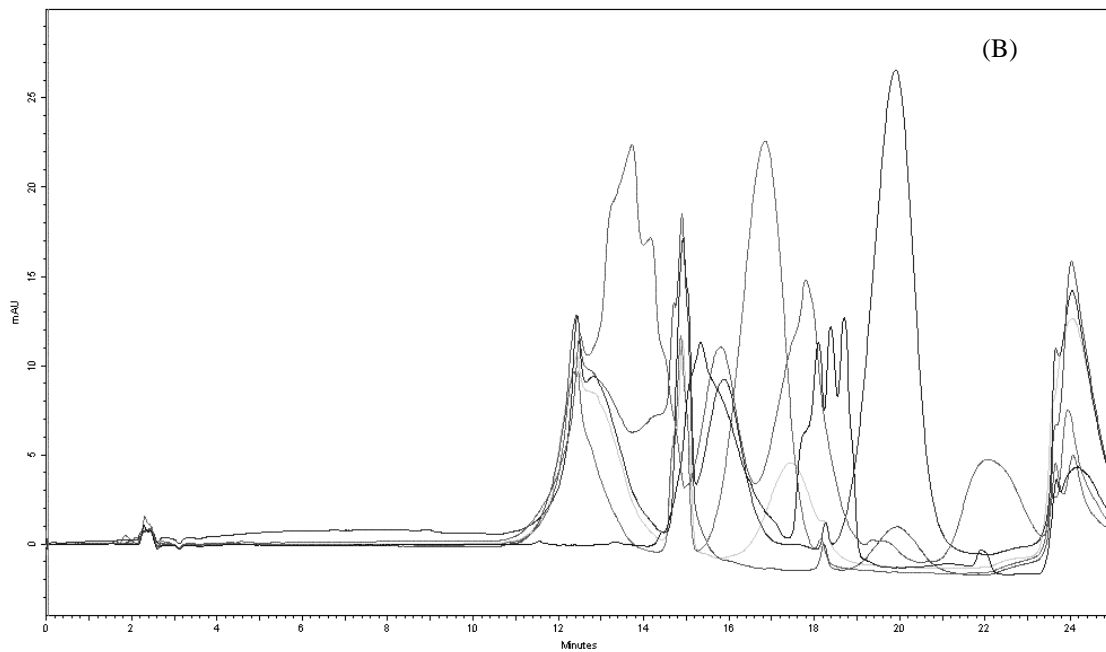
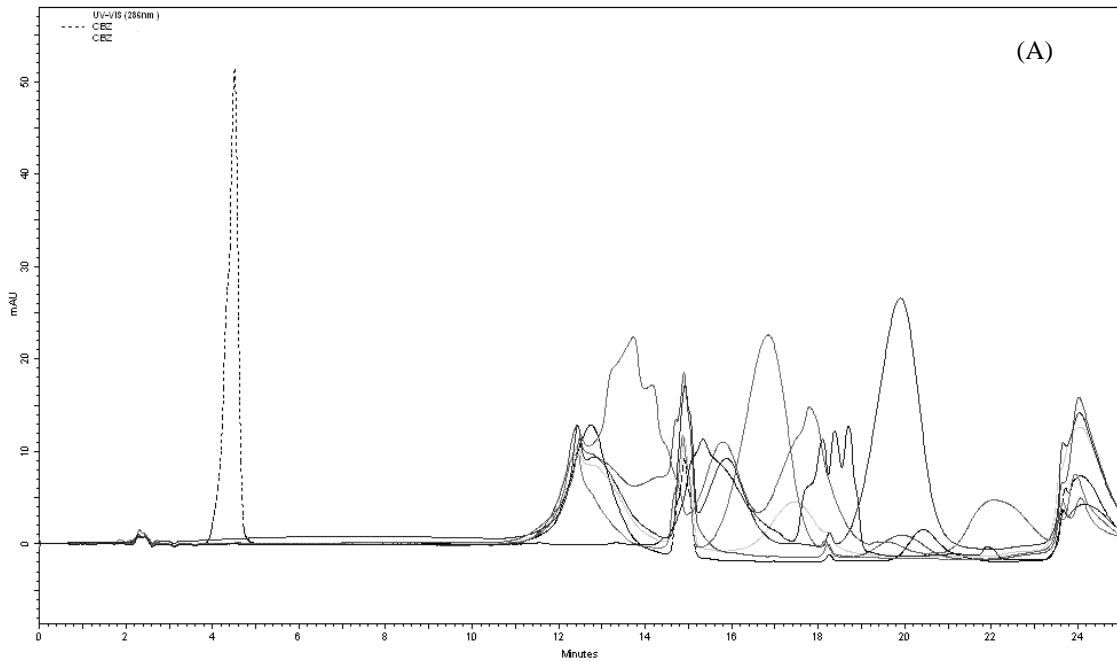


Fig. 2. Chromatograms of: (A) individual methanol solutions containing CBZ and formulations excipients; and (B) chromatograms of individual methanol solutions containing only the formulations excipients

Good linearity was observed in the 10.0–50.0 $\mu\text{g/mL}$ range. The response for the drug was linear and the calibration equation was $y = 98706x - 50427$ ($n=15$) showed excellent determination coefficient ($r^2 = 0.9996$), highly significant for the method ($p \leq 0.05$). The

confidence intervals for the intercept included zero (-171137; +70283). Therefore, the result confirms the absence of constant systematic error. Moreover, the analysis of residuals (data not shown) revealed no specific pattern, indicating a normal distribution [14]. The detection and quantification limits were 0.87 µg/mL and 2.9 µg/mL, respectively.

A satisfactory intra-day and inter-day variability was obtained, as can be observed in Table 1. R.S.D. values were found to be below 2.0%.

Table 1. Results from the precision of the method

	Theoretical Amount (µg/ml)	Experimental Amount (µg/ml ± SD)	% Recovered	RSD (%)
Intra-day				
Day 1 (n=6)	30.0	30.67 ± 0.13	102.24 ± 0.45	0.44
Day 2 (n=6)	30.0	29.83 ± 0.04	99.44 ± 0.15	0.15
Day 3 (n=6)	30.0	30.34 ± 0.09	101.14 ± 0.31	0.30
Inter-day (n=18)	30.0	30.28 ± 0.37	100.94 ± 1.22	1.21

The mean of the recovery from all four different formulations was 100.6%, showing a good agreement between amounts added and assayed (Table 2).

Table 2. Recovery of CBZ standard solution added to emulsion samples

Sample	Amount of CBZ		Recovery (%)* (% RSD)
	Added (µg/ml)	Found (µg/ml)	
Emulsion # 1	20.0	20.20	95.1 – 103.8 (2.9)
	30.0	30.42	
	40.0	39.78	
Emulsion # 2	20.0	20.05	97.2 – 104.9 (2.9)
	30.0	30.64	
	40.0	40.00	
Emulsion # 3	20.0	20.36	98.4 – 102.2 (1.3)
	30.0	30.13	
	40.0	40.17	
Emulsion # 4	20.0	19.95	94.3 – 103.4 (2.6)
	30.0	29.76	
	40.0	40.79	

* n = 9 (three independent experiments for each one of the three spiking levels).

Emulsions samples containing CBZ were assayed using the conditions described in this paper. The determination of drug content demonstrated R.S.D.s of < 2.0% from triplicate analysis of each emulsion. These results indicate a precise analytical methodology.

Conclusions

The proposed method can be used for quantitative determination of CBZ in intravenous emulsions, which comprise a complex mixture of components with lipid nature. The method was found to be simple, precise, accurate and sensitive. Furthermore, the method uses simple reagents, with minimum sample preparation procedures.

Acknowledgments

This work was supported by Funpesquisa/UFSC and FAPESC, Brazil. We thank the Brazilian Government for the scholarship of R.G. Kelmann (CAPES) and G. Kuminek (PIBIC/CNPq). The authors also wish to acknowledge Dr. Martin Steppe for his generous assistance.

References

1. Sweetman SC (ed) (2006), Martindale The Complete Drug Reference (34th ed.), The Pharmaceutical Press, London
2. Gennaro AR (ed) (2000) Remington the Science and Practice of Pharmacy (19th ed.), Mack Publishing, Easton
3. Evans WE, Schentag JJ, Jusko WJ(ed) (1992) Applied Pharmacokinetic Principles of Therapeutic Drug Monitoring (3rd ed), Applied Therapeutics: Vancouver,1992, pp. 26–29
4. Orange Book (2006), Food and Drug Administration, USA. Available at: <http://www.fda.gov/cder/ob/default.htm>. Accessed May, 05 2005.
5. Benita S, Levy MY (1993) J Pharm Sci 82:1069-1079
6. Washington C (1996) Adv Drug Del Rev 20:131-145
7. Floyd AG (1999) Pharm Sci Tech (1999) 2:134-143
8. Akkar A, Müller RH (2003) Eur. J Pharm Biopharm 55:305-312

9. Constantinides PP, Lambert K J, Tustian AK, Schneider B, Lalji S, Ma W, Wentzel B, Kessler D, Worah D, Quay SC(2000) Pharm Res 17:175-182
10. Han J, Davis SS, Papandreou C, Melia CD, Washington C (2004) Pharm Res 21:1573-1580
11. Yalin M, Öner F, Öner L, Hincal A A (1997) J Clin Pharm Ther 22:39-44
12. International Conference on Harmonization (ICH), Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B, 1995
13. Koester LS, Mayorga P , Pereira VP, Petzhold CL, Bassani VL (2003) Drug Devel Ind Pharm 29:145-15
14. Burke S (1998) AMC Technical Briefs, LC-GC Europe Online Supplement: 13-18.

**CAPITULO 4: DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES
PARENTERAIS CONTENDO CARBAMAZEPINA**

Introdução

O segundo capítulo deste trabalho descreve um estudo inicial que tinha por objetivo a incorporação de 3,0 mg/mL de carbamazepina numa forma farmacêutica nanoemulsionada. As formulações desenvolvidas não se mostraram adequadas para a via parenteral devido à precipitação de cristais do fármaco, o que foi atribuído a localização preferencial do fármaco à interface e transição polimórfica.

Diante deste resultado, a redução da concentração de fármaco e a elevação da quantidade dos tensoativos parecem estratégias promissoras na obtenção de uma formulação estável.

Neste capítulo, é proposta a preparação e otimização de novas nanoemulsões veiculando 2,0 mg/mL de carbamazepina. Alterações nas proporções dos tensoativos, assim como a proposição de uma nova fase oleosa, baseada nos resultados apresentados no estudo anterior foram realizadas. Um delineamento fatorial foi utilizado como ferramenta para a elaboração dos experimentos, avaliando a influência dos óleos e tensoativos lipofílicos utilizados sobre as características das formulações.

Após a otimização da formulação que se apresentou mais promissora, estudos de microscopia eletrônica de transmissão e um estudo de liberação *in vitro* foram realizados a fim de complementar a caracterização da formulação final.

PUBLICAÇÃO: *Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process*

Submetido a International Journal of Pharmaceutics

Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process

Regina G. Kelmann¹, Gislaine Kuminek¹, Helder F. Teixeira², Leticia S. Koester^{1*}

¹ Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Campus Universitário – Trindade, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Bloco K, Laboratório de Controle de Qualidade, sala 207, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Farmácia , Av. Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

***Corresponding author e-mail address: leticiakoester@gmx.net**

Fone: +55 48 37215066, Fax: +55 48 37219542

Abstract

Carbamazepine (CBZ), a widely used anticonvulsant drug, is a poorly soluble drug with no parenteral treatment available for patients. This study was aimed at developing a nanoemulsion for CBZ intravenous delivery. The spontaneous emulsification method was used to prepare different formulations containing 2 mg/mL CBZ. Likewise, a 2² full factorial experimental design was applied to study the influence of two independent variables (type of oil and type of lipophilic emulsifier) on emulsion physicochemical characteristics. The nanoemulsions were evaluated concerning droplet size, zeta potential, viscosity, drug content and association to oily phase. The formulation which presented the best characteristics required for intravenous administration was selected and refined with respect to the lipophilic emulsifier content (increase from 5 % to 6 % of soy lecithin). This formulation was characterized and kept its properties in a satisfactory range over the evaluated period (3 months), that is: droplet size around 150 nm, drug content around 95 % and zeta potential around – 40 mV. The transmission electron microscopy revealed emulsion droplets almost spherical in shape with an amorphous core, whereas the *in vitro* release profile assessed by dialysis bags demonstrated a release kinetics square root time dependent, with 95 % of c.a. having been released within 11 hours.

Keywords: Carbamazepine, nanoemulsions, intravenous, spontaneous emulsification, factorial design.

1. Introduction

Carbamazepine (CBZ), 5H-dibenz(b,f)azepine-5-carboxamide (Fig. 1), is a widely used antiepileptic agent which has been effective in the therapy of psychomotor seizures and trigeminal neuralgia for 40 years (Genaro, 2000; Goodman and Gilman, 2001; Sweetman, 2006). Due to its poor water solubility ($< 200 \mu\text{g/ml}$), the drug has a slow and irregular gastrointestinal absorption (Lund, 1994; Kobayashi et al., 2000; Sethia and Squillante, 2002). To date, CBZ is only available in the pharmaceuticals market in tablets (immediate release, controlled release and chewable), capsules and oral suspensions (FDA, 2006a). No parenteral formulation is offered to patients, which could prove be quite helpful in cases such as emergencies, coma, swallowing problems, among other circumstances.

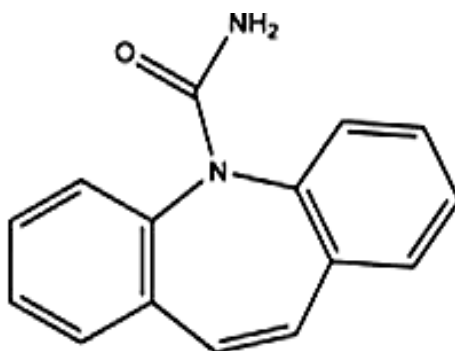


Fig. 1. Structure of carbamazepine.

Over the last three decades, some authors have investigated strategies to administer CBZ to the intravenous route, such as applying co-solvents (Levy et al., 1975, Tauboll et al., 1990) and complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) (Löscher et al., 1995; Brewster et al., 1997; Löscher and Hoenack, 1997). Nevertheless, these approaches are of limited success, since solvents can be dose limiting due to their toxicity, and few products based on complexation with cyclodextrins are available on the pharmaceuticals market (Thompson and Chaubal, 2002; Chaubal and Roseman, 2006).

Recently, the preparation of submicron emulsions has emerged as a promising alternative for CBZ intravenous administration (Sznitowska et al., 2000; Becirevic-Lacan et al., 2002; Akkar and Müller, 2003). Emulsion formulations offer an appealing alternative for the administration of poorly water soluble drugs due to their effectiveness for drug solubilization, potential for improved efficacy and anticipated patient acceptance and compliance due to the reduced side effects (Constantinides et al., 2004). Moreover, lipid emulsions have been used for at least 30 years in patients requiring parenteral nutrition (Washington, 1996; Floyd, 1999).

Concerning lipid emulsions and CBZ, the use of classical methods (Sznitowska et al., 2000; Becirevic-Lacan et al., 2002) and a patented technology which uses high-pressure homogenization (SolEmuls[®]) (Akkar and Müller, 2003) have been already reported in the literature. The development of parenteral nanoemulsions through spontaneous emulsification and the testing of different oils and emulsifiers comprise another strategy which is currently under investigation by our research group.

In the spontaneous emulsification method, the addition of the solvent-oil solution results in the emulsification of the oily phase into nanodroplets, due to some kind of interface instability originating from rapid diffusion of the solvent across the interface and decrease of the interfacial tension (Vitale and Katz, 2003; Bouchemal et al., 2004). This method is receiving increased attention and is interesting for formulation studies as it is easy to perform in laboratory scale, does not require sophisticated equipment nor the use of high temperature, and generally leads to the formation of small droplet size formulations, among other advantages. Droplet size and distribution are strongly affected by the nature of the solvent used during the process (Bouchemal et al., 2004), and considering its toxicity, those belonging to Class II or III from European Pharmacopoeia should be preferred.

In a previous investigation, the solubility of CBZ in different oils used in parenteral formulations was studied (medium chain triglycerides, castor, soybean, olive, peanut, sesame seed oils). Its solubility was higher in castor oil followed by medium chain triglycerides (MCT), and CBZ nanoemulsions were prepared with these oils through spontaneous emulsification (Kelman et al., 2006).

A factorial design is frequently used for planning this type of research as it provides the maximum amount of information, yet requires the least number of experiments (Sucker, 1971; Montgomery, 1991). Factorial design enables all factors to be varied simultaneously, allowing for the quantification of the effects caused by independent variables as well as the interactions between them. Factors might represent a continuous quantity or categories, and optimization can be performed through sequential experiments.

In the present study, a preliminary factorial design was proposed to investigate the influence of the category's type of oil and type of lipophilic emulsifier, with the intention of developing CBZ nanoemulsions through spontaneous emulsification. In a second step, the formulation which presented the best characteristics required for intravenous administration were selected and refined so as to improve its physicochemical stability.

2. Materials and methods

2.1 Materials

The CBZ reference standard (99 %) was obtained from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil). CBZ raw material was purchased from Henrifarma (São Paulo, Brazil). Ethanol and acetone were purchased from Vetec (São Paulo, Brazil). Excipients used in the preparation of nanoemulsions were: soybean lecithin (Lipoid S75[®]) and medium chain triglycerides (MCT), kindly donated by Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany); purified castor oil, purchased from Sigma Aldrich (Seelze, Germany); polyoxyl 35 castor oil (Etocas 35 HV[®]) and polysorbate 80 (Crillet 4[®]), donated by Croda (Campinas, Brazil) and glycerol purchased

from Nuclear (São Paulo, Brazil). All other reagents were of analytical grade. Water used in the preparation of formulations was distilled whereas in HPLC analyses water was obtained from a Milli-Q[®] Plus apparatus (Millipore, Billerica, USA).

2.2 Determination of CBZ solubility in oils

The solubility of CBZ in castor oil, MCT and a mixture at the ratio of 1:1 (w/w) of both oils was determined. An excess amount of CBZ was added to each oil and kept under moderate magnetic stirring for 24 hours to reach equilibrium. The sample was centrifuged at 15000 rpm for 20 min, an aliquot of the supernatant was diluted with methanol and CBZ content was assayed by high performance liquid chromatography (HPLC).

2.3 High-performance liquid chromatographic analysis

The HPLC apparatus consisted of a Shimadzu LC-10A system (Kyoto, Japan) equipped with a model LC-10AT pump, an SPD-10AV variable-wavelength detector (set at 286 nm), an SCL-10Avp system controller, Rheodyne 7125 injection valve with a 20 µl loop. The stationary and mobile phases used included a C18 Polaris cartridge (150 mm × 4 mm i.d., 5 µm particle size, 100 Å pore diameter, end-capped) and methanol:water (70:30 v/v), respectively. The mobile phase was pumped in an isocratic flow for 6 minutes followed by an acetonitrile gradient for elution of the lipid components. The method was validated for CBZ assay, according to ICH guidelines (ICH, 2005), with respect to specificity, linearity ($r^2 > 0.999$), precision (intra-day R.S.D. < 0.44 and inter-day R.S.D. < 1.21 %), and accuracy (recoveries between 99.4 and 102.1 %) (Kelman et al., 2006).

2.4 Preparation of formulations

2.4.1. Preparation applying a factorial design

Two factors and their influence on the nanoemulsion properties (particle size, polydispersity index, zeta potential, viscosity, drug content, and drug association) were evaluated using a 2² full factorial design. The investigated factors were: type of lipophilic

emulsifier and type of oily phase (Table 1). The design required a total of 4 experiments (Table 2) and the different formulations were prepared in triplicate to estimate experimental error. Analysis of variance (ANOVA) and Tukey's pairwise comparisons were performed at a significance level of $p < 0.05$. To perform the statistical analysis of the data, the Design Expert® software (Stateese, Minneapolis, USA) was used.

Table 1. Variables and levels of 2^2 factorial design for preparation of CBZ nanoemulsions

Variables	Levels ^a
A. Oil phase composition ^b	Castor oil (+)
	Castor oil: MTC (1:1) (-)
B. Lipophilic emulsifier ^c	Soybean lecithin (+)
	Polyoxyl 35 castor Oil (-)

^a Variable in higher level (+), variable in lower level (-)

^b Final oil concentration: 10.0 % (w/v)

^c Final lipophilic emulsifier concentration: 5.0 % (w/v)

Table 2. Experimental arrangement

Combination*	Coded units	Composition	
		A	B
(1)	M-C35	-	-
A	C-C35	+	-
B	M-L	-	+
AB	C-L	+	+

*A: oily phase composition; B: lipophilic emulsifier; (1) lower level to all variables.

The emulsions were prepared by spontaneous emulsification according to the following briefly described procedure (Yu et al., 1993; Bouchemal et al., 2004): the drug is mixed with the oil [castor oil or a mixture of castor oil:MCT 1:1 (w/w)]. The lipophilic emulsifier (soybean lecithin or polyoxyl 35 castor oil) is dissolved in a solution of acetone:ethanol

(50:50, v/v) and added to the oil:drug dispersion, resulting in the oily phase. The hydrophilic emulsifier (polysorbate 80) is dissolved in water forming the aqueous phase. For adjustment of isotonicity, 2.5 % (w/v) of glycerol was added to the aqueous phase. The oily phase is then slowly added into the aqueous phase under moderate magnetic stirring, forming the nanoemulsion. Solvents and most of the water are removed under reduced pressure resulting in a formulation concentration of 10 % (v/v) of the initial volume from the aqueous phase. The emulsions were stored at $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. The amount of hydrophilic and lipophilic surfactants was fixed to 4.0 % and 5.0 % (w/w) respectively, and the drug content was 2.0 mg/ml at the final emulsion. The pH was adjusted to 7.0 with a NaOH 0.1 M solution. The formulations were named as follows: the emulsion made up of castor oil and soybean lecithin (C-L); that made up of castor oil and polyoxyl 35 castor oil (C-C35); that made up of castor oil:MCT and soybean lecithin (M-L); and that made up of oil:MCT and polyoxyl 35 castor oil (M-C35). Blank formulations were also prepared. All formulations had their physicochemical characteristics evaluated.

2.4.2. Refinement of the selected formulation

Based on the characteristics required for parenteral administration (mainly mean droplet size and viscosity), as well as on the physical stability after three months of storage, the best combination of oil and lipophilic emulsifiers was selected and changed according to the increase in the lipophilic emulsifier content (from 5.0 to 6.0 %, w/w). This formulation was named M-L-6.

2.5 Characterization of CBZ nanoemulsions

All formulations were characterized with respect to physical appearance, particle size, zeta potential, viscosity, drug content and association with the emulsion oily phase. Most analyses were repeated after 3 months. The refined formulation was also evaluated regarding these parameters plus morphology and *in vitro* release.

2.5.1 Particle size analysis

The mean particle size and polydispersity index were measured at 25 °C by photon correlation spectroscopy (PCS) using a Malvern Nanosizer/Zetasizer[®] nano-ZS ZEN 3600 (Malvern Instruments, USA). Each 15 µl sample was diluted in 10 mL of ultrapure water. The analysis was performed three times to determine mean values.

2.5.2 Zeta potential measurement

The zeta potential was measured by electrophoretic mobility using Malvern Nanosizer/Zetasizer[®] nano-ZS ZEN 3600 (Malvern Instruments, USA). All analyses were done in triplicate and each 15 µl sample was diluted in 10 mL of NaCl (1mM) ultra-filtered (0.22 µm).

2.5.3 Viscosity

The rheological measurements were carried out in a AVS 350 viscometer (Schott-Geräte, Hofheim, Germany) equipped with a capillary tube Ic (viscosimeter constant, $k = 0.035$). Seven milliliters of each emulsion (adjusted to 25 ± 0.1 °C) were poured into the filling tube and transferred to the capillary tube by gentle suction. The time was recorded, in seconds, for the liquid to flow from the upper to the lower mark in the capillary tube. All formulations were analyzed in triplicate.

2.5.4 Drug content and association with the emulsions

The amount of CBZ in the emulsions was assayed by the HPLC method as previously described. A 1.0 mL volume of emulsion was diluted in methanol and the resulting solution was injected in the HPLC.

Free CBZ in the nanoemulsions was determined by measuring the non-incorporated drug present in the aqueous phase after ultrafiltration/centrifugation (Michalowski et al., 2004) using Microcon[®] centrifugal filter devices (100,000 NMWL; Millipore, USA). The CBZ

associated with emulsions was calculated from the difference between the total and the free drug concentrations.

2.5.5 Microscopic studies

A drop of the refined CBZ emulsion was placed on a carbon-coated copper grid (200 mesh) overlaid with 1 % formwar in chloroform, stained by 2.0 % uranyl acetate aqueous solution and examined by transmission electronic microscopy using a JEM-1200 EXII, instrument (JEOL, Tokio, Japan).

2.5.6 In vitro release study

The release of CBZ from the refined nanoemulsion was evaluated using the dialysis technique. Dialysis bags (Spectra/Por® membrane MWCO 10,000, Spectrum, USA) were soaked in filtered diffusion medium (Phosphate buffer pH= 7.4) for 24 hours and kept under refrigeration until use. One milliliter of the emulsion was placed in each dialysis bag (n=3), then sealed at both ends with medicell clips (Spectrum, USA), and placed at the bottom of the dissolution vessels. The study was carried out in a VK 7000 multi-bath dissolution tester (Varian, USA), at $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ using dissolution apparatus USP II with an agitation speed of 50 rpm. Aliquots of 2 ml were withdrawn from the dissolution medium at designed intervals for 11 hours. An equivalent volume of fresh medium was added to maintain the volume of the dissolution medium at 400 ml, which in turn ensures the *sink* condition. For comparison purposes, bulk CBZ and water at the same content and volume were placed in the dialysis bags, and the profile of CBZ released was assessed by the procedure described above.

The samples were analyzed by the previously described HPLC method, whose parameters were re-validated with respect to this performance study (ICH, 2005). In this way, the specificity was evaluated by analyzing a blank nanoemulsion submitted to the same test conditions and linearity range was widened (2 a 10 $\mu\text{g/ml}$; $R^2 > 0.999$). The release kinetics of CBZ from the nanoemulsion was assessed by first order ($\ln Q_t = \ln Q_0 - k_1.t$), zero order ($Q_t =$

$Q_0 + k_0.t$) and simplified Higuchi ($Q_t = k_H.t^{1/2}$) equations. The mathematical evaluation was performed considering the points up to 90% of CBZ release, since those precede the beginning of the profile plateau.

3. Results and discussion

3.1 Solubility determination in tested oils

The drug solubilization in the oily phase is a prerequisite to exploiting the nanoemulsion advantages. In previous studies only the use of MCT (Akkar and Muller, 2003), isopropyl miristate (Becirevic-Lacan et al., 2002) and soybean oil (Sznitowska et al., 2001) are described for CBZ nanoemulsion development. Likewise, emulsion stability problems or drug precipitation were also reported. Two studies using the combination of castor oil and MCT (1:1 w/w) revealed that this mixture led to a decrease in the castor oil viscosity and interfacial tension of the oily phase (Jumma and Müller, 1998; Jumma e Müller, 1999). In this way, the use of castor oil and a mixture of castor oil and MCT seemed to be a promising and previously uninvestigated approach.

The solubility study results revealed that CBZ is much more soluble in castor oil than in MCT. The castor oil:MCT (1:1 w/w) mixture reported better results than only MCT, but even applying this strategy, the solubility of CBZ was found to be low (Fig. 2) as compared to tetrazepam (~ 45 mg/g in a 1:1 castor oil:MCT mixture), a drug which was previously investigated with respect to the development of intravenous emulsions (Jumaa and Müller, 2001). This low solubility brings as a consequence a reduced drug association to the oily phase and dictated a higher incorporation of hydrophilic and lipophilic emulsifiers, which were used in permitted concentrations for the parenteral route, according to the inactive ingredient list approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA, 2006b).

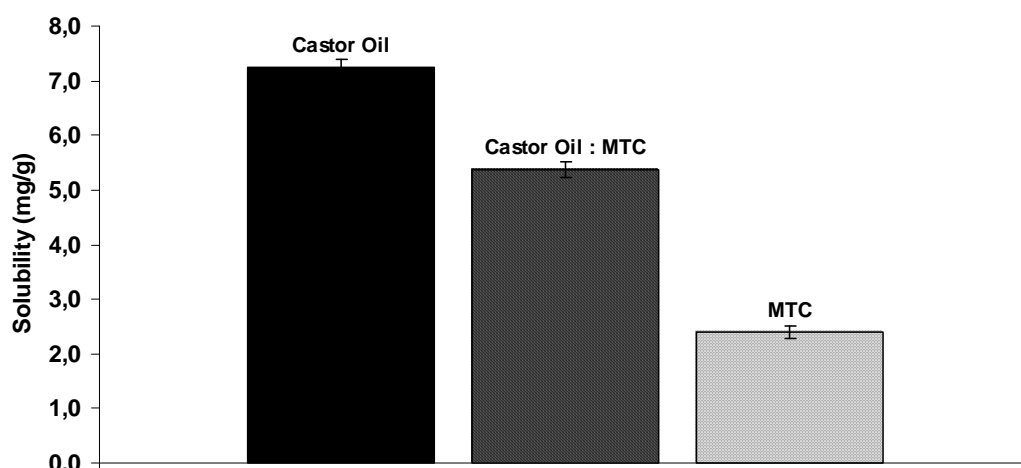


Fig. 2. CBZ solubility in castor oil, MCT:castor (1:1) oil mixture and MCT.

3.2 Preparation of CBZ parenteral emulsions

After preparation, all formulations presented a milky aspect with apparently low viscosity, which was further measured. The emulsions prepared with soybean lecithin presented a more yellowish appearance compared to those formed by polyoxyl 35 castor oil, which were almost blank. Formulations were stored under 4°C; after 24 hours, their characterization was performed.

The main feature common to all emulsions is their strict droplet size, which must be in a nanometer range. Therefore, particle size analysis was performed to confirm whether the resultant emulsions were indeed nanoemulsions. Polydispersity index gives information on the deviation from the average size, and values up to 0.250 are acceptable for parenteral emulsions (Muller et al., 2004). As can be seen in Fig. 3, photon correlation spectroscopy indicated that the average size of the emulsions is the range of 150 nm to 212 nm with a low polydispersity index, not significant (ANOVA, $p \leq 0.05$). The mean particle size of emulsions was smaller when soybean lecithin was used as a lipophilic emulsifier but these results are not

significantly different either (ANOVA, $p \leq 0.05$). In general, emulsions containing the smallest globules (usually 200–500 nm) tend to be the most physically stable (Floyd, 1999).

Emulsifiers act not only as a mechanical barrier but also through the formation of a surface potential (zeta potential) which can produce repulsive electrical forces among approaching oil droplets and thus hinders coalescence (Benita and Levy, 1993; Floyd, 1999). The more negative the zeta potential, the greater the net charge of the droplets, and the more stable the emulsion is (Han et al., 2001). Zeta potential values lower than -30 mV generally indicate a high degree of physical stability (Wang et al., 2006). The results of CBZ emulsion zeta potential measurements presented in Fig. 4 showed a negative surface charge. This was calculated at approximately -35 mV for formulations prepared with soybean lecithin and -5 mV for formulations with polyoxyl 35 castor oil. It is known that lecithin has high negatively charged phospholipids, which can produce emulsions with a high zeta potential (Benita and Levy, 1993). The formulations prepared with polyoxyl 35 castor oil, a non-ionic emulsifier, presented a negative zeta potential most likely due to the release of fatty acids from the castor oil portion. The results suggested that the emulsions composed of soybean lecithin have sufficient charge and mobility to inhibit aggregation of oil droplets, unlike of those made with polyoxyl 35 castor oil as lipophilic emulsifier. In fact, after three months in storage, the formulations prepared with polyoxyl 35 castor oil presented a slight creaming phenomenon, therefore, formulations prepared with lecithin seemed to be preferred. It should be noted that a comparison of the zeta potential data with the particle size results showed, in general, that a decrease in particle sizes of emulsions was accompanied by a decrease in negative surface charge values. It should be pointed out that blank emulsions particle size and potential zeta were also evaluated (data not shown). The results showed no significant differences when compared to the CBZ emulsion, which suggests that CBZ does not influence the droplet size.

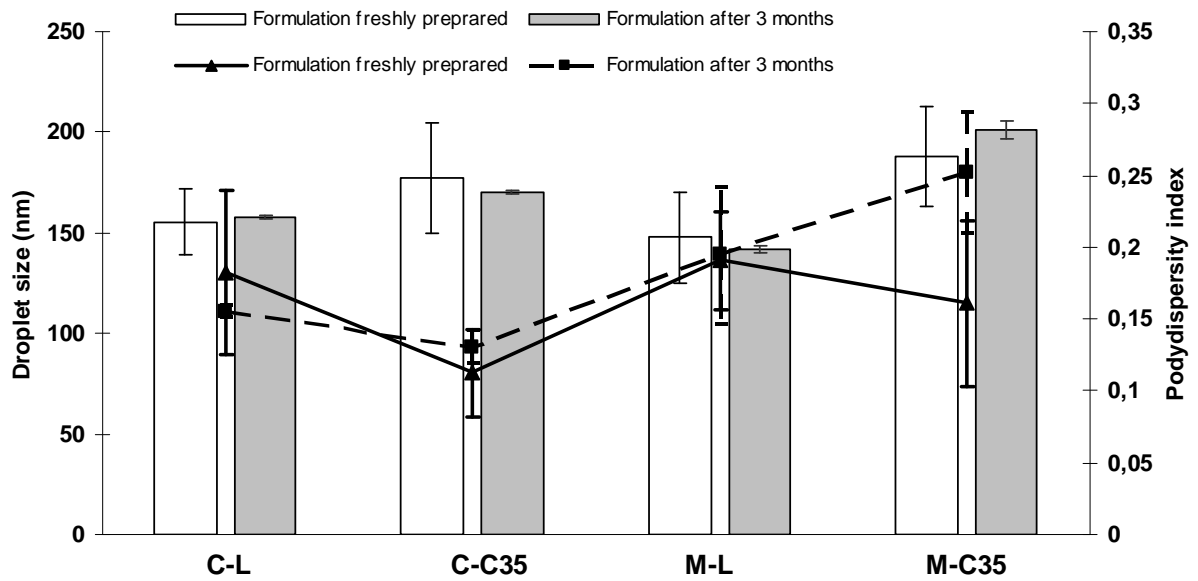


Fig. 3. Results of mean droplet size (\pm S.D.) and polydispersity index values (\pm S.D.) of CBZ nanoemulsions after 24 h (blank columns and triangles) and 3 months (grey columns and circles) of preparation. C-L: emulsion composed by castor oil and soybean lecithin; C-C35: composed by castor oil and polyoxyl 35 castor oil; M-L: composed by castor oil:MCT and soybean lecithin; and M-C35: composed by oil:MCT and polyoxyl 35 castor oil.

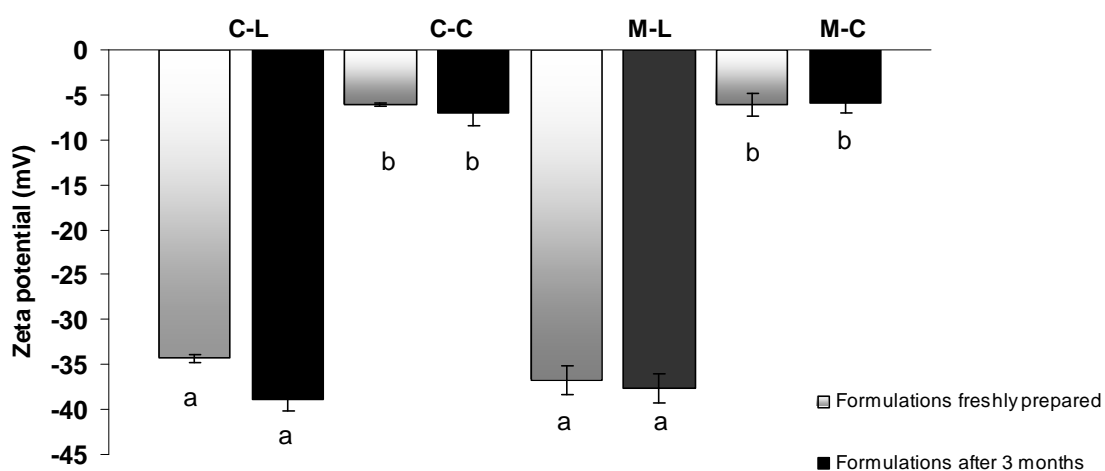


Fig. 4. Zeta potential results of CBZ nanoemulsions. Means with same letter are not significantly different (ANOVA, Tukey test, $p \leq 0.05$). Grey columns: measures (\pm S.D.) after 24 h. Black columns: measures (\pm S.D.) after 3 months. C-L: emulsion composed by castor oil and soybean lecithin; C-C35: composed by castor oil and polyoxyl 35 castor oil; M-L: composed by castor oil:MCT and soybean lecithin; and M-C35: composed by oil:MCT and polyoxyl 35 castor oil.

The droplet size and zeta potential are the most representative parameters in the control of emulsions stability. To evaluate the emulsion stability, these aspects were monitored over 3 months. After this period, these parameters still met the requirements for i.v. administration. The emulsions prepared with the castor oil:MCT mixture presented a reduction in mean droplet size, as can be observed in Fig. 3. This may be the result of a good particle stabilization, since the castor oil presents a high amount of free fat acids that can act as co-surfactants producing an oil phase with superior properties (Yamaguchi et al., 1995). The polydispersity index (Fig. 3) and zeta potential (Fig. 4) remained practically unchanged for all formulations ($p \leq 0.05$).

Viscosity measurements are not usually described for parenteral drug delivery emulsions, but this is a relevant characteristic as viscous emulsions are usually painful to the patient during i.v. administration. This parameter depends, among other, on the nature of the

surfactant (Nielloud et al., 1996). As can be observed in Table 3, the formulations prepared with soybean lecithin presented a significantly higher viscosity values ($p \leq 0.05$), especially C-L formulation. Jumaa and Müller (2001) suggested that viscosities higher than 3.9 mPa.s may be not attractive for parenteral administration.

Table 3. Results of viscosity, drug content and drug association of CBZ nanoemulsions

	Formulations			
	C-L	C-C35	M-L	M-C35
Viscosity (mPa-s)	9.51 ± 0.31 ^c	2.85 ± 0.20 ^a	4.97 ± 0.49 ^b	2.75 ± 0.11 ^a
Drug Content (%)	90.35 ± 2.4 ^a	101.03 ± 1.7 ^b	101.36 ± 1.0 ^b	98.38 ± 1.5 ^b
Drug association (%)	89.79 ± 0.41 ^a	89.51 ± 0.32 ^a	91.38 ± 0.45 ^a	88.94 ± 0.38 ^a

Each value represents the mean ± S.D. (n=3). Means in line with the same letter are not significantly different (ANOVA, Tukey test, $p \leq 0.05$). C-L: emulsion composed by castor oil and soybean lecithin; C-C35: composed by castor oil and polyoxyl 35 castor oil; M-L: composed by castor oil:MCT and soybean lecithin; and M-C35: composed by oil:MCT and polyoxyl 35 castor oil.

As can be also observed in Table 3, HPLC analysis revealed a drug content ranging from approximately 90.4% to 101.4%. The CBZ content of C-L emulsion was statistically different from the other formulations ($p \leq 0.05$). Since a reference parenteral dosage form was absent, a drug content limit from 90% to 110% for CBZ tablets was considered (USP, 2005). In this manner, the results may be judged to be satisfactory. Additionally, approximately 90% of the total CBZ content was found in the inner phase of the emulsions. There is no significant difference ($p \leq 0.05$) among CBZ association efficiencies in the various formulations.

The polynomial equations for droplet size, polydispersity index, zeta potential, viscosity, drug content, and drug association are presented in Eqs. (1) to (6), respectively, where y is dependent variable, A the type of oil, B type of lipophilic emulsifier and AB the interaction between the two factors.

$$(1) y = 166.67 - 0.67A - 15.50B + 4.83AB$$

$$(2) y = 0.18 - 0.01A - 0.01B + 1.67E-003AB$$

$$(3) y = 20.88 - 0.56A - 14.18B + 0.49AB$$

$$(4) y = 4.88.67 - 1.17A - 2.21B + 1.13AB$$

$$(5) y = 99.77 - 2.08A - 1.93B + 3.42AB$$

$$(6) y = 90.39 - 0.21A - 1.12B + 0.075AB$$

By the manner described by Montgomery (1991), the response value of the effects could be calculated. Main effects alone do not have much meaning when they are involved in significant interactions. Those interactions are the key to getting the optimal conditions. The results obtained from the interactions are shown in Fig. 5. From the AB interaction on drug content, droplet size, viscosity and polydispersity index, it is showed that when the emulsifier (variable B) is used at high level (soybean lecithin) and the variable A is used at low level (mixture of oils), a better response is observed. No significant effect could be seen in AB interaction on zeta potential and association efficiency results.

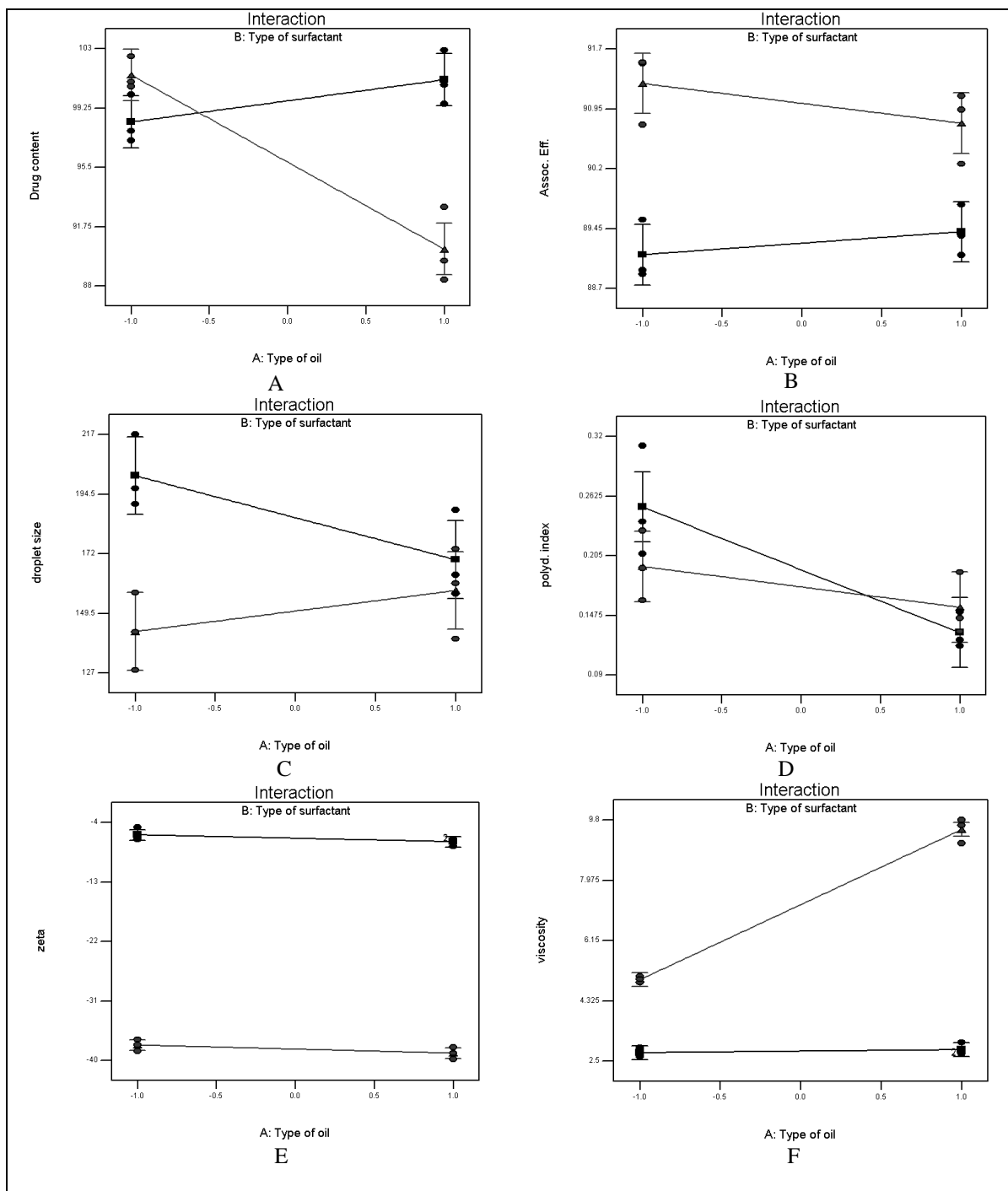


Fig. 5. Plots of AB interactions; (A) Drug content, (B) Association Efficiency, (C) Droplet size, (D) Polydispersity index, (E) Potential Zeta, (F) Viscosity. Darker line: variable B at low level; Slighter line: variable B at high level.

Considering all evaluated statistical parameters and physical stability, the M-L emulsion seemed to be the most promising formulation. The use of castor oil:MCT mixture as oily phase makes the formulations less viscous while soybean lecithin gives a highly negative zeta potential to the emulsion, which contributes to the formulation stability when compared to those prepared with polyoxyl 35 castor oil. Therefore, M-L emulsion would be preferred.

However, after 3 months, the mean drug content of all formulations decreased to approximately 51%. This phenomenon occurred most likely due to a polymorphic transition of CBZ. It has been reported that CBZ has some polymorphic forms and that in an aqueous environment they convert to the dehydrated form, the less soluble form of CBZ (Nair et al., 1999; Otsuka et al., 1999; Kelmann et al., 2006; Tian et al., 2006). In order to overcome this drawback, an increase in the lipophilic emulsifier content (6.0 %, w/w) was proposed as a first strategy to improve the physicochemical stability of M-L emulsion, that is, to refine this formulation.

3.3. Characterization of the refined formulation

Emulsion M-L-6 characteristics were evaluated with respect to droplet size, polydispersity index, zeta potential, drug content (at 0 and 3 months), morphology and *in vitro* drug release. As can be observed in Table 4, the results were considered satisfactory and after three months, the evaluated characteristics still met the requirements for parenteral administration, with no precipitation being visualized.

Table 4. Results of the characterization of M-L-6 CBZ nanoemulsion

Storage time (days)	Characterization			
	Droplet size (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)	Drug Content (%)
0	148.47 ± 7.04	0.211 ± 0.04	- 39.68 ± 1.61	95.25 ± 1.52
90	153.00 ± 3.27	0.200 ± 0.01	- 40.10 ± 1.71	93.76 ± 7.9

Each value represents the mean ± S.D. (n=3). C-L: emulsion composed by castor oil and soybean lecithin; C-C35: composed by castor oil and polyoxyl 35 castor oil; M-L: composed by castor oil:MCT and soybean lecithin; and M-C35: composed by oil:MCT and polyoxyl 35 castor oil.

The results of transmission electron microscopy can be observed in Fig. 6. The figure reveals that the lipid emulsion droplets were almost spherical in shape and have an amorphous core. The results corroborate with the droplet size analysis, showing that droplets are present in the nanometer range, varying from approximately 100 to 250 nm.

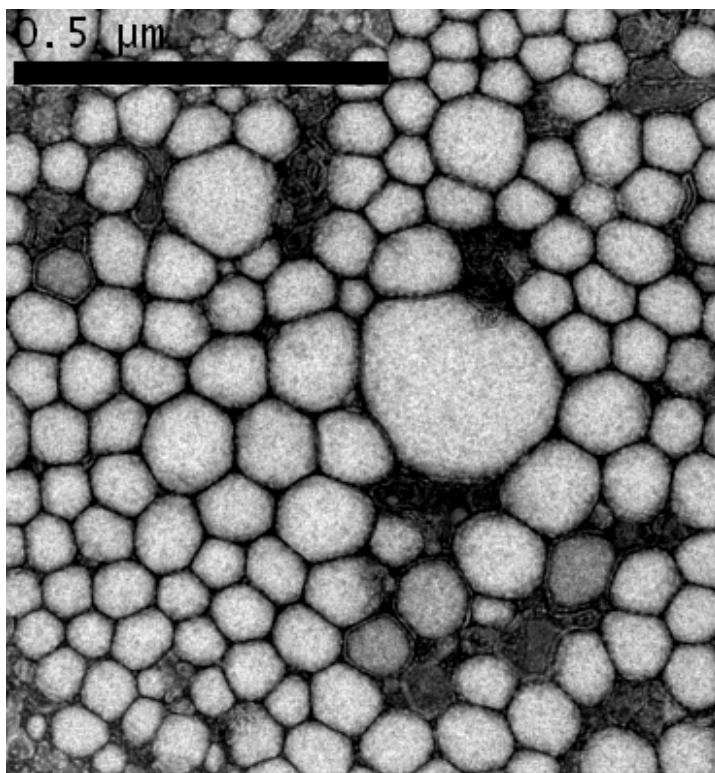


Fig. 6. Transmission electron photomicrograph of the M-L-6 CBZ nanoemulsion.

Finally, a preliminary evaluation of CBZ release behavior from the refined nanoemulsion was performed. The mean cumulative % CBZ released versus time plot for nanoemulsion and drug freely dispersed in water inside the dialysis bag is presented in Fig. 7. As can be observed, the release kinetics of CBZ from the nanoemulsions is slower than that of the free drug, and both can be considered prolonged. Moreover, both release kinetics seem to be a square root time dependent. Higuchi provided the model which best characterized these release profiles ($R^2 > 0.99$ for plotting the nanoemulsions, and $R^2 > 0.98$ for plotting the free drug) and described drug release as a diffusion process based on Fick's law (Costa and Lobo, 2001). Kinetics, as well as the prolonged drug release observed *in vitro* can be explained by the fact that CBZ diffusion from the oily core and interface is hindered by the aqueous medium, which acts as a barrier to drug transport due to its very low solubility in water. In the same way, the free drug presents a behavior which is typical from a dispersed system, considering a low aqueous soluble drug. In the case of the nanoemulsion, such sustained delivery is frequently reported in the literature (Schultz et al., 1997; Constantinides et al., 2000; Abrol et al., 2005) and may occur *in vivo*; however one can expect the foreignness of nanoemulsions to increase drug uptake by the living tissues due to oil droplet phagocytosis (Grassi et al., 2000; Abrol et al., 2005). It is worth mentioning that the dialysis membrane also accomplishes a physical separation of the nanoemulsions from the CBZ released to the medium and may be in part responsible for this feature. This technique is criticized by some authors for not mimicking *in vivo* conditions and release mechanism for parenteral route (Henriksen et al., 1995; D'Souza and DeLuca, 2006). Thus, all data concerning drug release from nanoemulsions should be interpreted with care and further test conditions for evaluating CBZ release should be investigated.

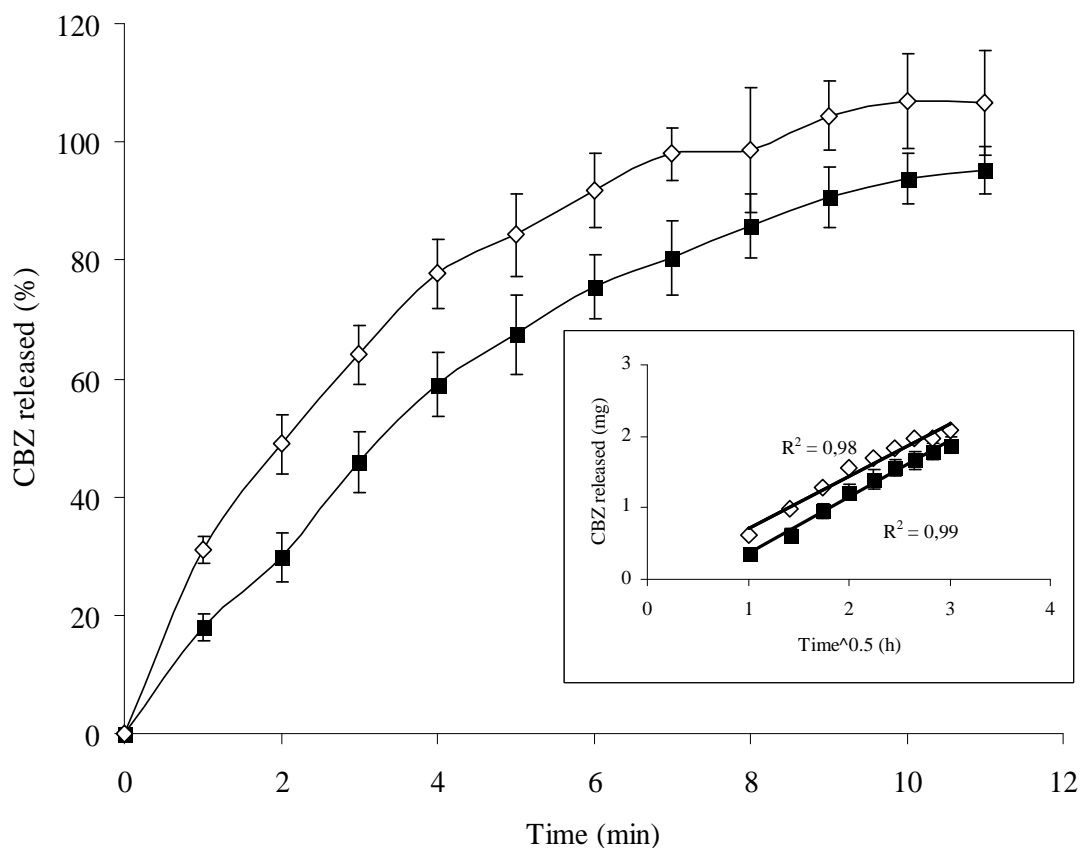


Fig. 7. *In vitro* release profiles of M-L-6 nanoemulsion (dark squares) and CBZ aqueous dispersion (open triangles) from dialysis bag in phosphate buffer pH= 7.4. Mean \pm S.D; n=3. Detail: Higuchi plot.

4. Conclusions

The factorial design was a beginning instrument in selecting the mixture of castor oil:MCT (1:1 w/w) and soybean lecithin as the best oily phase and lipophilic emulsifier, respectively, in order to prepare 2 mg/mL CBZ nanoemulsions by spontaneous emulsification. Nevertheless, a reduced drug content after 3 months led to the refinement of formulation by increasing soybean lecithin content to 6.0% (w/w). The physicochemical characteristics, such as drug content, zeta potential, and droplet size, were evaluated after 24 hrs and 3 months of preparation, demonstrating the feasibility of this emulsion for the i.v. route. The morphological evaluation confirmed the formation of an emulsion in the nanosize range. An

in vitro release study was also performed, revealing a release kinetics which fits the Higuchi model.

The stability of this refined formulation will be further assessed and the need for optimization will be complemented by sequential factorial designs. Upon obtaining successful results, preclinical studies are to be undertaken and other *in vitro* test conditions may be investigated in the attempt to establish an *in vitro-in vivo* correlation.

Acknowledgements

This work was supported by Funpesquisa/UFSC and “Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina” (FAPESC), Brazil. We would like to thank the Brazilian Government for their patronship of R.G. Kelmann (CAPES) and G. Kuminek (PIBIC/CNPq), as well as to Christiane Lopes and Lali Ronsoni Zancan for their help in this study.

References

- Abrol, S., Trehan, A., Katare, O.P., 2005. Comparative Study of Different Silymarin Formulations: Formulation, Characterization and In Vitro/In Vivo Evaluation. *Curr. Drug Del.*, 2, 45-51.
- Akkar, A., Müller, R.H., 2003. Formulation of intravenous carbamazepine emulsions by SolEmuls® technology. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 55, 305-312.
- Becirevic-Lacan, M., Jug, M., Bacic-Vrca, V., Cetina-Cizmek, B., 2002. Development of o/w emulsion formulation for carbamazepine by using modified cyclodextrins. *Acta Pharm*, 52, 149-159.
- Benita, S., Levy, M.Y., 1993. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. *J. Pharm. Sci*, 82, 1069-1079.

Bouchemal, K., Briançon, S., Perrier, E., Fessi, H, 2004. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. *International Journal of Pharmaceutics*, 280, 241–251.

Brewster, M. E, Anderson, W. R, Meinsma, D., Moreno, D., Webb, A. I., Pablo, L., Estes, K. S., Derendorf, H., Bodor, N., Sawchuk, R., Cheung, B., Pop, E., 1997. Intravenous and oral pharmacokinetic evaluation of a 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin-based formulation of carbamazepine in the dog: comparison with commercially available tablets and suspensions. *J. Pharm. Sci.*, 86, 335-339.

Chaubal, M.V., Roseman, T.J., 2006. Drug Delivery Trends for Parenteral Therapeutics. *Pharmaceutical Technology*, 02 sep.

Constantinides, P.P., Tustian, A., Kessler, D.R., 2004. Tocol emulsions for drug solubilization and parenteral delivery. *Adv. Drug Del. Rev.*, 56,1243-1255.

Constantinides, P.P., Lambert, K.J., Tustian, A.K., Schneider, B., Lalji, S., Ma, W., Wentzel, B., Kessler, D., Worah, D., Quay, S.C., 2000. Formulation development and antitumor activity of a filter-sterilizable emulsion of paclitaxel. *Pharm. Res.*, 17, 175-182.

Costa, P., Lobo, J.M.S., 2001. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 13, 123-133.

D'Souza, S.S., DeLuca, P.P., 2006. Methods to Assess in Vitro Drug Release from Injectable Polymeric Particulate Systems. *Pharm. Res.*, 23, 460-474.

FDA, Food and drug administration, 2006a. Approved drug products with therapeutic equivalence evaluations. 26th edition, p. 92-93, 2006. Available at: <<http://www.fda.gov/cder/orange/obannual.pdf>>, 12 nov.

FDA, Food and drug administration, 2006b. Inactive Ingredient Database. Available at <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm>>, 12 nov.

Floyd, A.G., 1999. Top ten considerations in the development of parenteral emulsions. *Pharm. Sci. Tech.*, 2, 134-143.

Genaro, A.R. (Ed.), 2000. *Remington: The Pharmaceutical Sciences and Practice of Pharmacy*. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia.

Goodman, L.S., Gilman, A. G., Hardman, J. G, Limbird, L. E., 2001. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. McGraw-Hill Book Co., New York.

Grassi, M., Coceani, N., Magarotto, L., 2000. Mathematical modeling of drug release from microemulsions: theory in comparison with experiments. *J. Colloid Interface Sci.* 228, 141-150.

Han J., Davis, S.S., Washington, C., 2001. Physical properties and stability of two emulsion formulations of propofol. *Int .J. Pharm.*, 215, 207-20.

Henriksen, I., Sande, S.A., Smistad, G., Agren, T., Karlsen, J.,1995. In vitro evaluation of drug release kinetics from liposomes by fractional dialysis. *Int. J. Pharm.* 119, 231-238.

ICH, 2005. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, International Conference on Harmonization, IFPMA, Geneva.

Jumaa, M., Müller, B.W., 1998. The effect of oil components and homogenization conditions on the physicochemical properties and stability of parenteral fat emulsions. *Int. J. Pharm.*, 163, 81-89.

Jumaa, M., Müller, B.W., 1999. In vitro investigation of the effect of various isotonic substances in parenteral emulsions on human erythrocytes. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 9, 207-212.

Jumaa, M., Müller, B.W., 2001. Development of a Novel Parenteral Formulation for Tetrazepam Using a Lipid Emulsion. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 27,1115-1121.

Kelmann, R.G., Kuminek, G., Teixeira, H.F., Koester, L.S., 2006. Development of nanoemulsions for carbamazepine parenteral administration: The influence of drug polymorphism. Paper submitted to *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*.

- Kelmann, R.G., Kuminek, G., Teixeira, H.F., Koester, L.S, 2006. Determination of carbamazepine in parenteral nanoemulsions: Development and validation of a HPLC method. Paper submitted to *Chromatographia*.
- Kobayashi, Y., Itai, S., Yamamoto, K., 2000. Physicochemical properties and bioavailability of carbamazepine polymorphs and dehydrate. *Int. J. Pharm.*, 193, 137-146.
- Levy, R. H., Lockard, J. S., Green, J. R., Friel, P., Martis, L., 1975. Pharmacokinetics of carbamazepine in monkeys following intravenous and oral administration. *J. Pharm. Sci*, 64, 302-307.
- Löscher, W., Hoenack, D., 1997. Intravenous carbamazepine: comparison of different parenteral formulations in a mouse model of convulsive status epilepticus. *Epilepsia*, 38, 106-113.
- Löscher, W., Honack, D., Richter, A., Schulz H. U., Schurer ,M., Dusing, R., Brewster, M. E., 1995. New injectable aqueous carbamazepine solution through complexing with 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: tolerability and pharmacokinetics after intravenous injection in comparison to a glycofurol-based formulation. *Epilepsia*, 36, 255-61.
- Lund, W., 1994. *The pharmaceutical codex: Principles and Practices of Pharmaceutics*. The Pharmaceutical Press, 12 ed. London.
- Michalowski, C.B., Guterres, S.S., Dalla Costa, T., 2004. Microdialysis for evaluating the entrapment and release of a lipophilic drug from nanoparticles, *J.Pharm. Biom. Anal.*, 35 1093-1100.
- Montgomery, D.C., 1991. *Design and Analysis of Experiments*, 3rd Ed, Wiley, New York, p. 228-301.
- Müller, R.H., Schmidt, S., Buttle, I., Akkar, A., Schmitt, J., Brömer, S., 2004. SolEmuls[®] - novel technology for the formulation of i.v. emulsions with poorly soluble drugs. *Int. J. Pharm.*, 269, 293-302.

Nair, R., Gonen, S., Hoag, S.W., 2002. Influence of polyethylene glycol and povidone on the polymorphic transformation and solubility of carbamazepine. *Int. J. Pharm.*, 240, 11-22

Nielloud, F., Marti-Mestres, G., Laget, J.P., Fernandez, C., Maillols, H., 1996. Emulsion formulation: Study of the influence of parameters with experimental designs. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 22, 159-166.

Otsuka, M., Ofusa, T., Matsuda, Y., 1999. Effect of environmental humidity on the transformation pathway of carbamazepine polymorphic modifications during grinding. *Coll. Surf. B*, 13, 263-273.

Schultz, K., Mollgaard, B., Frokjaer, S., Larsen C., 1997. Rotating dialysis cell as in vitro release method for oily parenteral depot solutions. *Int. J. Pharm.*, 157, 163-169.

Sethia, S., Squillante, E., 2002. Physicochemical characterization of solid dispersions of carbamazepine formulated by supercritical carbon dioxide and conventional solvent evaporation method. *J. Pharm. Sci.*, 91, 1948-1957.

Sucker, H., 1971. Methoden zum Planen und Auswerten von Versuchen; I. Factorial Design, eine Einführung. *APV-Informationsdienst*, 17, 52-68.

Sweetman, S.C. (Ed), 2006. *Martindale: The Complete Drug Reference*. Pharmaceutical Press, London, UK, (electronic version) in
<<http://www.medicinescomplete.com/mc/martindale/current/>>.

Sznitowska, M., Janicki, S., Dabrowska, E., Zurowska-Pryczkowska, K., 2001. Submicron emulsions as drug carriers: Studies on destabilization potential of various drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 12, 175-179.

Tauboll, E., Lindström, S., Klem, W., Gjerstad, L., 1990. A new injectable carbamazepine solution :antiepileptic effects and pharmaceutical properties. *Epilepsy Res.*, 7, 59-64.

Tian, F.; Zeitler, J.A.; Strachan, C.J.; Saville, D.J; Gordon, K.C.; Rades, T., 2006. Characterizing the conversion kinetics of carbamazepine polymorphs to the dihydrate in aqueous suspension using Raman spectroscopy. *J. Pharm. Biom. Anal.*, 40, 271-280.

Thompson, D.O., Chaubal, M.V., 2002. Cyclodextrins (CDS)—Excipients by Definition, *Drug Delivery Systems by Function, Part I: Injectable Applications. Drug Deliv. Technol.* 2 34-38.

United States Pharmacopeia & National Formulary 28/NF23, 2005. Pharmacopeial Convention, Rockville, MD. Electronic version.

Vitale, S.A., Katz, J.L., 2003. Liquid droplet dispersions formed by homogeneous liquid– liquid nucleation: “The Ouzo effect”. *Langmuir* 19, 4105-4110.

Wang , J., Sung, K.C., Hu, O.Y., Yeh, C., Fang , J., 2006. Submicron lipid emulsion as a drug delivery system for nalbuphine and its prodrugs. *J. Contr. Rel.*, 115, 140-149.

Washington, C., 1995. Stability of lipid emulsions for drug delivery. *Adv. Drug Del. Rev.*, 20,131-145.

Yamagushi, T., Nishizaki, K., Itai, S., Hayashi, H., Ohshima, H., 1995. Physicochemical Characterization of Parenteral Lipid Emulsion: Influence of Cosurfactants on Flocculation and Coalescence. *Pharm. Res.*, 12, 1273-1278.

Yu, W., Tabosa Do Egito, E.S., Barrat, G., Fessi, J.P., Devissaguet, J.P. And Puisieux, F., 1993. A novel approach to the preparation of injectable emulsions by spontaneous emulsification process. *Int. J. Pharm.*, 89, 139-146.

DISCUSSÃO GERAL

A carbamazepina é o fármaco de primeira escolha no controle da epilepsia (Korlokovas, 2004; SWEETMAN, 2006). Aproximadamente 50 milhões de pessoas, cerca de 1% da população mundial, sofrem desta patologia (SANDER *et al.*, 1996), entretanto, o tratamento à base de carbamazepina é disponibilizado apenas para uso oral. Isto ocorre em função da baixa hidrossolubilidade do fármaco (LUND, 1994; AKKAR e MÜLLER, 2003; CLARKE, 2006), o que determina a necessidade de se empregar estratégias farmacotécnicas que permitam o desenvolvimento de uma formulação para uso intravenoso.

Diante destes aspectos, foi proposto o desenvolvimento de uma forma farmacêutica nanoemulsionada para administração parenteral de carbamazepina, utilizando-se a técnica de emulsificação espontânea na concepção das formulações. Esta técnica não requer equipamentos sofisticados e permite a preparação de pequenos volumes, sendo assim interessante para estudos de bancada. Ainda, é descrito que este processo conduz geralmente à obtenção de emulsões de reduzido tamanho de gotícula, e com baixo índice de polidispersidade. Cabe ressaltar que não há nenhum relato na literatura do emprego desta técnica no preparo de nanoemulsões contendo carbamazepina.

Inicialmente foi estudada a possibilidade de desenvolver formulações contendo 3 mg/ml de fármaco. Esta concentração foi proposta com base no estudo de Akkar e Muller (2003), que sugere que essa concentração poderia contornar o problema de precipitação de fármaco observado pelos autores, e viabilizar a administração de um pequeno volume, considerando-se o perfil plasmático da carbamazepina.

Um pré-requisito para o desenvolvimento de uma nanoemulsão é a investigação da solubilidade do fármaco no núcleo oleoso. Estudos anteriores descrevem somente a utilização de óleo de soja, miristato de isopropila e TCM (SZNITOWSKA *et al.*, 2000; BECIREVIC-LACAN *et al.*, 2002; AKKAR e MÜLLER, 2003). Outros óleos comumente empregados na produção de nanoemulsões parenterais foram testados no presente estudo, porém, em nenhum destes foi solubilizada uma grande quantidade de fármaco, sendo que o óleo de rícino e os triglicerídeos de cadeia média (TCM) apresentaram os melhores resultados. Estes foram então escolhidos como fase oleosa das nanoemulsões em estudos subseqüentes. A escolha dos outros excipientes utilizados no preparo das formulações foi feita com base em estudos preliminares, e

uma concentração de 4 % de tensoativo (lecitina de soja ou óleo de rícino polietoxilado) foi estabelecida. De fato, a carbamazepina mostrou-se uma molécula desafiadora, pois além da baixa solubilidade em água, também apresenta baixa solubilidade em óleos. Assim, houve a necessidade de se empregar uma concentração de tensoativo maior que a usualmente descrita em estudos deste tipo, muito embora esta se encontre dentro dos limites estabelecidos pelo FDA (FDA, 2006b) para a via parenteral.

As formulações desenvolvidas contendo 3 mg/ml de CBZ foram consideradas adequadas com relação ao tamanho de gotícula da fase interna, característica principal de uma nanoemulsão parenteral, uma vez que o diâmetro das gotículas de óleo devem ser inferiores a 1µm para serem compatíveis com os vasos sanguíneos (BENITA e LEVY, 1993; FLOYD, 1999). Porém, o aparecimento de precipitados cristalinos de fármaco, após alguns uma semana de armazenamento, inviabilizaria a administração das nanoemulsões pela via intravenosa.

As causas da precipitação do fármaco nas formulações foram investigadas por meio da análise dos cristais empregando-se calorimetria exploratória diferencial, espectroscopia na região do infravermelho e microscopia óptica. Esse conjunto de metodologias permitiu a identificação de um fenômeno de transição polimórfica da carbamazepina, que sugere a associação preferencial do fármaco à interface da gotícula de óleo e, portanto, estando em contato com a fase aquosa, uma vez que é descrito que a forma anidra de carbamazepina (forma β), presente na matéria-prima, transforma-se em diidrato quando exposta a um ambiente aquoso (TIAN *et al.*, 2006).

A partir dos resultados apresentados no primeiro grupo de formulações, foi proposta a redução da concentração de fármaco para 2 mg/ml, um aumento da concentração do tensoativo lipofílico (para 5 %, p/v) e alterações na fase oleosa, utilizando-se o óleo de rícino ou uma mistura deste com TCM (1:1 p/p). A utilização desta mistura de óleos é descrita na literatura (JUMMAA e MÜLLER, 1998; JUMMAA e MÜLLER, 1999) como uma estratégia para a diminuição da viscosidade da formulação assim como para a redução da tensão interfacial da emulsão, o que poderia contribuir para uma maior incorporação de fármaco.

No preparo desse novo grupo de formulações, foi empregado um delineamento fatorial, com o objetivo de avaliar estatisticamente a influência do tipo de fase oleosa (óleo de rícino ou mistura de óleo de rícino com TCM) e tipo de tensoativo lipofílico (lecitina de soja ou óleo de rícino polietoxilado) sobre as características físico-químicas das nanoemulsões (tamanho de gotícula, índice de polidispersidade, potencial zeta, viscosidade, teor de fármaco e taxa de associação às gotículas de óleo).

Para o doseamento das formulações, foi desenvolvida e validada uma metodologia analítica por HPLC. O método mostrou-se, específico, isto é, não há interferência dos excipientes na determinação da carbamazepina, linear ($r^2 = 0,9996$), preciso (DPR = 1,21 %) e exato (recuperação de 99,4 a 102,1 %).

As alterações propostas demonstraram inicialmente que a incorporação de uma menor quantidade de carbamazepina foi viável nas formulações. Todas as nanoemulsões apresentaram tamanho de gotícula adequado, sem diferença significativa ($p \leq 0,05$). O emprego da mistura de óleo de rícino e TCM na composição da fase oleosa das formulações contribuiu para uma significativa diminuição da viscosidade das formulações que continham lecitina de soja como tensoativo. A mesma influência não foi observada para as formulações contendo óleo de rícino polietoxilado.

Após cerca de três meses de armazenamento, precipitados cristalinos puderam ser observados nas formulações e o doseamento destas teve como resultado um decaimento, em média, de 50 % do teor inicial, sendo que as formulações que continham óleo de rícino polietoxilado apresentaram o fenômeno de cremagem.

A formulação mais promissora dentre as quatro desenvolvidas no planejamento fatorial foi a composta pela mistura de óleos e lecitina de soja como tensoativo lipofílico. Esta foi novamente otimizada e caracterizada quanto ao tamanho de gotícula, índice de polidispersidade, potencial zeta e teor de fármaco, e monitorada por três meses. Estudos de microscopia eletrônica de transmissão confirmaram que o tamanho das gotículas da fase interna são compatíveis com a via de administração parenteral e um estudo de liberação *in vitro* demonstrou que a carbamazepina é liberada a partir de um lento processo de difusão, o que é explicado por sua baixa

hidrossolubilidade. Durante o período de três meses de armazenamento, não foram observadas alterações no aspecto externo e nem a precipitação de carbamazepina.

CONCLUSÕES

- Dentre os diferentes óleos utilizados em nanoemulsões parenterais, e que foram testados, a carbamazepina apresenta-se pouco solúvel (<7,0 mg/g). Os dois óleos que promovem uma maior solubilidade do fármaco são: óleo de rícino e TCM;
- A obtenção de nanoemulsões contendo 3mg/ml de carbamazepina não se apresentou viável em função da ocorrência de precipitação do fármaco, fenômeno que teve início após uma semana de armazenamento;
- A precipitação do fármaco foi resultado de uma transição polimórfica da carbamazepina, da forma β , presente na matéria-prima, na forma diidratada;
- Após a otimização das proporções de tensoativo lipofílico, alterações na fase oleosa e a redução da concentração de fármaco para 2 mg/ml foi possível o desenvolvimento de uma formulação estável por um maior período de tempo, porém inferior a três meses;
- A formulação mais promissora, contendo lecitina de soja e a mistura de óleo de rícino de TCM, foi otimizada e permitiu a veiculação de 2,0 mg/ml de carbamazepina numa nanoemulsão estável;

REFERÊNCIAS

ABDEL-HAMID, M.E. Comparative LC-MS and HPLC analyses of selected antiepileptics and beta-blocking drugs. **Farmaco**, v.55, n.2, p.136–145, 2000.

ABROL, S.; TREHAN, A.; KATARE, O.P. Comparative Study of Different Silymarin Formulations: Formulation, Characterisation and In Vitro/In Vivo Evaluation, **Current Drug Delivery**, v.2, p. 45-51, 2005.

AKKAR, A.; MÜLLER, R.H. Formulation of intravenous carbamazepine emulsions by SolEmuls[®] technology. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 55, p. 305-312, 2003a.

AKKAR, A.; MÜLLER, R.H. Intravenous itraconazole emulsions produced by SolEmuls technology, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, n. 1, p. 29-36, 2003b.

ALLEN, L.V.J.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. **Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems**. 8 ed, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia: 2005, 738p.

AL-ZEIN, H.; RIAD, L.E.; ABD-ELBARY, A. Effect of Packaging and Storage on the Stability of Carbamazepine Tablets. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.25, n.2, p.223-227, 1999.

BAKER, M.T.; NAGUIB, M. Propofol: The Challenges of Formulation. **Anesthesiology**, v. 103 p. 860–876, 2005.

BARROS NETO, BENICIO, SCARMINIO, I.S, BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de Experimentos**. Unicamp. Campinas, 1996.

BECIREVIC-LACAN, M.; JUG, M.; BACIC-VRCA, V.; CETINA-CIZMEK, B. Development of o/w emulsion formulation for carbamazepine by using modified cyclodextrins. **Acta Pharmaceutica**, v. 52, p.149-159, 2002.

BENITA, S.; LEVY, M.Y. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 82, p.1069-1079, 1993.

BOUCHEMAL, K., BRIANCON, S., PERRIER, E., FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280 (1-2), p. 241-251, 2004.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Lista de Medicamentos Genéricos Registrados por ordem alfabética**. Disponível em :<<http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/lista/registrados.pdf>>. Acesso em nov. 2006.

BREWSTER, M. E; ANDERSON, W. R; MEINSMA, D.; MORENO, D.; WEBB, A. I.; PABLO, L.; ESTES, K. S.; DERENDORF, H.; BODOR, N.; SAWCHUK, R.; CHEUNG, B.; POP, E. Intravenous and oral pharmacokinetic evaluation of a 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin-based formulation of carbamazepine in the dog: comparison with commercially available tablets and suspensions. **Journal of pharmaceutical sciences**, v.86(3), 335-339, 1997.

BRODIE, M.J.; JOHNSON, F.A Carbamazepina no tratamento das crises epiléticas: eficácia, farmacocinética e perfil de efeitos adversos. **In:** JOHNSON, S.; JOHNSON, F. Neil. **Carbamazepina: uma reavaliação**. São Paulo: Novartis, 1997.p. 9 - 44.

BUTTON, S.T. **Metodologia para planejamento experimental e análise de resultado** (Apostila). Universidade Estadual de Campinas. São Paulo, 2001

CASTELÕES, J. Neurociências – Epilepsia: Tratamento na rede básica receberá investimentos. Com Ciência – **Revista eletrônica de Jornalismo Científico**, v.33, 10 jun. 2002. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/reportagens/epilepsia/ep05.htm>>. Acesso em: 14 jun. 2005.

CLARKE'S Analysis of Drugs and Poisons, London: Pharmaceutical Press. Electronic version, 2006.

COHEN, T.; SAUVAGEON-MARTRE, T.; BROSSARD, D.; HERMIERES, F. D.; BARDIN, C.; CHAST, F.; CHAUMEIL, J.C. Amphotericin B eye drops as a lipidic emulsion, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 137, n. 2, p. 249-254, 1996.

CONSTANTINIDES, P. P.; TUSTIAN, A.; KESSLER, D.R. Tocol emulsions for drug solubilization and parenteral delivery, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 9, p. 1243-1255, 2004.

CONSTANTINIDES, P.P.; LAMBERT, K.J.; TUSTIAN, A.K.; SCHNEIDER, B.; LALJI, S.; MA, W.; WENTZEL, B.; KESSLER, D.; WORAH, D.; QUAY, S.C. Formulation development and antitumor activity of a filter-sterilizable emulsion of paclitaxel. **Pharmaceutical Research**, v. 17, p. 175–182, 2000.

CUI, G.; WANG, L.; DAVIS, P.J.; KARA, M.; LIU, H. Preparation and physical characterization of a novel marine oil emulsion as a potential new formulation vehicle for lipid soluble drugs, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 325, n. 1-2, p.180-185, 2006.

CUNHA JUNIOR, A. S., FIALHO, S. L., CARNEIRO, L. B. et al. Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v.66, n. 3, p.385-391, 2003.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4a ed. Parte 1. São Paulo: Atheneu, 1988.

FLOYD, A.G. Top ten considerations in the development of parenteral emulsions **Pharmaceutical Science Technology**, v. 2, p. 134-143, 1999.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **FDA approved drug products with therapeutic equivalence evaluations**. 25th edition, p. 92-93, 2005. Disponível em <<http://www.fda.gov/cder/orange/obannual.pdf>> . Acesso em : 12 nov. 2006a.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION.FDA, Food and drug administration Inactive Ingredient Database. Disponível em:

<<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm>>.Acesso em 12 nov 2006b.

FRONZA,T.; CAMPOS,A. ; TEIXEIRA,H. Nanoemulsões como Sistemas de Liberação para Fármacos Oftálmicos. **Acta Farmaceutca Bonarense**, v.23, n.4, p. 258-266, 2004.

GAJEWSKA, M., SZNITOWSKA, M., JANICKI, S., Diazepam submicron emulsions containing soybean oil and intended for oral or rectal delivery. **Pharmazie**, v. 56, p. 220–222, 2001.

GARFIELD, F. M. **Quality assurance principles for analytical laboratories**. Arlington, Association of Official Analytical Chemistry International. p 220.

GAVINI, E.; HEGGE, A.B.; RASSU, G.; SANNA, V.; TESTA, C.; PIRISINO, G.; KARLSEN, K.; GIUNCHEDI, P. Nasal administration of Carbamazepine using chitosan microspheres:In vitro/in vivo studies.**International Journal of Pharmaceutics**, v.307, n.1, p.9-15, 2006.

GOSSELIN, P.M., THIBERT, R., PREDA, M. MCMULLEN, J.N. Polymorphic properties of micronized carbamazepine produced by RESS. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 252, p. 225-233, 2003.

HAN, J., SURYANARAYANAN, R. Applications of pressure differential scanning calorimetry in the study of pharmaceutical hydrates: I. Carbamazepine dihydrate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 157,n. 2, p. 209-218, 1997.

HAN, J.; DAVIS, S.S.; PAPANDREOU, C.; MELIA, C.D.; WASHINGTON,C. Design and Evaluation of an Emulsion Vehicle for Paclitaxel I. Physicochemical Properties and Plasma Stability. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 9, 2004.

HARDY, G. Contributions of industry to parenteral nutrition. **Nutrition**, v.19, n. 3, p. 282-284, 2003.

HELLMICH. D.; KOB, A.; DEUBLER, R.; SCHRÖDER, C.; ROSE, P.; ELSÄBER, R.Acute Treatment of Facet Syndrome by CT-Guided Injection of Dexamethasone-21-Palmitate Alone and in Combination With Mepivacaine. **Clinical Drug Investigation**, v. 24, n.10, p.559-567, 2004.

HUNG, C.-F., FANG, C.-L., LIAO, M.-H., FANG, J.-Y. The effect of oil components on the physicochemical properties and drug delivery of emulsions: Tocol emulsion versus lipid emulsion, **International Journal of Pharmaceutics**, *in press*, 2006.

HWANG, S.R.; LIM, S-J.; PARK, J-S; KIM, C-K. Phospholipid-based microemulsion formulation of all-trans-retinoic acid for parenteral administration, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 276, n 1-2, p. 175-183, 2004.

JUMAA, M.; KLEINEBUDDE, P.; MÜLLER, B.W. Mixture experiments with the oil phase of parenteral emulsions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, vol. 46, p. 161–167, 1998.

JUMAA, M.; MÜLLER, B.W. In vitro investigation of the effect of various isotonic substances in parenteral emulsions on human erythrocytes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 2, p. 207-212, 1999.

JUMAA, M.; MÜLLER, B.W. The effect of oil components and homogenization conditions on the physicochemical properties and stability of parenteral fat emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 163, p. 81-89, 1998.

KESSLER, R.J. Lipid emulsions applied to drug delivery. **Lipid Technology Newsletter**, v. 7, n. 3, p. 59-63.

KIBBE, A. H (Ed). **Handbook of Pharmaceutical Excipients**, The Pharmaceutical Press, 3 ed., London and American Pharmaceutical Association, Eletronic version, 2006.

KLANG, S.D.; FRUHT-PERY, J.; HOFFMAN, A.; BENITA, B. Physicochemical characterization and acute toxicity evaluation of a positively-charged submicron emulsion vehicle. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, p. 986-993, 1994.

KOBAYASHI, Y.; ITAI, S.; YAMAMOTO, K.; Physicochemical properties and bioavailability of carbamazepine polymorphs and dehydrate. **International Journal of Pharmaceuticis**, v. 193, p.137-146, 2000.

KOESTER, L.S.; MAYORGA, P.; BASSANI, V.L. Carbamazepine/□CD/HPMC solid dispersions: I. Influence of the spray-drying process and bCD/HPMC on the drug dissolution profile. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 29, n. 2, 139-144, 2003.

KOESTER, L.S.; BERTUOL, J.B.; GROCH, K.R.; XAVIER, C.R.; MOELLERKE, R.;MAYORGA, P.; DALLA COSTA, T.; BASSANI, V. L. Bioavailability of carbamazepine:[beta]-cyclodextrin complex in beagle dogs from hydroxypropylmethylcellulose matrix tablets, **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 22, p. 201-207, 2004.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário terapêutico Guanabara**. Ed. 2004/2005 Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KOROLKOVAS, Andrejus. **Dicionário terapêutico Guanabara**. Ed. 2004/2005 Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Vol. 2. Fundação Calouste Gulbekian, Lisboa, 2001.

LAWRENCE , M.J.; REES, G.D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 45, p.89–121, 2000.

LEVY, M.Y.; BENITA, S. Design and characterization of submicronized o/w emulsion of diazepam for parenteral use. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 54, p. 103-112, 1989.

LEVY, R. H.; LOCKARD, J. S.; GREEN, J. R.; FRIEL, P.; MARTIS, L. Pharmacokinetics of carbamazepine in monkeys following intravenous and oral administration. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 64(2), 302-307, 1975.

LÖSCHER, W.; HOENACK, D. Intravenous carbamazepine: comparison of different parenteral formulations in a mouse model of convulsive status epilepticus. **Epilepsia**, v.38, n.1, p. 106-113, 1997.

LÖSCHER, W.; HONACK, D.; RICHTER, A.; SCHULZ H. U.; SCHURER, M.; DUSING, R.; BREWSTER, M. E. New injectable aqueous carbamazepine solution through complexing with 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: tolerability and pharmacokinetics after intravenous injection in comparison to a glycofurol-based formulation. **Epilepsia**, v. 36, n.3 , 255-61, 1995.

LUND, W. **The pharmaceutical codex: Principles and Practices of Pharmaceutics**. The Pharmaceutical Press, 12 ed. London , 1994.

LUND, W. **The pharmaceutical codex: Principles and Practices of Pharmaceutics**. The Pharmaceutical Press, 12 ed. London , 1994.

LUNDBERG, B.B; RISOVIC, V.; RAMASWAMY, M.; WASAN, K.M. a lipophilic paclitaxel derivative incorporated in a lipid emulsion for parenteral administration, **Journal of Controlled Release**, v. 86, n. 1, p. 93-100, 2003.

MANDRIOLI, R.; ALBANI, F.; CASAMENTI, G.; SABBIONI, C.; RAGGIA, M.A.. Simultaneous high-performance liquid chromatography determination of carbamazepine and five of its metabolites in plasma of epileptic patients. **Journal of Chromatography B**, v. 762, n.2, p.109-116, 2001

MCEVOY, G.K; LITVAK K.; WELSH O.H.(Eds.). **AHFS Drug information**. Bethesda, Md: American Society of Health-Systems Pharmacists, electronic version, em <<http://www.medicinescomplete.com/mc/ahfs/current/>>, acesso em 11.11. 2006.

MCGREGOR, C., SAUNDERS, M. H., BUCKTON, G. , SAKLATVALA, R. D. The use of high-speed differential scanning calorimetry (Hyper-DSC™) to study the thermal properties of carbamazepine polymorphs. **Thermochimica Acta**, v. 417, n. 2 , p. 231-237, 2004.

MCNAMARA, O.J. Drug effective in the therapy of epilepsies. In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. G.; HARDMAN, J. G; LIMBIRD, L. E (ed.). **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 10th ed. New York: McGraw-Hill, 2001. p.533-534.

- MEDINA, J.; SALVADÓ, A.; POZO, A.D. Use of ultrasound to prepare lipid emulsions of lorazepam for intravenous injection. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 216, p. 1-8 , 2001.
- MERISKO-LIVERSIDGE, E., LIVERSIDGE, G.G., COOPER E.R. Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds. **European Journal of pharmaceutical Sciences**, v. 18, p. 113-120, 2003.
- MIZUSHIMA, Y. Lipid microspheres (lipid emulsions) as drug carriers – an overview. **Advanced drug delivery reviews**, v. 20, p.113-115, 1996.
- MULLER, R.H.; KECK, C.M. Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs - a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles, **Journal of Biotechnology**, v. 113, n. 1-3, p.151-170, 2004.
- MÜLLER, R.H.; SCHMIDT, S.; BUTTLE, I.; AKKAR, A.; SCHMITT, J.; BRÖMER, S. SolEmuls[®] - novel technology for the formulation of i.v. emulsions with poorly soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, p. 293-302, 2004.
- MURPHY, D.; RODRÍGUEZ-CINTRÓN, F.; LANGEVIN, B.; KELLY, R.C. AND RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. Solution-mediated phase transformation of anhydrous to dihydrate carbamazepine and the effect of lattice disorder. **International Journal of Pharmaceutics**, 246, p. 121–134, 2002.
- NAKANO, M. Places of emulsions in drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 45, p.1-4, 2000.
- NOKHODCHI, A.; BOLOURTCHIAN, N.; DINARVAND, R. Dissolution and mechanical behaviors of recrystallized carbamazepine from alcohol solution in the presence of additives. **Journal of Crystal Growth**, v. 274, n. 3-4, p.573-584, 2005.
- OLIVEIRA, A.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A. Microemulsions: structure and application as drug delivery systems. **Química Nova**, v.27, n. 1, p.131-138, 2004.

PARK, K. LEE, M.; HWANG, K.; KIM, C. Phospholipid-based microemulsions of flurbiprofen by the spontaneous emulsification process, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 183, n. 2, p.145-154, 1999.

PHADNIS, N.V.; CAVATUR, R.K.; SURYANARAYANAN, R. Identification of drugs in pharmaceutical dosage forms by X-ray powder diffractometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15 , p. 929–943,1997.

POUTON, C.W. Formulation of self-emulsifying drug delivery systems. **Advanced drug delivery reviews**, v. 25, p.47-58, 1997.

PRINDERRE, P.; PICCERELLE, P.H.; CAUTURE, E.; KALANTZIS, G.; REYNIER J.P.; JOACHIM, J. Formulation and evaluation of o:w emulsions using experimental design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 163, p.73–79, 1998.

RUSTICHELLI, C.; GAMBERINI, G.; FERIOLI, V.; GAMBERINI, M. C.; FICARRA, R.; TOMMASINI, S. Solid-state study of polymorphic drugs: carbamazepine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 23, n.1, p. 41-54, 2000.

SADURNÍ, N.; SOLANS, C.; AZEMAR, N.; GARCÍA-CELMA, M. J. Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, n. 5, p. 438-445, 2005.

SANDER, J.W; SHORVON S.D. Epidemiology of the epilepsies. **Journal of Neurology Neurosurgery & Psychiatry**, v. 61,p. 433-443,1996.

SARIS, L.A., BREKELMANS, G.J.F.; VAN DER LINDEN, G.J.; RADEMAKER, R.V.; EDELBROEK, P.M. High-performance liquid chromatographic determination of carbamazepine and metabolites in human hair. **Journal of Chromatography B**, v. 691, n.2, p.409-415,1997 .

SEKI, J.; SONOKE, S., SAHEKI, A.;FUKUI, H.; SASAKI H.; MAYUMI, T. A nanometer lipid emulsion, lipid nano-sphere (LNS), as a parenteral drug carrier for

passive drug targeting. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 273, p.75–83, 2004.

SETHIA, S.; SQUILLANTE, E. Physicochemical characterization of solid dispersions of carbamazepine formulated by supercritical carbon dioxide and conventional solvent evaporation method. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 9, p. 1948-1957, 2002.

STEULET, A. F.; SCHMUTZ, M.; MAITRE, L.; BERNASCONI, R.; STAHL, P. H. **Intravenous carbamazepine solutions with quick action onset**. European Patent Application 14 pp, 1990.

STRICKLEY, R.G. Solubilizing Excipients in Oral and Injectable Formulations. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 2, 2004.

STRICKLEY, R.G.; ANDERSON, B.D. Solubilization and Stabilization of an Anti-HIV Thiocarbamate, NSC 629243, for Parenteral Delivery, Using Extemporaneous Emulsions. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 7, p. 1076-1082, 1993.

SURYANARAYANAN, R.; WIEDMANN T.S. Quantitation of the relative amounts of anhydrous carbamazepine ($C_{15}H_{12}N_2O$) and carbamazepine dihydrate ($C_{15}H_{12}N_2O \cdot 2H_2O$) in a mixture by solid-state nuclear magnetic resonance (NMR). **Pharmaceutical Research**, v.7, n. 2, p. 184-187, 1990.

SWEETMAN, S.C. (Ed), **Martindale: The Complete Drug Reference**. London: Pharmaceutical Press. Electronic version, em:
<<http://www.medicinescomplete.com/mc/martindale/current/>> acesso em 01.11.2006.

SZNITOWSKA, M.; JANICKI, S.; DABROWSKA, E.; ZUROWSKA-PRYCZKOWSKA, K. Submicron emulsions as drug carriers: Studies on destabilization potential of various drugs. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v. 12, p. 175-179, 2001.

TAMILVANAN, S. Oil-in-water lipid emulsions: implications for parenteral and ocular delivering systems. **Progress in Lipid Research**, v. 43, p. 489–533, 2004.

TAMILVANAN, S; BENITA, S. The potential of lipid emulsion for ocular delivery of lipophilic drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 357-368, 2004.

TAUBOLL, E.; LINDSTRÖM, S.; KLEM, W.; GJERSTAD, L. A new injectable carbamazepine solution – antiepileptic effects and pharmaceutical properties. **Epilepsy Research**, v. 7, p. 59-64, 1990.

TIJIE, A.J; VERWEIJ, J.; LOOS, W. J.; SPARREBOOM, A. Pharmacological Effects of Formulation Vehicles: Implications for Cancer Chemotherapy. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 42, n. 7, p. 665-685, 2003.

USP28/NF23. **United States Pharmacopeia & National Formulary**. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2005.

WABEL, C. **Influence of lecithin on structure and stability of parenteral fat emulsions**. Dissertação Friedrich Alexander university.

WANG, J-J; SUNG, K.C.; HU, O. Y-P.; YEH, C-H; FANG, J-Y. Submicron lipid emulsion as a drug delivery system for nalbuphine and its prodrugs, **Journal of Controlled Release**, Volume 115, Issue 2, , 10 October 2006, Pages 140-149.

WERKEMA, M.C.C. **Planejamento e análise de experimentos: como identificar e avaliar as principais variáveis influentes em um processo**. Belo Horizonte: Fundação Christiano Ottoni, 1996. p.143-184.

WHO, World Health Organization. Model Formulary. United Kingdom, 2002.

WRETLIND, A. Development of Fat Emulsions. **Nutrition**, v.15, n.7-8, p. 641 645, 1999.

WU, W.; WANG, Y.; QUE, L. Enhanced bioavailability of silymarin by self-microemulsifying drug delivery system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, p. 288–294, 2006.

YALIN, M; ÖNER, F.; ÖNER, L.; HINCAL, A.A. Preparation and properties of a stable intravenous lorazepam emulsion. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 22, n. 1, p. 39-44, 1997.

YOSHIDA, T.; IMAI, K.; MOTOHASHI, S.; HAMANO, S.; SATO, M. Simultaneous determination of zonisamide, carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide in infant serum by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n.4, p.1386-90

YU, W., TABOSA DO EGITO, E.S., BARRAT, G., FESSI, J.P., DEVISSAGUET, J.P. AND PUISIEUX, F. A novel approach to the preparation of injectable emulsions by spontaneous emulsification process. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 89 , p. 39–146, 1993.

YUAN, X.; JUN, H.W.; MCCALL, J.W. Determination of Carbamazepine in Uncoated and Film-Coated Tablets by HPLC with UV Detection. **Analytical Letters**, v.36, n.6, p.197-121, 2003.

ANEXO I: CARACTERIZAÇÃO DA CARBAMAZEPINA UTILIZADA COMO MATÉRIA-PRIMA

METODOLOGIA

Os testes de identificação para a CBZ (Herifarma, São Paulo, Brasil) foram realizados conforme descrito na Farmacopéia Norte-Americana (USP 28/NF 23, 2005) e Farmacopéia Brasileira 4ª edição (2000) utilizando como substância química que referência CBZ fornecida pela empresa Sigma-Aldrich sob número de produto C4024.

Espectroscopia na região do infravermelho

O espectro de absorção na região do infravermelho da carbamazepina foi obtido em espectrofotômetro Shimadzu (IR Prestige 21), com pastilha de 10 mg de amostra em 100 mg de brometo de potássio (USP,2005).

Espectroscopia na região do ultravioleta (UV)

Foi preparada uma solução 0,001% (p/v) em etanol.O espectro de absorção no UV foi obtido na região entre 200 a 400 nm em espectrofotômetro Varian (Cary 50). Empregou-se cubetas de quartzo de 1 cm de percurso óptico utilizando etanol como branco (Farmacopéia Brasileira, 2000).

Identificação por difração de raios X

O teste para identificação da forma cristalina da carbamazepina por difração de raios-X foi realizado em difratrômetro de marca Philips modelo X 'Pert utilizando-se radiação $\text{CuK}\alpha_1$ ($\gamma = 1.54056 \text{ \AA}$), operando em 40 kV e 30 mA (USP,2005).

Identificação colorimétrica

Cerca de 0,1g de carbamazepina foi adicionado a 2 ml de ácido nítrico e levados a banho maria por 3 minutos até o aparecimento de cor (Farmacopéia Brasileira, 2000).

Perda por dessecação

Pesa-filtros (\varnothing 52 mm x 48 mm) previamente dessecados e tarados foram adicionados de exatamente cerca de 0,5 g de carbamazepina. As amostras foram colocadas em estufa por duas horas. Os resultados de três determinações foram analisados e a média foi expressa em porcentagem (Farmacoéia Brasileira, 2000).

Determinação do ponto de fusão

Uma pequena quantidade de carbamazepina foi colocada em aparelho de ponto de fusão Microquímica (MQAPF-301). A amostra foi aquecida sob razão de aquecimento de 5 °C por minuto até a completa fusão (USP, 2005).

Determinação da pureza

Exatamente 50 mg de carbamazepina foram diluídas em metanol para um volume final de 50 ml. Diluições sucessivas foram realizadas até a obtenção de uma solução de concentração de 0,001 %. Uma solução padrão, de mesma concentração, foi preparada. As absorvâncias das duas soluções resultantes foram medidas em comprimento de onda de 285 nm, utilizando-se metanol como branco e cubetas de quartzo com percurso óptico de 1 cm e o teor de $C_{15}H_{12}N_2O$ foi calculado a partir das leituras obtidas (Farmacoéia Brasileira, 2000).

Caracterização termoanalítica

A caracterização termoanalítica da carbamazepina foi realizada por termogravimetria em célula TGA-50 (Shimadzu), sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 ml/ min), razão de aquecimento de, 10 °C/min, em cadinho de Pt contendo massa de amostra de aproximadamente cerca de 4 mg , e por calorimetria exploratória diferencial em célula DSC-60 (Shimadzu), sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 ml/ min), razão de aquecimento de 10 °C/min e utilizando cadinho de alumínio, contendo aproximadamente cerca de 2 mg de amostra.

RESULTADOS

Alguns resultados obtidos para a caracterização da carbamazepina foram agrupados e podem ser visualizados na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados para caracterização da carbamazepina

Teste	Especificações	Resultados
Identificação colorimétrica	Desenvolvimento de coloração vermelho-alaranjado	De acordo
Perda por dessecação	Máximo 0,5 % (p/p)	0,002%
Ponto de fusão	189 - 193 °C	190,1 – 192,3 °C
Pureza	98 - 102 %	99,1%

Espectroscopia na região do infravermelho

A carbamazepina pode ser caracterizada por diferentes bandas. A banda localizada em 3464 cm^{-1} representa o grupamento N-H da carbamazepina e caracteriza o fármaco como sendo a forma β . Outras bandas localizadas em 1678 cm^{-1} (C=O), 1593 cm^{-1} (C=C), 3157 cm^{-1} e 1487 cm^{-1} (C-H) foram observadas, conforme pode ser visualizado na figura 1

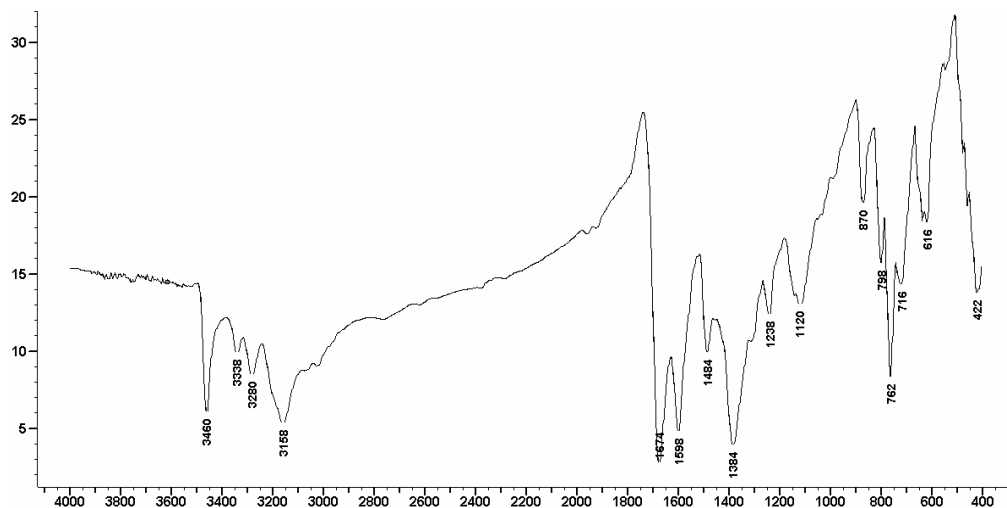


Figura 1. Espectro de absorção da CBZ no infravermelho

Espectroscopia na região do ultravioleta

O máximo de absorção pôde ser observado em 284,9 nm, identificando o fármaco por esta metodologia, conforme preconiza a F. Bras. IV (2000).

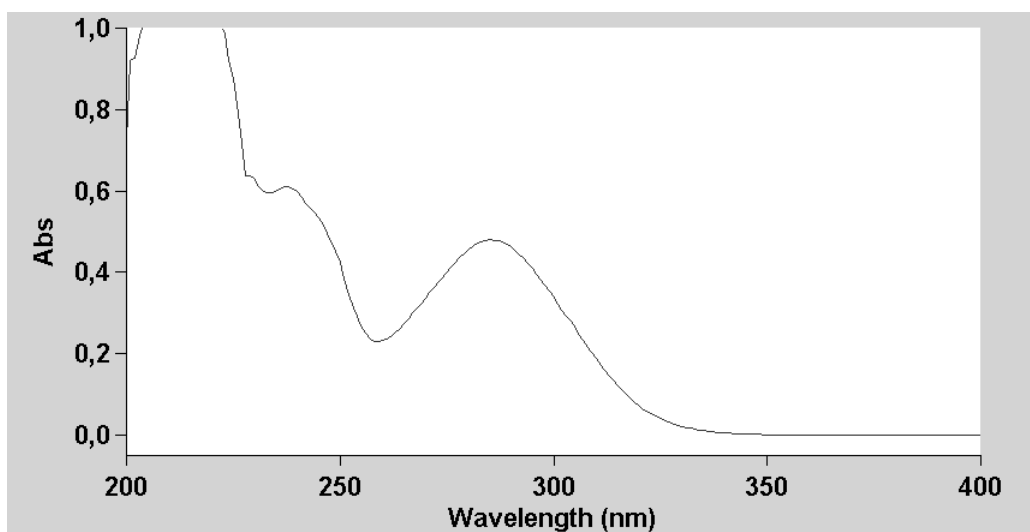


Figura 2. Espectro de absorção da CBZ na região do ultravioleta

Identificação por difração de raios X

As características do gráfico e as intensidades relativas, principalmente em $7,6\theta$ (95,4%), demonstradas na tabela 6, caracterizam o fármaco como sendo o polimorfo β da carbamazepina (Katzhendler *et al.*, 1998 and Rustichelli *et al.*, 2000).

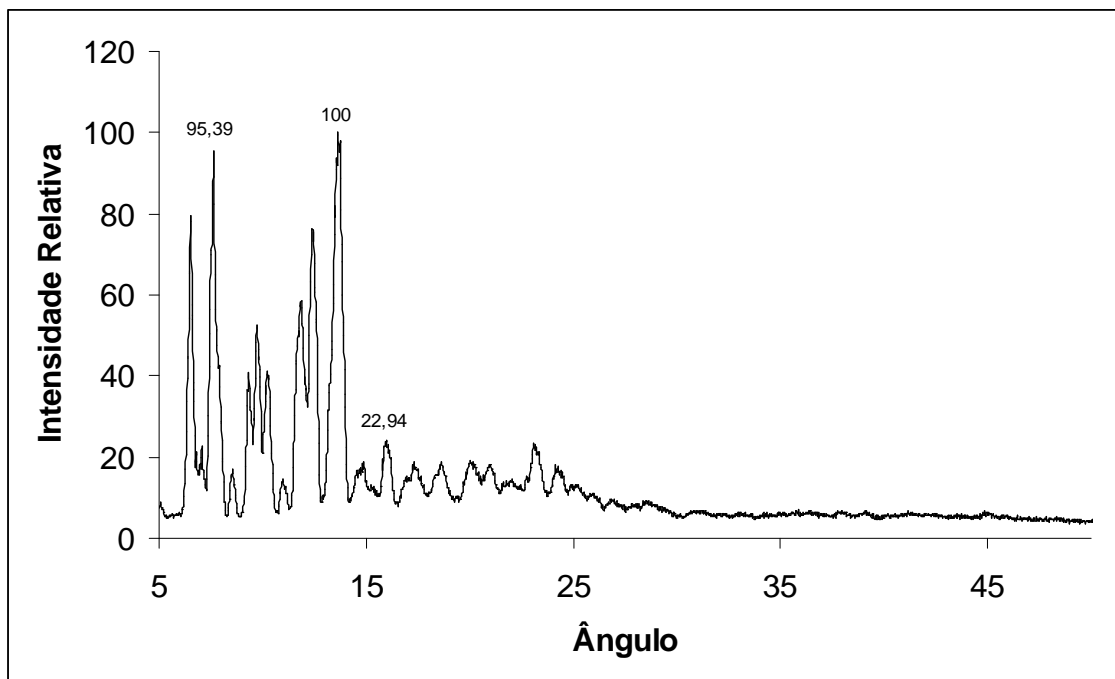


Figura 3: Gráfico representativo da análise de difração de raios X

Tabela 2: Intensidades relativas nos diferentes ângulos para difração de raios X

Theta (ângulo)	Intensidade Relativa (%)
7,5	56,4
7,6	95,4
13,6	99,2
13,6	100,0
13,7	97,7
16,0	22,94

Caracterização termoanalítica

A curva TG/DTG (Figura 4) revelou que o fármaco é termo-estável até próximo de 210 °C. Entre 220 e 366 °C, há dois eventos de perda de massa de aproximadamente 91,5% e 6,3% respectivamente.

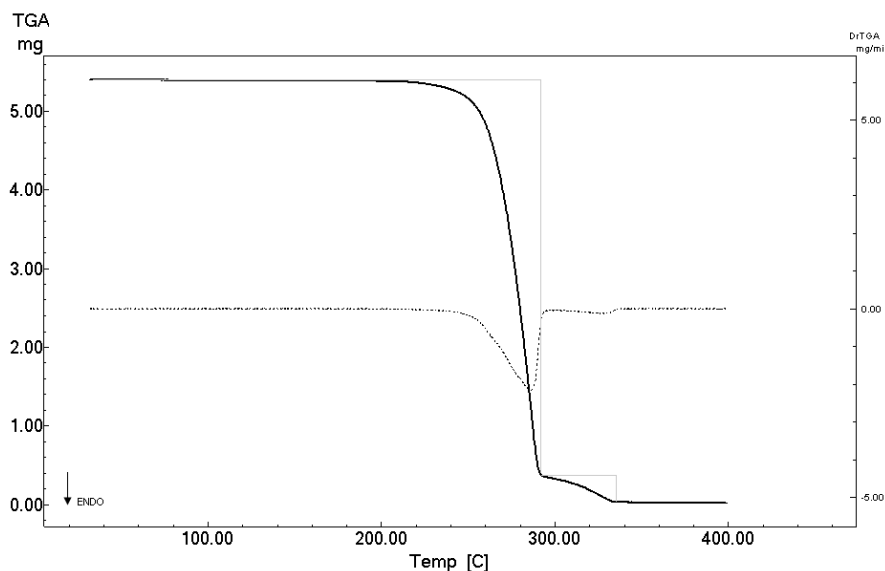


Figura 4: Curva TG da carbamazepina e atmosfera dinâmica de N₂ e razão de aquecimento de 10 °C/min

A curva DSC (Figura 5) não mostrou variação entálpica até aproximadamente a temperatura de 170 °C. Entre 173,06 e 176,13 °C observa-se um evento endotérmico que, segundo descrito na literatura, corresponde a fusão da forma polimórfica β , seguido por outro evento exotérmico que caracteriza a recristalização da amostra como forma α . Um terceiro evento ocorre entre 188,94 °C e 192,79 °C, característico da fusão do fármaco. A decomposição do fármaco é evidenciada após a fusão, em aproximadamente 210 °C, confirmando o que foi demonstrado pela análise termogravimétrica. O perfil encontrado para a carbamazepina é semelhante aos resultados descritos na literatura para a caracterização da forma polimórfica β da carbamazepina (RUSTICHELLI *et al.*, 2000; GAVINI *et al.*, 2006), e a decomposição do fármaco é evidenciada após a fusão, em aproximadamente 210 °C, confirmando o que foi demonstrado pela análise termogravimétrica.

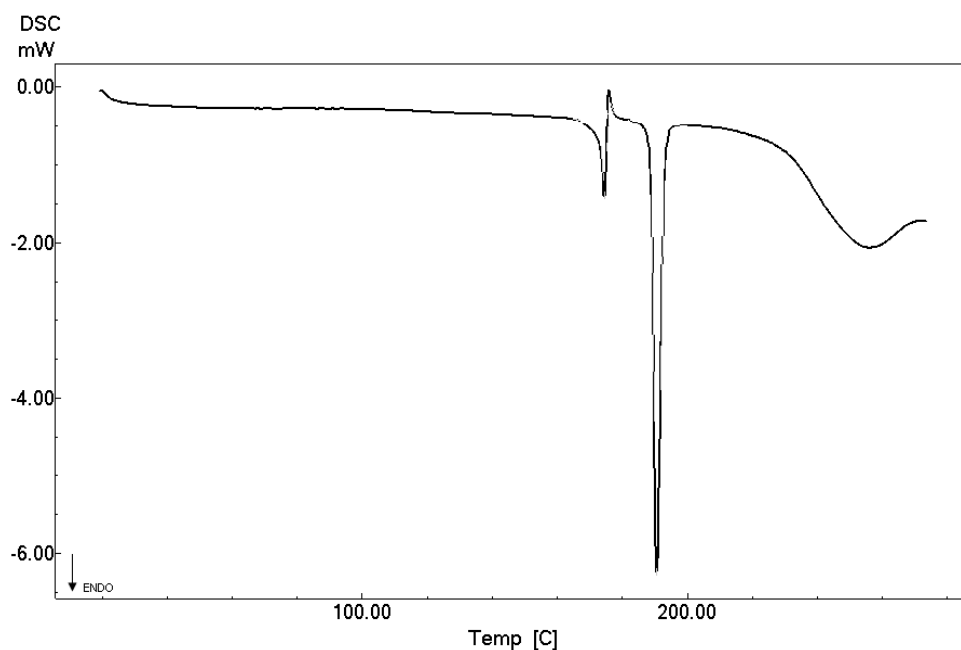


Figura 5: Curva DSC da carbamazepina

CONCLUSÃO

Diante dos resultados encontrados em todos os testes de caracterização da matéria-prima, o fármaco foi considerado de acordo com os parâmetros estabelecidos pelos compêndios oficiais e literaturas científicas pesquisadas e a forma polimórfica encontrada é a forma β , preconizada pela Farmacopéia Americana (PHADNIS *et al.*, 1997; GOSSELIN *et al.*, 2003)

**ANEXO II: DOCUMENTOS COMPROBATÓRIOS DA SUBMISSÃO DOS
ARTIGOS ÀS RESPECTIVAS REVISTAS CIENTÍFICAS**

**ARTIGO SUBMETIDO Á DRUG DEVELOPMENT AND INDUSTRIAL
PHARMACY**

De: DDC [mailto:DDC@submit.taylorandfrancis.com]

Enviada em: segunda-feira, 5 de fevereiro de 2007 18:18

Para: leticiaakoester@gmx.net

Assunto: Drug Development and Industrial Pharmacy - Confirmation of Receipt of Email.

Drug Development and Industrial Pharmacy - Confirmation of Receipt of Email.

You are receiving this email response because you have just submitted a document/message to the Editor and/or Associate Editor of Drug Development and Industrial Pharmacy.

This email address serves as a portal to receive our electronic documents.

The following documents should be sent to this email address:

1. New manuscript submissions, sent as one document saved in either MS Word or as a PDF document. The corresponding author's email address must be listed in the manuscript;
2. Reviewer's comments on manuscripts being considered for publication;
3. Final revisions of accepted manuscripts.

Please do not hesitate to contact me should you have any questions regarding your manuscript.

Sincerely,

Robert O. (Bill) Williams III, Ph.D.

Editor-in-Chief

Johnson & Johnson Centennial Professor of Pharmaceutics

College of Pharmacy

University of Texas at Austin

williro@mail.utexas.edu

ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA CHROMATOGRAPHIA

De: Chromatographia [mailto:chromatographia@vieweg.de]

Enviada em: segunda-feira, 27 de novembro de 2006 13:34

Para: leticiaakoester@gmx.net

Assunto: *** Chromatographia: Submission Confirmation for Determination of carbamazepine in parenteral nanoemulsions: Development and validation of a HPLC method

Dear Mrs. Koester,

Your submission entitled "Determination of carbamazepine in parenteral nanoemulsions: Development and validation of a HPLC method" has been received by the journal Chromatographia.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://chro.edmgr.com/>.

Your manuscript will be handled administratively and a reference number assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Editorial Office
CHROMATOGRAPHIA

ARTIGO SUBMETIDO AO INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMCEUTICAL SCIENCES

De: International Journal of Pharmaceutics [mailto:ijp@elsevier.com]

Enviada em: segunda-feira, 27 de novembro de 2006 10:57

Para: leticiaakoester@gmx.net

Assunto: Submission Confirmation

Dear Dr. Koester,

Your submission entitled "Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process" has been received by International Journal of Pharmaceutics

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/ijp/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
International Journal of Pharmaceutics

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)