

CLÁUDIO FUSARO

**ESTUDO DA FONOFORESE DE DICLOFENACO DIETILAMÔNIO EM
VOLUNTÁRIOS SADIOS**

CAMPINAS

2005

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

F985e Fusaro, Cláudio
 Estudo da fonoforese de diclofenaco dietilamônio em voluntários
 sadios / Cláudio Fusaro. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : José Pedrazzoli Júnior
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Fonoforese. 2. Ultra-som. 3. Administração Tópica. 4.
Anitiinflamatórios. I. Pedrazzoli Júnior, José. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em ingles: Study of diclofenac diethylammonium phonophoresis in healthy human volunteers

Keywords: • Phonophoresis
 • Ultrasound
 • Topical administration

Titulação: Mestrado

Banca examinadora: Prof Dr José Pedrazzoli Júnior

Prof Dr Eduardo Abib Júnior

Profa. Dra. Silvana Aparecida Calafatti

Data da defesa: 31/01/2006

CLÁUDIO FUSARO

**ESTUDO DA FONOFORESE DE DICLOFENACO DIETILAMÔNIO EM
VOLUNTÁRIOS SADIOS**

**Tese apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Mestre em
Farmacologia.**

Orientador: Prof. Dr. José Pedrazzoli Jr.

CAMPINAS

2005

Banca Examinadora da Tese de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. José Pedrazzoli Jr.

Membros Titulares:

Prof. Dr. Eduardo Abib Jr.

Prof. Dra. Silvana Aparecida Calafatti

Membros Suplentes:

Prof. Dra. Elaine Minatel

Prof. Dra. Elaine Cristina Leite Pereira

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 31/01/2006

“Não foi de um salto que os grandes homens chegaram às culminâncias do êxito, mas sim trabalhando e velando enquanto os outros dormiam.”

(James Allen)

DEDICATÓRIA

“À minha esposa Maria Cláudia e
aos meus filhos que virão.”

AGRADECIMENTOS

A Deus, que permite diariamente minha evolução neste mundo me amparando em seus braços diante de cada dificuldade, e que diante de tantas falhas e retrocessos, ainda assim concede sempre seu perdão e confia sua equipe fabulosa para me fazer sempre trilhar o caminho correto.

À minha esposa Maria Cláudia pela dedicação constante às nossas vidas, ao convívio de harmonia mesmo diante de condições adversas, pela colaboração imensa a todas as etapas deste projeto, sem a qual não haveria condição de se concretizar este trabalho.

Ao Prof. Dr. José Pedrazzoli Jr. por ter me possibilitado o mestrado e pela imprescindível disponibilização de todos os recursos necessários para a execução da etapa clínica e de análise das amostras.

Ao amigo Marco Antônio Maya Marchioretto, por ter sido o responsável pelo início do mestrado e do projeto e pelo auxílio valioso na construção e execução da etapa clínica.

Aos amigos Eduardo, Fábio e Daniel pela colaboração técnica de significado essencial para a melhor compreensão dos detalhes a serem abordados na discussão do trabalho e aos demais integrantes da equipe da Unifag, em especial a funcionária Maristela pelo apoio em todas as fases do projeto e à

funcionária Adriana pela tranquilidade e paciência durante as explicações sobre o HPLC e execução da análise das amostras.

A Prof^a Dr^a Silvana pela tranquilidade suave com que auxiliou em momentos cruciais deste trabalho.

À Maria Cândida pelo competente apoio técnico de tradução durante a execução da parte final do trabalho.

À Prof^a Luciana Parada que flexibilizou diversas vezes meus horários de trabalho, em especial aos colegas Rafael e Elaine, pelas indicações para a banca de dissertação, e aos demais colegas de trabalho da Universidade São Francisco que compreenderam muitas vezes os momentos de dificuldade e me auxiliaram como puderam.

Aos meus pais Michelangelo e Júlia e a Vera Lúcia e Edmilson pela constante vibração e sua torcida pela vitória do dia-a-dia

SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	15
3. CAPÍTULO.....	16
4. DISCUSSÃO GERAL.....	34
5. CONCLUSÃO.....	38
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
7. ANEXO.....	45

RESUMO

O transporte transdérmico de substâncias com o ultra-som terapêutico, método denominado fonoforese, oferece muitas vantagens quando comparado as outras vias de administração de drogas. O objetivo deste estudo foi verificar a influência do ultra-som na absorção de diclofenaco dietilamônio (Cataflam Emulgel[®], Novartis) após fonoforese em voluntários sadios. Doze voluntários sadios foram submetidos à aplicação tópica de Cataflam Emulgel[®] em uma área de 150cm² na região do dorso. No grupo controle os voluntários receberam a aplicação tópica sem emissão de ultra-som (sham) e o grupo teste recebeu a aplicação tópica através da fonoforese. A concentração plasmática de diclofenaco foi mensurada pelo HPLC (high performance liquid chromatography) durante um período de 8h após as aplicações. Neste trabalho demonstramos que a aplicação transdérmica de diclofenaco dietilamônio pela fonoforese, em uma única aplicação, não induz aumento da concentração plasmática quando comparada a aplicação sem ultra-som.

Palavras-chave: Fonoforese, ultra-som terapêutico, diclofenaco dietilamônio, Drogas antiinflamatórias não-esteroidais, drogas aplicadas topicamente, concentração plasmática, HPLC, voluntários humanos.

ABSTRACT

Transdermal drug delivery with therapeutic ultrasound, method called phonophoresis, offers many advantages when compared to other drug delivery methods. The aim of this study was to verify the influence of ultrasound on the transdermal delivery of diclofenac diethylammonium (Cataflam Emulgel[®], Novartis) post phonophoresis in healthy volunteers. Twelve healthy human volunteers were submitted to topical application of Cataflam Emulgel[®] on 150cm² area on the dorsum. In the Control Group, the volunteers received topical application with the ultrasound switched off and the Test Group received topical application by phonophoresis. The diclofenac plasma concentration was measured by high performance liquid chromatography (HPLC) during a period of 8h after dosing. We provided evidence that transdermal application of diclofenac diethylammonium by phonophoresis, in a single dose, has not induced plasmatic concentration increase when compared to topical application alone.

Keywords: Phonophoresis, therapeutic ultrasound, diclofenac diethylammonium, non-steroidal anti-inflammatory drugs, transdermal delivery, topical applied drugs, plasma concentration, high performance liquid chromatography, human volunteers.

1. INTRODUÇÃO

Fonoforese é um método fisioterapêutico de associação do ultra-som terapêutico a substâncias farmacológicas com o objetivo de facilitar o transporte transdérmico dessas substâncias integrada aos efeitos benéficos do ultra-som (Bommannan *et al.* 1992).

O ultra-som vem sendo empregado como recurso terapêutico desde a metade do século passado (Ramirez *et al.* 1997) e atualmente é um dos recursos eletroterápicos mais utilizados pela fisioterapia. Na Inglaterra mais de 50% dos tratamentos fisioterapêuticos utilizam o ultra-som (ter Haar *et al.* 1987); nos Estados Unidos, estima-se mais de 15 milhões de tratamentos fisioterapêuticos com ultra-som por ano (Naslund 2001) e na Austrália, 84% de uma amostra de 171 fisioterapeutas utilizam o ultra-som diariamente (Warden e McMeeken 2002).

O ultra-som terapêutico tem vasta aplicação na medicina esportiva e na fisioterapia principalmente para condições traumáticas do sistema locomotor (Mitragotri *et al.* 1995; Mitragotri *et al.* 1996; Rosim *et al.* 2005). Alguns de seus efeitos benéficos podem ser observados durante o reparo de lesões tendinosas (Jackson *et al.* 1991; Gan *et al.* 1995; da Cunha *et al.* 2001) e musculares (Menezes *et al.*, 1999), na cicatrização de úlceras varicosas (Dyson e Suckling 1978) e durante a regeneração das fibras nervosas periféricas (Hong *et al.* 1988).

Os efeitos terapêuticos do ultra-som como fonoforese são obtidos por meio de mecanismos térmicos e não-térmicos. Os térmicos decorrem da transferência de energia a partir da compressão de ondas vibratórias geradas nos tecidos irradiados (Mitragotri *et al.* 1995). Nas aplicações transdérmicas, essa energia é absorvida pela pele e resulta no

aumento da sua temperatura (Mitragotri et al. 1995; Cagnie et al. 2003). Outros estudos demonstram que, na promoção do aumento da absorção de drogas através da pele, o fenômeno de cavitação é mais importante do que os efeitos térmicos (Merino et al. 2003). A cavitação, produzida pelo efeito não-térmico do ultra-som, gera microbolhas gasosas na camada mais externa da pele (estrato córneo), que podem se romper violentamente, facilitando, assim, a passagem transdérmica da droga (Fang et al. 1999; Miller 2000). Estudos demonstram que a cavitação também pode promover uma desorganização da região lipídica da camada córnea e aumentar a sua permeabilidade (Mitragotri et al. 1995; Ueda et al. 1996; Fang et al. 1999).

O modo de emissão das ondas acústicas do equipamento pode ser decisiva para a deposição da droga pretendida. Preconiza-se o regime contínuo de emissão em razão da otimização do tempo de interação do ultra-som com a droga e o tecido (Cameron e Monroe 1992). Ocorre um aumento linear nos coeficientes de absorção e atenuação dos tecidos com o aumento da frequência da onda, ou seja, quanto maior a frequência, mais eficaz será a absorção de energia (Parizotto et al. 2003). Uma variedade de frequências de transdutores tem sido encontrada na literatura, por exemplo: muito alta: 15 MHz (Byl et al. 1993), alta: 1 à 3 MHz (Mitragotri et al. 1995), baixa: 150 KHz (Ueda et al. 1996), e muito baixa: 20 KHz (Tezel et al. 2004). Apesar de alguns trabalhos demonstrarem a eficiência da fonoforese utilizando aparelhos de frequência muito baixa (Fang et al. 1999; Weimann e Wu 2002; Merino et al. 2003; Tezel et al. 2004), em todos, o estudo foi realizado *in vitro*, enquanto que a maior parte dos estudos *in vivo*, com resultados eficazes, utilizaram a fonoforese com alta frequência (Cagnie et al. 2003; Koeke et al. 2005; Rosim et al. 2005).

Além disso, os aparelhos disponibilizados pelas indústrias brasileiras e viabilizados para uso terapêutico são os que se classificam como aparelhos de alta frequência.

A via transdérmica, quando possível de ser utilizada, oferece vantagens sobre as vias tradicionais pela ação direta dos medicamentos na área afetada (Muller et al. 1997; Machet e Boucaud 2002), ausência de degradação pelo trato digestivo, o que evita efeitos colaterais associados ao metabolismo gastrointestinal, normalmente relacionados à administração por via oral, além de eliminar por completo a dor e o medo (Wu et al. 1998; Joshi e Raje 2002). Portanto, a via transdérmica associada ao ultra-som terapêutico representa uma otimização no método, uma vez que recentes estudos demonstram que a fonoforese induz uma maior absorção de diferentes substâncias pela pele do que quando comparada à aplicação tópica sem ultra-som. Estudos *in vitro* verificaram que a fonoforese com a aplicação tópica de oligonucleotídeos anti-sense (ODN) (Tezel et al. 2004), glucose e manitol (Merino et al. 2003), clobetasol 17-propionato (Fang et al. 1999), macromoléculas (Weimann e Wu 2002) além de substâncias lipofílicas e hidrofílicas (Ueda et al. 1996) na pele de diferentes espécies de animais induziu a um aumento de permeabilidade dessas substâncias (Tezel et al. 2004). Os estudos *in vivo* obtiveram resultados semelhantes. A fonoforese com aplicação tópica de hidrocortisona 10% sobre a pata de ratos tenotomizados foi mais efetiva na reparação tecidual e no transporte transdérmico da droga quando comparada aos grupos controle (Koeke et al. 2005). Cagnie et al. (2003) demonstraram que a associação de ultra-som ao cetoprofeno tópico no joelho de voluntários induziu a uma maior concentração do fármaco no tecido irradiado do que quando comparada aos grupos controle. Esse aumento da concentração dos fármacos pelo uso do ultra-som é evidenciado nos tecidos moles imediatamente abaixo do local de

aplicação, não sendo, no entanto, acompanhado por um aumento proporcional da biodisponibilidade plasmática (Tezel et al. 2004).

O diclofenaco é um anti-inflamatório não-esteroidal (AINES) e uma das substâncias comumente utilizadas na fisioterapia com a fonoforese na formulação gel, bem como na prática da medicina esportiva para o tratamento de processos algicos e inflamatórios das articulações e dos tecidos moles (Escribano et al. 2003; Rosim et al. 2005). O mecanismo de ação dos AINES resulta da inibição da ciclooxigenase-2 (COX-2) no foco inflamatório, entretanto, muitas dessas drogas inibem a ciclooxigenase-1 (COX-1) da mucosa gástrica, resultando em danos na mesma (Mitchell e Warner, 1999).

Em suma, uma vez que diversos estudos sugerem que existam vantagens da fonoforese sobre a aplicação tópica de fármacos e há poucos estudos sobre a concentração sistêmica de diclofenaco após a irradiação de ultra-som, o objetivo deste estudo foi verificar a concentração sistêmica de diclofenaco após a fonoforese com diclofenaco dietilamônio no dorso de voluntários sadios pelo HPLC (high performance liquid chromatography).

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi verificar a concentração sistêmica de diclofenaco após a fonoforese com diclofenaco dietilamônio no dorso de voluntários sadios pelo HPLC (high performance liquid chromatography).

3. CAPÍTULO

O presente artigo foi submetido ao periódico “Ultrasound in Medicine and Biology” e se encontra sob avaliação (Anexo).

Study of diclofenac diethylammonium phonophoresis in health human volunteers

Cláudio Fusaro^{1*}

Maria Cláudia Oliveira²

Marco Antônio Maya Marchioretto¹

José Pedrazzoli Junior¹

¹ Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, São Paulo/Brazil;

² Department of Physiology, Faculty of Dentistry of Piracicaba, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, São Paulo/Brazil.

* Corresponding author:

Washington Luis Av, 2900 apto 91-I, Zip code: 13042-902, Campinas – SP – Brazil

Phone number: 55 19 81110386

E-mail address: claufus@directnet.com.br (C. Fusaro)

Category: Original Contribution

Running title: Fusaro et al

Study of diclofenac diethylammonium phonophoresis in health human volunteers

Abstract

Transdermal drug delivery with therapeutic ultrasound, method called phonophoresis, offers many advantages when compared to other drug delivery methods. The aim of this study was to verify the influence of ultrasound on the transdermal delivery of diclofenac diethylammonium (Cataflam Emulgel[®], Novartis) post phonophoresis in healthy volunteers. Twelve healthy human volunteers were submitted to topical application of Cataflam Emulgel[®] on 150cm² area on the dorsum. In the Control Group, the volunteers received topical application with the ultrasound switched off and the Test Group received topical application by phonophoresis. The diclofenac plasma concentration was measured by high performance liquid chromatography (HPLC) during a period of 8h after dosing. We provided evidence that transdermal application of diclofenac diethylammonium by phonophoresis, in a single dose, has not induced plasmatic concentration increase when compared to topical application alone.

Keywords: Phonophoresis, therapeutic ultrasound, diclofenac diethylammonium, non-steroidal anti-inflammatory drugs, transdermal delivery, topical applied drugs, plasma concentration, high performance liquid chromatography, human volunteers.

Introduction and Literature

Phonophoresis is a physiotherapy method of treatment that associates therapeutic ultrasound and topically applied drugs with the aim of facilitating transdermal delivery of these drugs integrated with beneficial effects of therapeutic ultrasound (Bommannan et al. 1992).

Ultrasound therapy has been used by Physiotherapy and sports medicine for the treatment of a great variety of locomotor system disorders (Mitragotri et al. 1995, 1996; 2000), specially for tendon (da Cunha 2000; Gan 1995; Jackson 1991) and muscle repair (Menezes et al., 1999), varicose ulcer healing (Dyson and Suckling 1978) and peripheral nerve regeneration (Hong et al. 1988).

The biophysical modes of ultrasonic action on the biological system can be classified into two categories – thermal mechanisms and non-thermal mechanisms Barnett 1997; Nyborg 2001). Ultrasound thermal effects are a result of energy transfer from the vibrating wave pressure to the objects, as such waves propagate through the medium. In transdermal applications, this energy is absorbed by the skin, what results in temperature increasing (Cagnie 2003; Mitragotri 1995). Other studies have demonstrated that cavitation mechanism increases skin permeability more than thermal effects do (Merino et al. 2003). Cavitation produces gaseous bubbles on the stratum corneum and involves rapid growth, as well as collapse, of a bubble (transient cavitation), or oscillatory motion of a bubble (stable cavitation) in the ultrasound field. Oscillation and collapse of cavitation bubbles disorder the lipid bilayers of the stratum corneum, thereby enhancing the transport of topical drugs (Fang 1999; Miller 2000; Mitragotri 1995; Ueda 1996).

Transdermal drug delivery with ultrasound offers many advantages when compared to other drug delivery methods, such as a direct action on the inflamed area (Muller et al. 1997), stable plasma levels, degradation absence by the digestive tract and first hepatic pass effect suppression (Machet and Boucaud 2002), avoiding collateral effects related to gastrointestinal drug metabolism, usually associated with oral delivery, moreover to eliminating pain, fear and the possibility of infection associated with injection (Wu et al. 1998). Therefore, transdermal drug delivery associated with therapeutic ultrasound represents an advance in the method, once recent studies have demonstrated that phonophoresis induces enhanced skin transdermal delivery of different drugs when compared to topical delivery without ultrasound. *In vitro* studies have verified that topical delivery phonophoresis of anti-sense oligonucleotides (ODN) (Tezel et al. 2004), glucose and manitol (Merino et al. 2003), clobetasol 17-propionato (Fang et al. 1999), higher molecular weight (Weimann and Wu 2002), as well as hydrophilic and lipophilic drugs (Ueda et al. 1996), on the skin of different animal species induced an enhancing of these drugs permeability. *In vivo* studies have shown similar results. Topical application phonophoresis of 10% hydrocortisone on Achilles tendon of rats after tenotomy (Koeke et al. 2005), of topical ketoprofen on the knee joint of human volunteers (Cagnie et al. 2003), of encapsulated diclofenac on rats (Vyas et al. 1995) and of topical diclofenac on the dorsum of healthy human volunteers (Rosim et al. 2005) induced these drugs permeability enhancement in local tissue immediately under the phonophoresis local application (Tezel et al. 2004).

One of the most commonly used topical anti-inflammatory medication in physiotherapy and sports medicine as coupling gel for phonophoresis for the treatment of joint and muscle inflammatory and pain conditions is diclofenac, a non-steroidal anti-

inflammatory drug (NSAIDs) (Escribano 2003; Rosim 2005). The NSAIDs mechanism of action results from the inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2) at inflammatory focus although most of them also inhibit gastric mucous cyclooxygenase 1 (COX-1), which produces gastric damage (Mitchell et al. 1999).

Summarizing, once many studies suggest that there are advantages of phonophoresis over the topical application of drugs without ultrasound irradiation and that there is a small number of studies on systemic concentration of diclofenac post ultrasound irradiation, the aim of this study was to verify plasma concentration of diclofenac post phonophoresis with topical diclofenac diethylamonium in the dorsum of healthy volunteers by high performance liquid chromatography (HPLC).

Materials and Methods

Subjects

A total of twelve healthy volunteers (six males and six females) aged from 18 to 26 years old and body mass index ranging from 19,0 Kg/m² to 27,0 Kg/m² participated in the study. Volunteers were excluded if they had smoked or used anti-inflammatory drugs 7 days before the study, if they informed us that they presented sensibility to diclofenac diethylamonium or any restriction in the spot of drug application in the skin. The volunteers recruited were submitted to a screening examination that included a historycal and physical examination before and after the study: ECG, complete blood count, total cholesterol, bilirruibin (total and conjugated), hepatitis B and C surface antigen and human immunodeficiency vírus antibody test.

Study Design

The experimental protocol was approved by the local ethics committee (São Francisco University, in the state of São Paulo, Brazil). After the protocol had been explained, the subjects signed an informed consent form before undergoing any test. This study was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki and the ICH-Harmonized Tripartite Guideline for Good Clinical Practice (1996) - ICH Topic E6 - including post Step 4 errata Sept/1997.

Before starting the experiment, the treatment area (150 cm² – 10 x 15 cm) was washed with neutral soap and a soft sponge and dried and, then, marked with stencil. A blood sample was collected from a forearm vein. The volunteers were in the prone position and received the treatment with at least a 7-day wash-out between each period. They were

randomized by gender and divided into two groups, a treated group (n=12), which received phonophoresis with 2g of Cataflam Emulgel[®] (Novartis) - containing 1,16 mg of diclofenac diethylammonium per g – and used ultrasound (Avatar V, KLD, Brazil) adjusted in continuous mode, effective radiation area of 5 cm², frequency at 1 MHz, intensity 0,5 W/cm², during 5 minutes, and a control group (n=12) that received sham phonophoresis with Cataflam Emulgel[®] (topical application with the ultrasound switched off). After the ultrasound treatment, the gel was completely removed and the area was washed and dried again.

Instrumentation and Chromatography

Diclofenac diethylammonium concentration was determined in plasma by a validated reversed-phase high-performance liquid chromatographic (HPLC) method. The HPLC system consisted of a LC 2010 Shimadzu (Kyoto, Japan). The separation chromatography was performed on a reversed-phase Luna C₁₈ column (250 x 4.6 mm x 10 µm) from Phenomenex (Torrance, CA, USA), protected by a Securityguard C₁₈ guard column (4.0 x 3.0 mm) from Phenomenex (Torrance, CA, USA). The mobile phase, consisting of 60% methanol and 40% pH 2, triethylamine and phosphoric acid (0.3%:0.3% v/v), was pumped at flow-rate of 1.5 mL/min (0-8.2 min). The column is operated at 20°C, the detector wavelength was set at 276 nm and peak height was measured.

Sample Preparation

The samples to be analyzed were removed from freezer and thawed at ambient temperature 0.4mL of acetonitril and were added to 0.4 mL of human plasma samples (in

eppendorff tube). Then 25 μ L of 5% perchloric acid and 0.4 mL of methanol were added to the solution for protein precipitation. The contents of the tube were vortex-mixed for 5min and centrifuged at 4°C (14000 rpm for 10 min). The supernatant (200 μ L) was transferred to inserts and 20 μ L were injected onto the HPLC system.

Blood samples were collected after 5, 15, 30, 45 min, 1h, 1h30min, 2, 3 , 4, 5, 6, 7 and 8h after dosing.

Statistical Analysis

Statistical analysis of the results was done separately to the volunteers of the treated and control groups using the McNemar test at the 5% level of significance ($p \leq 0.05$).

Results and Discussion

This study was carried out in order to evaluate the systemic exposure of diclofenac diethylammonium when applied to a viable skin in simulated clinical conditions of phonophoresis application. Phonophoresis is defined as the enhancement of any medication penetration through the normal skin by ultrasound irradiation (Rosim et al. 2005). Several phonophoresis clinical applications are daily performed by health professionals and the beneficial effects of ultrasound are integrated to drug topical application. Ultrasound therapy has been used by physiotherapy and sports medicine for the treatment of a great variety of locomotor system disorders and it can be associated with the effects of some NSAIDS drugs – such as salt forms of diclofenac. Diclofenac inhibits cyclooxygenase-2 at the inflammation focus, also inhibiting, unfortunately, gastric mucous cyclooxygenase-1, what leads to the production of undesirable side effects such as gastric damage (Mitchell et al. 1999), and has become the reason why topical formulation gel, cream or ointment have been developed (Rosim et al. 2005) and associated with therapeutic ultrasound.

It is known that topically applied drugs can induce local and systemic effects that can be distinguished by examining local tissue drug concentrations (under the site of application) and blood or urine level (Conner-Kerr et al. 1998). Research has shown that local delivery is separated from systemic delivery (Guy 1983; Rabinowitz 1988). Topically applied drugs with particularly systemic effects are diffused from epidermis to dermis untill they reach the capillary network and drugs with local targets are diffused into the areas lying immediately below the administration site – such as subcutaneous tissue, muscle, synovium, ligaments, tendons and joints (Byl 1995).

In our study, although the highest concentration of plasma obtained from topically applied diclofenac diethylammonium combined with ultrasound has been 144.28 ng/mL, in 75% of the volunteers submitted to phonophoresis or topically applied diclofenac without ultrasound irradiation, plasmatic concentrations of diclofenac were below the detection limit (50 ng/mL) during the entire observation period and only 25% ranged from 58.66ng/mL to 144.28ng/mL. Muller et al. (1997), when analysing topically applied diclofenac concentration, found 9 (out of 20) profiles with concentrations below the detection limit (0,1 µg/mL).

The IC₅₀ (50% inhibitory concentration) for cyclooxygenase – 2 (COX-2) inhibition by diclofenac is 50 ng/mL in underlying tissue layers (Mitchell et al. 1993). In our study, only 25% of the volunteers, topical administration of diclofenac diethylammonium induced plasma concentrations that exceeded the IC₅₀.

This result suggests that phonophoresis on the dorsum of healthy volunteers did not increase plasmatic concentration of diclofenac diethylammonium (p=0.1573, McNemar test). However, the possibility of increase – produced by phonophoresis – in local tissue concentration of diclofenac, as well as in anti-inflammatory response, can not be excluded, since the application of ultrasound irradiation *in vitro* induced pore formation in the stratum corneum (Weimann and Wu 2002) and studies *in vivo* demonstrated that phonophoresis increase drugs permeability in different tissues such as oligonucleotides and salicylate in human skin (Oziomek 1991; Tezel 2004), ketoprofen in the synovial fluid of humans with knee disorders and hydrocortisone in the Achilles tendon of rats after tenotomy (Koeke et al. 2005). However, such enhancement was noticed in the local tissue that lies immediately under the phonophoresis application spot and it was not followed by a

proportional enhancement of systemic drug concentration, as well as verified with topical application without ultrasound (Dehghanyar 2004; Radermacher 1991; Riess 1986; Seth 1992).

When NSAIDs are topically applied, they can penetrate deeply into different tissues and result in higher local concentrations when compared to circulating systemic concentrations (Muller 1997; Riess 1986; Sioufi 1994). This may suggest that direct diffusion and local blood redistribution are contributing to this effect (Mills et al. 2005) and is indicative that adverse effects usually related to high concentrations of drugs in the blood, such as reached after oral administration, are unlikely to be experienced. Therefore, systemic blood concentrations may be inadequate to describe regional kinetics of topically applied drugs (Mills et al. 2005).

It is known that penetration of topically applied drugs depends on several factors, including skin hydration, application site, physicochemical properties of drugs, dose, way of application (single or multiple administration and with occlusion or non-occlusion) and time of exposure (Wester et al. 1992). This may explain the high inter-individual variations in plasmatic concentrations showed in this, as well as in other studies (Dehghanyar 2004; Sioufi 1994), and the different results demonstrated by recent research. Rosim et al. (2005) used diclofenac phonophoresis in human volunteers and demonstrated that phonophoresis increased plasmatic concentration of diclofenac, especially one and two hours post ultrasound irradiation. However, there were some methodological differences that can explain the different results. First, they performed phonophoresis in two areas of the dorsum and, immediately after the irradiation of the second area, diclofenac gel was applied and left to dry for at least one hour before the volunteers put their clothes back on. Dehghanyar et al. (2004) used a similar procedure to enhance transdermal drug absorption.

Second, they used sodium diclofenac, which has more solubility than diclofenac diethylammonium (O'Connor and Corrigan 2001).

In summary, we provide evidence that transdermal application of diclofenac diethylammonium by means of phonophoresis in a single dose has not induced plasmatic concentration increase when compared to topical application alone. However, the possibility of increase – produced by phonophoresis – in local tissue concentration of diclofenac immediately under the ultrasound irradiation area can not be excluded.

Acknowledgements

The authors are grateful to São Francisco University Medical School for the support. We thank Adriana for excellent technical assistance and we would like to express our sincere thanks to Eduardo Meurer, Silvana Calafatti and Marcia Serra for their assistance and guidance at every stage of this work.

References

Barnett SB, Rott HD, ter Haar GR, Ziskin MC, Maeda K. The sensitivity of biological tissue to ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 1997; 23(6) 805-812.

Bommannan D, Okuyama H, Stauffer P, Guy R H. Sonophoresis. I. The use of high-frequency ultrasound to enhance transdermal drug delivery. *Pharm Res* 1992; 9 (4): 559-564.

Byl NN. The use of ultrasound as an enhancer for transcutaneous drug delivery: phonophoresis. *Phys Ther* 1995; 75(6): 539-553.

Cagnie B, Vinck E, Rimbaut S, Vanderstraeten G. Phonophoresis versus topical application of ketoprofen: comparison between tissue and plasma levels. *Phys Ther* 2003; 83(8): 707-712.

Conner-Kerr T, Franklin M, Kerr J, et al. Phonophoretic delivery of dexamethasone to human transdermal tissues: a controlled pilot study. *Eur j phys med rehabil* 1998;8:19-23.

da Cunha A, Parizotto NA, Vidal Bde C. The effect of therapeutic ultrasound on repair of the achilles tendon (tendo calcaneus) of the rat. *Ultrasound Med Biol* 2000; 27(12): 1691-1696.

Dehghanyar P, Mayer BX, Namiranian K, et al. Topical skin penetration of diclofenac after single- and multiple-dose application. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2004; 42(7): 353-359.

Dyson M, Suckling J. Stimulation of tissue repair by ultrasound: a survey of the mechanisms involved. *Physiotherapy* 1978; 64(4): 105-108.

Escribano E, Calpena AC, Queralt J, Obach R, Domenech J. Assessment of diclofenac permeation with different formulations: anti-inflammatory study of a selected formula. *Eur J Pharm Sci* 2003; 19(4): 203-210.

Fang J, Fang C, Sung KC, Chen H. Effect of low frequency ultrasound on the in vitro percutaneous absorption of clobetasol 17-propionate. *Int J Pharm* 1999; 191(1): 33-42.

Gan BS, Huys S, Sherebrin MH, Scilley CG. The effects of ultrasound treatment on flexor tendon healing in the chicken limb. *J Hand Surg (Br)* 1995; 20(6): 809-814.

Guy RH, Maibach HI. Drug delivery to local subcutaneous structures following topical administration. *J Pharm Sci* 1983; 72(12): 1375-1380.

Hong CZ, Liu HH, Yu J. Ultrasound thermotherapy effect on the recovery of nerve conduction in experimental compression neuropathy. *Arch Phys Med Rehabil* 1988; 69(6): 410-404.

Jackson, BA, Schwane JA, Starcher BC. Effect of ultrasound therapy on the repair of Achilles tendon injuries in rats. *Med Sci Sports Exerc* 1991; 23(2): 171-176.

Koeke PU, Parizotto NA, Carrinho PM, Salate AC. Comparative study of the efficacy of the topical application of hydrocortisone, therapeutic ultrasound and phonophoresis on the tissue repair process in rat tendons. *Ultrasound Med Biol* 2005; 31(3): 345-350.

Machet L, Boucaud A. Phonophoresis: efficiency, mechanisms and skin tolerance. *Int J Pharm* 2002; 243 (1-2): 1-15.

Menezes DF, Volpon JB, Shimano AC. Aplicações de ultra-som terapêutico em lesão muscular experimental aguda (Therapeutic ultrasound application in acute experimental muscle lesion) *Rev Bras Fisiot* 1999;4:27-31.

Merino G, Kalia YN, Delgado-Charro MB, Potts RO, Guy RH. Frequency and thermal effects on the enhancement of transdermal transport by sonophoresis. *J Control Release* 2003; 88(1): 85-94.

Miller MW. Gene transfection and drug delivery. *Ultrasound Med Biol* 2000; 26 Suppl 1: S59-62.

Mills PC, Magnusson BM, Cross SE. Penetration of a topically applied nonsteroidal anti-inflammatory drug into local tissues and synovial fluid of dogs. *Am J Vet Res* 2005; 66(7): 1128-1132.

Mitchell JA, Warner TD. Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *Br J Pharmacol* 1999; 128(6): 1121-1132.

Mitragotri S, Edwards DA, Blankschtein D, Langer R. A mechanistic study of ultrasonically-enhanced transdermal drug delivery. *J Pharm Sci* 1995; 84(6): 697-706.

Mitragotri S, Blankschtein D, Langer R. Transdermal drug delivery using low-frequency sonophoresis. *Pharm Res* 1996; 13(3) 411-420.

Mitragotri S, Kost J. Low-frequency sonophoresis: a noninvasive method of drug delivery and diagnostics. *Biotechnol Prog* 2000; 16(3): 488-492.

Muller M, Mascher H, Kikuta C, et al. Diclofenac concentrations in defined tissue layers after topical administration. *Clin Pharmacol Ther* 1997; 62(3): 293-299.

Nyborg WL. Biological effects of ultrasound: development of safety guidelines. Part II: general review. *Ultrasound Med Biol* 2001; 27(3): 301-333.

O'Connor KM, Corrigan OI. Comparison of the physicochemical properties of the N-(2-hydroxyethyl) pyrrolidine, diethylamine and sodium salt forms of diclofenac. *Int J Pharm* 2001; 222(2): 281-293.

Oziomek RS, Perrin DH, Herold DA, Denegar CR. Effect of phonophoresis on serum salicylate levels. *Med Sci Sports Exerc* 1991; 23(4): 397-401.

Rabinowitz JL, Feldman ES, Weinberger A, Schumacher HR. Comparative tissue absorption of oral aspirin and topical triethanolamine salicylate in human and canine knee joints. *J clin Pharmacol* 1988;22:42-48.

Radermacher J, Jentsch D, Scholl MA, Lustinetz T, Frolich JC. Diclofenac concentrations in synovial fluid and plasma after cutaneous application in inflammatory and degenerative joint disease. *Br J Clin Pharmacol* 1991; 31(5): 537-541.

Riess W, Schmid K, Botta L, et al. The percutaneous absorption of diclofenac. *Arzneimittelforschung* 1986; 36(7): 1092-1096.

Seth BL. Comparative pharmacokinetics and bioavailability study of percutaneous absorption of diclofenac from two topical formulations containing drug as a solution gel or as an emulsion gel. *Arzneimittelforschung* 1992; 42(2): 120-122.

Sioufi A, Pommier F, Boschet F, et al. Percutaneous absorption of diclofenac in healthy volunteers after single and repeated topical application of diclofenac Emulgel. *Biopharm Drug Dispos* 1994; 15(6): 441-449.

Tezel A, Dokka S, Kelly S, Hardee GE, Mitragotri S. Topical delivery of anti-sense oligonucleotides using low-frequency sonophoresis. *Pharm Res* 2004; 21(12): 2219-2225.

Ueda H, Ogihara M, Sugibayashi K, Morimoto Y. Difference in the enhancing effects of ultrasound on the skin permeation of polar and non-polar drugs. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1996; 44(10): 1973-1976.

Vyas SP, Singh R, Asati RK. Liposomally encapsulated diclofenac for sonophoresis induced systemic delivery. *J Microencapsul* 1995; 12(2): 149-154.

Weimann LJ, Wu J. Transdermal delivery of poly-L-lysine by sonomacroporation. *Ultrasound Med Biol* 2002; 28(9): 1173-1180.

Wester RC, Maibach HI, Melendres J. In vivo and in vitro percutaneous absorption and skin evaporation of isofenphos in man. *Fundam Appl Toxicol* 1992; 19(4): 521-526.

Wu J, Chappelow J, Yang J, Weimann L. Defects generated in human stratum corneum specimens by ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 1998; 24(5): 705-710.

4. DISCUSSÃO GERAL

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliarmos a concentração sistêmica de diclofenaco dietilamônio quando aplicado na pele de indivíduos saudáveis, simulando as condições clínicas de aplicação da fonoforese. Fonoforese é definida como um método de aumento da penetração de diferentes medicamentos através da pele pela irradiação de ultra-som terapêutico (Rosim et al. 2005). A fonoforese é utilizada diariamente por fisioterapeutas e seus efeitos benéficos são integrados a aplicação tópica de diferentes fármacos. A terapia por ultra-som tem sido utilizada pela fisioterapia e pela medicina do esporte para o tratamento de uma grande variedade de desordens do sistema locomotor e pode ser associada aos efeitos benéficos dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), tal como o diclofenaco. O diclofenaco inibe a ciclooxigenase-2 no sítio de inflamação, mas também, inibe a ciclooxigenase-1 da mucosa gástrica, o que leva a produção de efeitos colaterais tais como os danos gástricos (Mitchell et al. 1999). Por essa razão, novas formulações tópicas como gel ou creme estão sendo desenvolvidas (Rosim et al. 2005) e associadas ao uso da fonoforese.

Sabe-se que a aplicação tópica de drogas pode induzir efeitos locais e sistêmicos que podem ser analisados pelo exame da concentração tecidual local (abaixo do local de aplicação) e pelas concentrações no sangue e urina (Conner-Kerr et al. 1998). Pesquisas tem demonstrado que a absorção local é diferente da sistêmica (Guy 1983; Rabinowitz 1988). Drogas aplicadas localmente e que possuem efeitos sistêmicos são difundidas através da epiderme para a derme até atingirem a rede capilar e drogas com efeitos locais difundem-se para as áreas imediatamente abaixo do local de administração, como tecido subcutâneo, músculos, líquido sinovial, ligamentos, tendões e articulações (Byl 1995).

Neste estudo, apesar da maior concentração plasmática obtida pela fonoforese com diclofenaco dietilamônio ter sido de 144.28 ng/mL, em 75% dos voluntários submetidos a fonoforese ou a aplicação tópica sem ultra-som, as concentrações plasmáticas de diclofenaco foram abaixo do limite de detecção (50 ng/mL) durante todo o período de observação e apenas 25% variaram de 58.66ng/mL a 144.28ng/mL. Muller et al. (1997), quando analisaram a concentração de diclofenaco após administração tópica, verificou que 9 entre 20 voluntários apresentaram concentrações sistêmicas abaixo do limite de detecção (0,1 µg/mL).

O IC₅₀ (concentração inibitória de 50%) para a inibição da ciclooxigenase-2 (COX-2) pelo diclofenaco é 50 ng/mL nos tecidos imediatamente abaixo da aplicação (Mitchell et al. 1993). Em nosso estudo, apenas 25% dos voluntários apresentaram concentrações acima do IC₅₀.

Estes resultados sugerem que a fonoforese, no dorso de voluntários sadios, não aumenta a concentração sistêmica de diclofenaco dietilamônio. No entanto, um possível aumento da concentração de diclofenaco nos tecidos imediatamente abaixo do local de aplicação da fonoforese não pode ser excluído, uma vez que a irradiação de ultra-som *in vitro* induz a formação de poros no estrato córneo (Weimann e Wu 2002) e estudos *in vivo* demonstram que a fonoforese induz o aumento da permeabilidade de drogas em diferentes tecidos como - oligonucleotídeos e salicilato na pele de humanos (Oziomek 1991; Tezel 2004), ketoprofen no fluido sinovial de voluntários com distúrbios articulares no joelho e hidrocortisona no tendão de Aquiles de ratos após tenotomia (Koeke et al. 2005). No entanto, esse aumento foi verificado nos tecidos locais imediatamente abaixo da aplicação da fonoforese e não foi seguido por um aumento proporcional da concentração

sistêmicas dessas drogas, assim como verificado pela aplicação tópica sem o uso do ultra-som (Riess 1986; Radermacher 1991; Seth 1992; Dehghanyar 2004).

Quando AINEs são aplicados topicamente, eles podem penetrar profundamente em diferentes tecidos e resultar no aumento da concentração local quando comparada a concentração sistêmica (Riess 1986; Sioufi 1994; Muller 1997). Isto pode sugerir que uma difusão direta e uma redistribuição sanguínea contribuem para esse efeito (Mills et al. 2005) e isso é um indicativo de que efeitos colaterais, normalmente relacionados a altas concentrações sistêmicas de drogas, tais como obtidas após administração oral, não serão observadas. Portanto, a quantificação da concentração sistêmica pode ser um método inadequado para verificar a cinética dos fármacos administrados topicamente (Mills et al. 2005).

Sabe-se que a penetração das drogas aplicadas topicamente dependem de diversos fatores, que incluem a hidratação da pele, o local de aplicação, as propriedades físicoquímicas das drogas, dose, forma de aplicação (única ou múltiplas aplicações) e o tempo de exposição (Wester et al. 1992). Esses fatores podem explicar as altas variações nos resultados entre os indivíduos deste estudo, assim como verificado em outros estudos (Sioufi 1994; Dehghanyar 2004), e os distintos resultados demonstrados por estudos recentes. Rosim et al. (2005) utilizaram diclofenaco associado ao ultra-som terapêutico em voluntários sadios e verificou que a fonoforese aumenta a concentração plasmática de diclofenaco. No entanto, algumas diferenças metodológicas podem explicar tais resultados. Primeiro, eles realizaram irradiação de ultra-som em duas áreas do dorso, sendo uma irradiação seguida da outra e imediatamente após foi feita a aplicação do diclofenaco gel e deixado secar por pelo menos uma hora antes dos voluntários vestirem suas roupas. Dehghanyar et al. (2004) usaram um procedimento semelhante para aumentar a absorção da

droga. Segundo, Rosim et al. (2005) utilizaram diclofenaco sódico, que é mais solúvel que o diclofenaco dietilamônio (O'Connor e Corrigan 2001).

Em suma, demonstramos que a aplicação transdérmica de diclofenaco dietilamônio pela fonoforese, em uma única aplicação, não induz aumento da concentração plasmática quando comparada a aplicação sem ultra-som. No entanto, um possível aumento da concentração de diclofenaco nos tecidos imediatamente abaixo do local de aplicação da fonoforese não pode ser excluído.

5. CONCLUSÃO

Concluimos que a fonoforese com o diclofenaco dietilamônio, em uma única aplicação, não induz aumento na concentração sistêmica de diclofenaco quando comparado ao grupo controle. No entanto, um possível aumento da concentração de diclofenaco nos tecidos imediatamente abaixo do local de aplicação da fonoforese não pode ser excluído.

***6. REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

Barnett SB, Rott HD, ter Haar GR, Ziskin MC, Maeda K. The sensitivity of biological tissue to ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 1997; 23(6) 805-812.

Bommannan D, Okuyama H, Stauffer P, Guy R H. Sonophoresis. I. The use of high-frequency ultrasound to enhance transdermal drug delivery. *Pharm Res* 1992; 9 (4): 559-564.

Byl NN, McKenzie A, Halliday B, Wong T, O'Connell J. The effects of phonophoresis with corticosteroids: a controlled pilot study. *J Orthop Sports Phys Ther* 1993; 18(5): 590-600.

Byl NN. The use of ultrasound as an enhancer for transcutaneous drug delivery: phonophoresis. *Phys Ther* 1995; 75(6): 539-553.

Cagnie B, Vinck E, Rimbaut S, Vanderstraeten G. Phonophoresis versus topical application of ketoprofen: comparison between tissue and plasma levels. *Phys Ther* 2003; 83(8): 707-712.

Conner-Kerr T, Franklin M, Kerr J, et al. Phonophoretic delivery of dexamethasone to human transdermal tissues: a controlled pilot study. *Eur j phys med rehabil* 1998;8:19-23.

da Cunha A, Parizotto NA, Vidal Bde C. The effect of therapeutic ultrasound on repair of the achilles tendon (tendo calcaneus) of the rat. *Ultrasound Med Biol* 2000; 27(12): 1691-1696.

Dehghanyar P, Mayer BX, Namiranian K, et al. Topical skin penetration of diclofenac after single- and multiple-dose application. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2004; 42(7): 353-359.

Dyson M, Suckling J. Stimulation of tissue repair by ultrasound: a survey of the mechanisms involved. *Physiotherapy* 1978; 64(4): 105-108.

Escribano E, Calpena AC, Queralt J, Obach R, Domenech J. Assessment of diclofenac permeation with different formulations: anti-inflammatory study of a selected formula. *Eur J Pharm Sci* 2003; 19(4): 203-210.

Fang J, Fang C, Sung KC, Chen H. Effect of low frequency ultrasound on the in vitro percutaneous absorption of clobetasol 17-propionate. *Int J Pharm* 1999; 191(1): 33-42.

Gan BS, Huys S, Sherebrin MH, Scilley CG. The effects of ultrasound treatment on flexor tendon healing in the chicken limb. *J Hand Surg (Br)* 1995; 20(6): 809-814.

Guy RH, Maibach HI. Drug delivery to local subcutaneous structures following topical administration. *J Pharm Sci* 1983; 72(12): 1375-1380.

Hong CZ, Liu HH, Yu J. Ultrasound thermotherapy effect on the recovery of nerve conduction in experimental compression neuropathy. *Arch Phys Med Rehabil* 1988; 69(6): 410-404.

Jackson, BA, Schwane JA, Starcher BC. Effect of ultrasound therapy on the repair of Achilles tendon injuries in rats. *Med Sci Sports Exerc* 1991; 23(2): 171-176.

Koeke PU, Parizotto NA, Carrinho PM, Salate AC. Comparative study of the efficacy of the topical application of hydrocortisone, therapeutic ultrasound and phonophoresis on the tissue repair process in rat tendons. *Ultrasound Med Biol* 2005; 31(3): 345-350.

Machet L, Boucaud A. Phonophoresis: efficiency, mechanisms and skin tolerance. *Int J Pharm* 2002; 243 (1-2): 1-15.

Menezes DF, Volpon JB, Shimano AC. Aplicações de ultra-som terapêutico em lesão muscular experimental aguda (Therapeutic ultrasound application in acute experimental muscle lesion) *Rev Bras Fisiot* 1999;4:27-31.

Merino G, Kalia YN, Delgado-Charro MB, Potts RO, Guy RH. Frequency and thermal effects on the enhancement of transdermal transport by sonophoresis. *J Control Release* 2003; 88(1): 85-94.

Miller MW. Gene transfection and drug delivery. *Ultrasound Med Biol* 2000; 26 Suppl 1: S59-62.

Mills PC, Magnusson BM, Cross SE. Penetration of a topically applied nonsteroidal anti-inflammatory drug into local tissues and synovial fluid of dogs. *Am J Vet Res* 2005; 66(7): 1128-1132.

Mitchell JA, Warner TD. Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *Br J Pharmacol* 1999; 128(6): 1121-1132.

Mitragotri S, Edwards DA, Blankschtein D, Langer R. A mechanistic study of ultrasonically-enhanced transdermal drug delivery. *J Pharm Sci* 1995; 84(6): 697-706.

Mitragotri S, Blankschtein D, Langer R. Transdermal drug delivery using low-frequency sonophoresis. *Pharm Res* 1996; 13(3) 411-420.

Mitragotri S, Kost J. Low-frequency sonophoresis: a noninvasive method of drug delivery and diagnostics. *Biotechnol Prog* 2000; 16(3): 488-492.

Muller M, Mascher H, Kikuta C, et al. Diclofenac concentrations in defined tissue layers after topical administration. *Clin Pharmacol Ther* 1997; 62(3): 293-299.

Naslund J. Modes of sensory stimulation – clinical trials and physiological aspects. *Physiotherapy* 2001;87(8):413-423.

Nyborg WL. Biological effects of ultrasound: development of safety guidelines. Part II: general review. *Ultrasound Med Biol* 2001; 27(3): 301-333.

O'Connor KM, Corrigan OI. Comparison of the physicochemical properties of the N-(2-hydroxyethyl) pyrrolidine, diethylamine and sodium salt forms of diclofenac. *Int J Pharm* 2001; 222(2): 281-293.

Oziomek RS, Perrin DH, Herold DA, Denegar CR. Effect of phonophoresis on serum salicylate levels. *Med Sci Sports Exerc* 1991; 23(4): 397-401.

Parizotto NA, Koeke PU, Moreno BGD, Lourencin FTC. Utilização da fonoforese em desordens músculo-esqueléticas: Uma meta-análise. *Rev Bras Fisioter* 2003; 7(1): 9-15.

Rabinowitz JL, Feldman ES, Weinberger A, Schumacher HR. Comparative tissue absorption of oral aspirin and topical triethanolamine salicylate in human and canine knee joints. *J clin Pharmacol* 1988;22:42-48.

Radermacher J, Jentsch D, Scholl MA, Lustinetz T, Frolich JC. Diclofenac concentrations in synovial fluid and plasma after cutaneous application in inflammatory and degenerative joint disease. *Br J Clin Pharmacol* 1991; 31(5): 537-541.

Ramirez A, Schwane JÁ, McFarland C, Starcher B. The effect of ultrasound on collagen synthesis and fibroblast proliferation in vitro. *Med Sci Sports Exerc* 1997; 29(3): 326-332

Riess W, Schmid K, Botta L, et al. The percutaneous absorption of diclofenac. *Arzneimittelforschung* 1986; 36(7): 1092-1096.

Seth BL. Comparative pharmacokinetics and bioavailability study of percutaneous absorption of diclofenac from two topical formulations containing drug as a solution gel or as an emulsion gel. *Arzneimittelforschung* 1992; 42(2): 120-122.

Sioufi A, Pommier F, Boschet F, et al. Percutaneous absorption of diclofenac in healthy volunteers after single and repeated topical application of diclofenac Emulgel. *Biopharm Drug Dispos* 1994; 15(6): 441-449.

ter Haar G, Dyson M, Oakley EM. The use of ultrasound by physiotherapists in Britain, 1985. *Ultrasound Med Biol* 1987; 13(10): 659-663

Tezel A, Dokka S, Kelly S, Hardee GE, Mitragotri S. Topical delivery of anti-sense oligonucleotides using low-frequency sonophoresis. *Pharm Res* 2004; 21(12): 2219-2225.

Ueda H, Ogihara M, Sugibayashi K, Morimoto Y. Difference in the enhancing effects of ultrasound on the skin permeation of polar and non-polar drugs. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1996; 44(10): 1973-1976.

Vyas SP, Singh R, Asati RK. Liposomally encapsulated diclofenac for sonophoresis induced systemic delivery. *J Microencapsul* 1995; 12(2): 149-154.

Warden SJ, McMeeken JM. Ultrasound usage and dosage in sports physiotherapy. *Ultrasound in Medicine & Biology* 2002;28(8):1075-1080.

Weimann LJ, Wu J. Transdermal delivery of poly-l-lysine by sonomacroporation. *Ultrasound Med Biol* 2002; 28(9): 1173-1180.

Wester RC, Maibach HI, Melendres J. In vivo and in vitro percutaneous absorption and skin evaporation of isofenphos in man. *Fundam Appl Toxicol* 1992; 19(4): 521-526.

Wu J, Chappelow J, Yang J, Weimann L. Defects generated in human stratum corneum specimens by ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 1998; 24(5): 705-710.

7. ANEXO

Dear Dr Fusaro

Thank you for your email. I confirm that the manuscript you have submitted for consideration for publication in Ultrasound in Medicine and Biology has been received.

With kind regards
Jan Carne
UMB Editorial Office

--On 02 December 2005 19:46 -0200 Claudio <claufus@directnet.com.br> wrote:

>
>
> Dear Professor P.N.T. Wells, (c/o Ms. Jan Carne)
>
>
>
> I am sending the manuscript (original contribution) "Study of
> diclofenac diethylammonium phonophoresis in health human volunteers"
> attached, for your evaluation.
>
>
>
> Please, confirm that you received this manuscript with urgency.
>
>
>
> Thank you very much,
>
>
>
> My best regards,
>
>
>
> Cláudio Fusaro
>
>

PNT Wells, Clinical Medicine
Peter.Wells@bristol.ac.uk