

## Avaliação *in vitro* de um injectável subcutâneo para libertação prolongada de um fármaco $\beta$ -agonista

### *In vitro* evaluation of a subcutaneous slow release injectable solution of a beta adreno-agonist drug

Catarina Lavrador<sup>1</sup>, António J. Almeida<sup>2</sup>, L. Alfaro Cardoso\*<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Hospital Veterinário da Universidade de Évora, Polo da Mitra, Évora;

<sup>2</sup>Unidade de Ciências e Tecnologia Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Av. das Forças Armadas, 1648-038 Lisboa;

<sup>3</sup>Instituto de Investigação Científica Tropical, Centro de Veterinária e Zootécnia, FMV, Pólo da Ajuda, 1300-477 Lisboa;

**Resumo:** Os  $\beta$ -agonistas são fármacos com efeito anabólico relativamente ao metabolismo proteico e com acção lipolítica, característica que os tem transformado em moduladores do crescimento animal na produção pecuária em países cujas leis o não impedem. Foi constatado, em condições experimentais, que aquela acção anabólica persiste em ratos e ovinos sub-alimentados, induzindo uma diminuição significativa da depleção orgânica provocada pela restrição alimentar. Este facto possibilita uma intervenção profiláctica em situações de carência alimentar aguda, particularmente interessante em espécies pecuárias exploradas em regimes extensivos nas regiões tropicais e sub-tropicais sujeitas a períodos de seca, com depressões sazonais de disponibilidade de alimentos, com consequentes perdas de peso para os animais. Nesta medida, o presente trabalho descreve os estudos preliminares de formulação de um injectável do  $\beta$ -agonista clenbuterol, a administrar por via subcutânea, que permita a libertação prolongada de 250  $\mu\text{g}/\text{dia}/\text{kg}$ . O trabalho inclui a selecção de um excipiente oleoso, constituído por uma mistura de azeite e lanolina, adequado para a preparação de uma suspensão injectável do fármaco. O aquecimento em estufa a 150 °C/2h não induz alterações significativas na viscosidade do excipiente, sugerindo que a suspensão é estável durante o processo de esterilização pelo calor seco, o que é confirmado pela ausência de quaisquer efeitos térmicos acima dos 150 °C nos termogramas obtidos por DSC. Os estudos de cedência *in vitro* demonstram que, de entre os excipientes testados, a mistura de lanolina a 9% (p/p) em azeite proporciona um perfil de libertação adequado, prolongando a libertação do clenbuterol durante aproximadamente 2 meses.

**Summary:** Due to the anabolic affects of  $\beta$ -adrenoceptors on protein metabolism and due to its lipolytic action, they have been used as livestock growth modulators in countries where this practise is not forbidden. It has been shown that in experimental conditions the anabolic effect persists in food restricted rats and sheep, inducing a significant reduction in organic depletion due to diet restriction. This fact opens the possibility of prophylactic use of  $\beta$ -adrenoceptors in livestock submitted to acute seasonal decreases of food availability with significant weight loss, in extensive production systems in tropical or sub-tropical areas. This paper describes preliminary studies in the formulation of a s.c. injectable form of the  $\beta$ -adrenoceptor clenbuterol, allowing a daily release of 250  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ . This work includes the selection of a lipidic excipient made of a solution of olive oil and lanolin suitable for injectable purposes. Oven heating up to 150 °C/2h did not

significantly altered the excipient viscosity, suggesting that the solution is stable during the dry heat sterilisation process, which we confirmed with the absence of thermal effects shown over 150 °C in the thermograms obtained by DSC. The *in vitro* release studies show that between the analysed excipients, the solution of lanolin (9%) in olive oil, delivers an adequate release profile, inducing a clenbuterol release during approximately two months.

### Introdução

Os  $\beta$ -agonistas, ou  $\beta$ -adrenérgicomiméticos, são substâncias que intervêm no metabolismo animal de forma semelhante à epinefrina ou norepinefrina com selectividade pelos receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Podem mimetizar as acções da adrenalina e noradrenalina nos seus efeitos circulatórios e na estimulação da glicogenólise e lipólise (Vital, 1996). Em várias espécies animais, designadamente em ratos (Rothwell e Stock 1987; Reeds *et al.*, 1988) e em espécies pecuárias (Dalrymple e Ingle, 1987; Buyne *et al.*, 1991), tem sido constatada a acção destes agentes sobre as massas musculares e lipídicas do organismo, com aumento da deposição de proteínas nas primeiras e da lipólise nas segundas, resultando em acréscimos no crescimento, melhoria do índice de conversão, aumento do rendimento da carcaça, diminuição da gordura peri-renal e do canal pélvico com aumento da lipólise, incremento na área do longo dorsal e aumentos de pesos sem grande dimorfismo sexual (Baker *et al.*, 1984; Smith, 1998).

Os efeitos do clenbuterol no metabolismo proteico têm-no transformado num modulador corporal de preferência, utilizado experimental e comercialmente na produção pecuária em países cujas leis o não impedem. Na União Europeia, está autorizado para fins veterinários exclusivamente como broncodilatador em equídeos e bovinos e como tocolítico em vacas, sendo proibida a sua utilização como promotor de crescimento (Kuiper *et al.*, 1998). No entanto, o clenbuterol é por vezes usado ilicitamente em rações animais, podendo ser causa

\* correspondência: e-mail alfarc Cardoso@fmv.utl.pt

de toxicidade para os consumidores (Brambilla *et al.*, 1997; Smith, 1998). Por esta razão são exigidos intervalos de tempo mínimos entre o fim do tratamento e o abate dos animais, variando os resíduos máximos permitidos por lei em produtos animais para consumo humano entre os 0,05 µg/kg no leite e os 0,5 µg/kg no fígado e nos rins (Meyer e Rinke, 1991; EMEA/MRL/723/99).

Em ratos sub-alimentados, a função anabólica deste β-agonista encontra-se significativamente acrescida relativamente à sua acção em animais alimentados *ad libitum* (Cardoso e Stock, 1996; 1998). Em ovinos sujeitos a restrição alimentar (Taveira, 1998), foi igualmente verificada a intervenção do clenbuterol, diminuindo, face a grupos de animais de controlo, a depleção corporal causada pela sub-alimentação. Estes fenómenos, a considerarem-se em espécies pecuárias, perspectivam uma intervenção profiláctica ou terapêutica do clenbuterol em situações de carência alimentar aguda, no sentido de minorar em situações pontuais, de depressões significativas de condições corporais e não como agente de promoção do crescimento. Esta intervenção profiláctica refere-se sempre a animais adultos mantidos como reprodutores e nunca a efectivos em crescimento ou em engorda para abate e consumo humano. Esta utilização do β-agonista pode ser particularmente interessante em espécies exploradas em regimes extensivos, em regiões tropicais e subtropicais, que representam cerca de 60% do efectivo pecuário do planeta (FAO Statistical Databases, 2000) e que estão sujeitos a depressões sazonais de disponibilidade de alimentos com consequentes perdas de peso que atingem 20% do peso corporal (Williamson e Payne, 1980). Face a estas condições, a administração do fármacos com intervenção sustentada no metabolismo dos animais deverá ser compatível com o tipo de manejo extensivo praticado, o que pressupõe administrações espaçadas e libertação prolongada das substâncias activas inoculadas. Isto faz prever a utilização do clenbuterol sob uma forma injectável de acção prolongada, objectivo do presente estudo. A via de administração subcutânea apresenta-se como sendo a mais adequada, dada a menor velocidade de absorção dos fármacos e as limitações impostas para os animais produtores de carne para consumo humano (Lee e Putnam, 2000). Em termos puramente farmacotécnicos, pode conseguir-se um efeito de libertação prolongada mediante a utilização de suspensões, promovendo um efeito prolongado (Ford, 1988; Murdan e Florence, 2000). Deste modo, o presente trabalho descreve os estudos de formulação de um injectável contendo clenbuterol, a administrar por via subcutânea, tendo em vista a libertação prolongada do fármaco, incluindo a selecção dos excipientes adequados para uma formulação conducente à produção de um injectável que permita a libertação sustentada de 250 µg/dia/kg de peso vivo e correspondente às concentrações de clenbuterol utilizadas experimentalmente nos trabalhos experimentais referidos.

## Materiais e métodos

O clenbuterol utilizado foi oferecido pela Vetiquima Produtos Químicos, Lda. (Portugal). Foram utilizados como excipientes o azeite (Ph.Eur.) e lanolina (Ph.Eur.), ambos adquiridos a J.M. Vaz Pereira (Portugal). A membrana de acetato de celulose para os estudos de cedência *in vitro* foi obtida da Sigma-Aldrich (Portugal). Todos os outros reagentes, foram fornecidos pela Merck (Alemanha) e foram de grau de pureza *p.a.* ou equivalente.

### Preparação das suspensões de clenbuterol

Foram testados três excipientes para a suspensão injectável de clenbuterol, isto é, azeite puro, e misturas de azeite e lanolina contendo respectivamente 9% (p/p) e 18% (p/p) desta última. A preparação foi realizada por aquecimento conjunto dos dois excipientes a 60 °C em banho de água e homogeneização da mistura, seguida da dispersão de uma quantidade apropriada de clenbuterol para uma concentração final de aproximadamente 1% (p/v), com o auxílio de um banho de ultrasons. De modo a aumentar a estabilidade física das suspensões, procedeu-se previamente à redução do tamanho dos cristais de clenbuterol por dissolução em água destilada, seguida de liofilização (Christ Alpha 1-4 Freeze-Dryer, Alemanha).

### Viscosidade

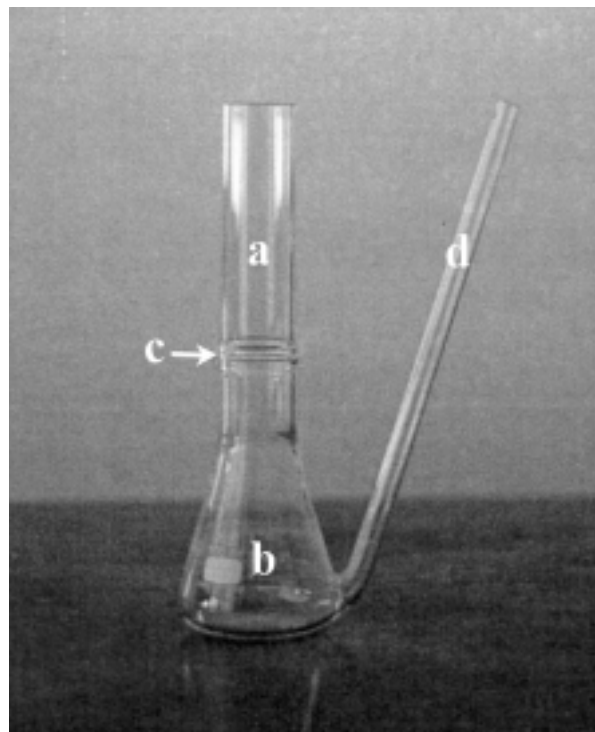
A viscosidade do azeite e das misturas de azeite e lanolina foi estudada usando um viscosímetro Brookfield RVTDV-II (Brookfield Engineering Laboratories, Soughton, E.U.A). As determinações foram efectuadas com agulha RV2, a 50 rpm, após 1 min de estabilização. Para cada mistura foram realizadas 3 leituras antes e após aquecimento em estufa a 150 °C/2h (Mommert, Alemanha). Os resultados foram expressos através do valor médio ± desvio padrão (n=3).

### Análise térmica

Os efeitos da temperatura de esterilização sobre os excipientes da formulação foram também investigados por calorimetria diferencial de varrimento (DSC) usando um calorímetro Mettler Thermal Analysis System (Suíça). Termogramas de amostras de aproximadamente 10 mg das três composições foram obtidos por aquecimento a 10 °C/min, de 20 °C a 180 °C.

### Ensaio de libertação *in vitro*

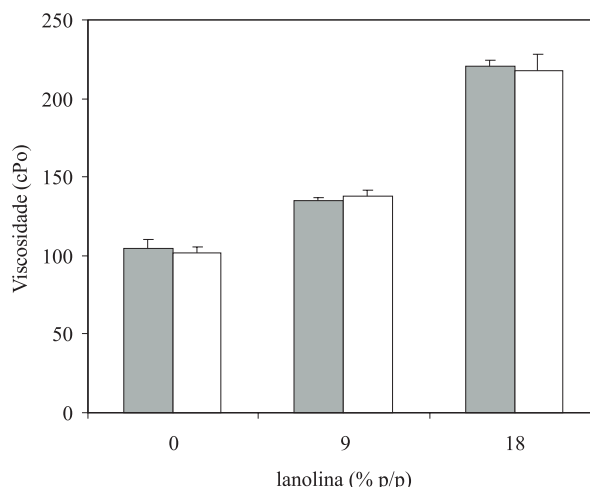
Os estudos de libertação, *in vitro*, de fármacos a partir de suspensões farmacêuticas estão geralmente limitados pela falta de metodologia oficial adoptada pelas farmacopeias. A literatura é rica em técnicas e equipamentos utilizados para este fim, sendo comuns exemplos de utilização de sistemas de difusão com membranas sintéticas de diálise (revisto por Stout *et al.*, 1991). Este tipo de sistemas tenta mimetizar *in vitro* o mecanis-



**Figura 1** - Célula de difusão vertical para ensaios de libertação *in vitro*. a) compartimento superior ou dador; b) compartimento inferior ou receptor; c) membrana de acetato de celulose; d) tubo lateral para recolha de amostras.

mo de funcionamento *in vivo* das suspensões oleosas injectáveis as quais actuam, na prática, como reservatórios do fármaco (Lee e Putnam, 2000). Os autores do presente trabalho optaram pois por uma metodologia que, embora inicialmente descrita para o estudo de formulações tópicas, se baseia nas técnicas descritas para os estudos de libertação a partir de suspensões farmacêuticas (revisto por Stout *et al.*, 1991).

A libertação *in vitro* do clembuterol a partir de suspensões em azeite e misturas azeite:lanolina a 9% e 18% respectivamente, foi estudada utilizando simples células de difusão de tipo vertical (Banakar, 1992) com dois compartimentos separados por uma membrana de acetato de celulose de 2,57 cm de diâmetro (fig.1). No compartimento superior foram colocados 4 ml da suspensão a ensaiar, contendo aproximadamente 50 mg do fármaco e o compartimento inferior foi totalmente preenchido com solução tampão de fosfato isotónico, pH 7,4, a qual foi agitada magneticamente. A membrana de acetato de celulose foi previamente humedecida com a solução tampão e a célula de difusão foi mantida em banho de água a 37 °C. A intervalos de tempo apropriados, amostras de 4 ml foram colhidas e mantidas em refrigeração a 4 °C até à determinação do respectivo teor de clembuterol por espectrofotometria UV/Vis a 241,5 nm (Hitachi U-2000 Spectrophotometer, Japão). Após cada colheita o volume inicial do líquido receptor foi repostado com 4 ml de solução tampão. Os resultados foram expressos em mg de clembuterol libertados por cm<sup>2</sup> de superfície de contacto entre os dois compartimentos da célula de difusão.



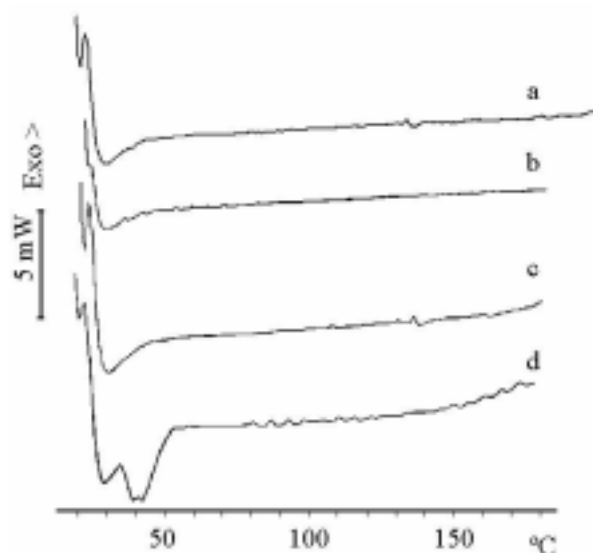
**Figura 2** - Variação da viscosidade dos excipientes antes (■) e após (○) aquecimento em estufa a 150 °C/2 h (média ± desvio padrão).

## Resultados

### Seleccção dos excipientes

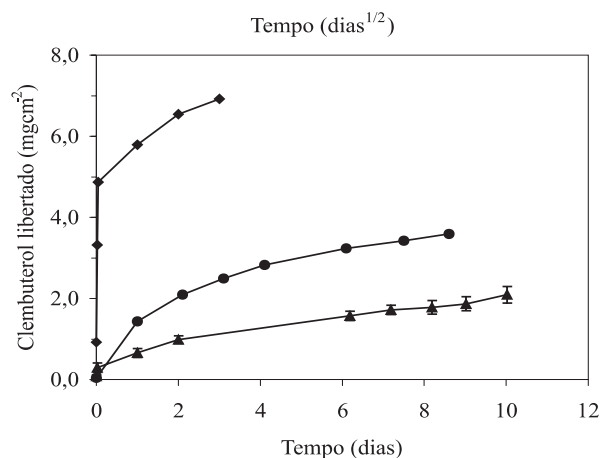
A obtenção de libertação prolongada em preparações para administração parentérica envolve geralmente a formulação de suspensões do fármaco ou a utilização de veículos oleosos de elevada viscosidade. O efeito prolongado final deve-se não só ao aumento da viscosidade, mas também à existência de um passo de dissolução do fármaco suspenso antes da sua absorção (Murdan e Florence, 2000). Por outro lado, no caso da via subcutânea, a substância intersticial da pele é rica em ácido hialurónico que confere grande viscosidade ao meio e dificulta a difusão dos medicamentos no tecido subcutâneo. Esta dificuldade de difusão pode ser utilizada com vantagem quando se pretende uma absorção lenta da substância a administrar (Nogueira Prista *et al.*, 1996). Em termos gerais, os factores que condicionam a absorção do fármaco formulado em suspensão incluem a própria viscosidade da suspensão e o diâmetro das partículas. De uma maneira geral, quanto menores forem as partículas e menor a sua distribuição granulométrica, maior será a superfície total da fase dispersa e, portanto, mais rápida a sua absorção. Deste modo o controlo da granulometria do pó permite regular a duração do efeito do medicamento (Murdan e Florence, 2000). A libertação contínua e prolongada do medicamento poderá então ser conseguida através do aumento da viscosidade da fase líquida, contribuindo simultaneamente para a estabilidade física da suspensão.

Os injectáveis oleosos apresentam as vantagens das formulações de libertação prolongada, designadamente a insolubilidade em meio aquoso, menor irritabilidade das formulações, redução de fenómenos de instabilidade do fármaco, redução das dosagens e melhor utilização racional do fármaco. O uso de excipientes oleosos em medicamentos injectáveis, sob a forma de soluções ou suspensões, é frequente pois constitui a abordagem



**Figura 3** - Termogramas dos excipientes utilizados na preparação da formulação injectável de clembuterol. a) azeite; b) lanolina em azeite (9% p/p); c) lanolina em azeite (18%, p/p); d) lanolina.

mais económica para obtenção de libertação prolongada de fármacos. Os excipientes lipídicos constituintes de suspensões oleosas de fármacos hidrossolúveis impedem durante algum tempo o contacto destes com os fluidos aquosos do organismo, protegendo-os e funcionando assim como um verdadeiro reservatório a partir do qual a substância activa é lentamente libertada (Lee e Putnam, 2000). Para que esta libertação ocorra o fármaco em suspensão deverá dissolver-se no veículo oleoso e difundir através deste, passando depois para os fluidos orgânicos aquosos (Lee e Putnam, 2000). No entanto, a selecção dos excipientes oleosos deve ser cuidadosa pois estes nem sempre retardam absorção dos fármacos (Murdan e Florence, 2000). O azeite é talvez dos veículos medicamentosos mais utilizados em tecnologia farmacêutica devido à sua tolerância e inocuidade, para além de ser um produto muito acessível nos países da área do mediterrâneo. Ao azeite foi adicionada lanolina, excipiente também muito utilizado, que na presente formulação actua como agente suspensor por aumento da



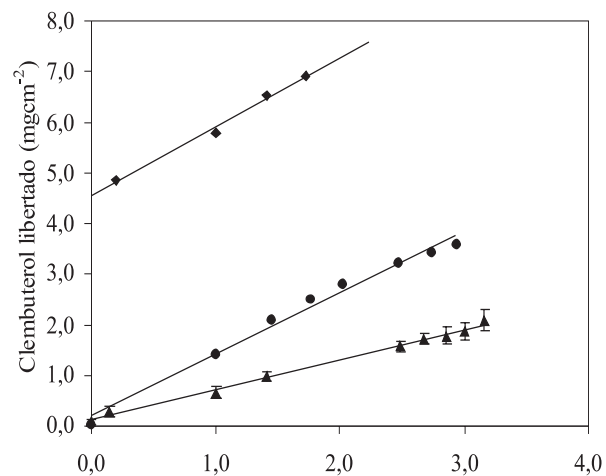
**Figura 4** - Perfis de libertação *in vitro* do clembuterol a partir dos excipientes testados. ♦ - azeite; ● - lanolina (9%) em azeite; ▲ - lanolina (18%) em azeite.

viscosidade da suspensão (Nogueira Prista *et al.*, 1996). Sendo um excipiente de origem ovina, é constituída principalmente por ésteres, álcoois livres, ácidos gordos livres e hidrocarbonetos, definida como um produto ceroso, purificado e anidro, obtido a partir da lã de ovinos (*Ovis aries* L), razão pela qual pode ser particularmente aplicada à presente preparação injectável que se destina à mesma espécie animal nos termos do protocolo experimental (Winfield, 2000).

A introdução de quantidades de 9% e 18% (p/p) de lanolina na suspensão de clembuterol contribuiu para um aumento consistente e previsível da viscosidade da mesma. Os valores de viscosidade obtidos ( $105 \pm 5,46$  cPo para o azeite,  $135 \pm 1,73$  cPo para a mistura azeite:lanolina a 9% e  $221 \pm 3,06$  cPo para a mistura azeite:lanolina a 18%) permitem o manuseio do injectável e não são afectados por um eventual passo de esterilização pelo calor seco, pois não foram observadas alterações significativas após aquecimento (fig. 2). Este não excedeu os 150 °C/2h por ser desaconselhado o uso de temperaturas superiores para esterilização do azeite e, principalmente, da lanolina (Nogueira Prista *et al.*, 1996; Winfield, 2000). No entanto, a estabilidade das misturas é confirmada pelos termogramas obtidos por DSC que demonstram a inexistência de fenómenos de degradação térmica ou quaisquer alterações físicas não só a 150 °C, mas também a valores de temperatura superiores, isto é, aqueles que são oficialmente recomendados (Ph. Eur.) para a esterilização de injectáveis oleosos pelo calor seco (fig. 3). Observa-se apenas o desaparecimento do pico correspondente ao intervalo de fusão da lanolina a 38-44 °C (fig. 3, termograma d) como consequência natural da sua dissolução no azeite (fig. 3 termogramas b e c).

### Estudos de libertação *in vitro*

No caso das suspensões, se a velocidade de dissolução da substância activa é inferior à velocidade de absorção, a libertação da mesma torna-se um factor limitante, condicionando a sua biodisponibilidade. Os



**Figura 5** - Aplicação do modelo matemático de Higuchi aos perfis de cedência *in vitro* do clembuterol a partir dos excipientes testados. ♦ - azeite ( $r^2=0,9914$ ); ● - lanolina (9%) em azeite ( $r^2=0,9863$ ); ▲ - lanolina (18%) em azeite ( $r^2=0,9944$ ).

estudos de libertação *in vitro* tornam-se assim um importante instrumento para assegurar que a cedência do fármaco siga a cinética desejada, constituindo os resultados obtidos uma indicação quanto à eficácia da forma farmacêutica estudada. O aumento de viscosidade resultante da introdução de 9% e 18% de lanolina na suspensão de clenbuterol em azeite provoca uma diminuição da velocidade de cedência do fármaco, o que se traduz num efeito de libertação prolongada, tal como pretendido (Fig. 4). Ao fim de 3 dias a suspensão preparada com azeite liberta cerca de 6,9 mgcm<sup>-2</sup>. A adição de 9% e 18% de lanolina diminuem a cedência para valores na ordem dos 3,6 mgcm<sup>-2</sup> ao fim de 9 dias e 2,0 mgcm<sup>-2</sup> ao fim de 10 dias respectivamente, o que se traduz num efeito de libertação prolongada (Fig. 4).

Como o fármaco se apresenta em suspensão no excipiente e a sua libertação *in vitro* se faz por difusão através de uma membrana, a cedência medicamentosa pode ser descrita matematicamente pelo modelo de difusão de Higuchi, que estabelece uma relação de proporcionalidade entre a quantidade de fármaco libertada e a raiz quadrada do tempo (Brossard e Wouessidjewe, 1990; Stout *et al.*, 1991), e cuja forma simplificada é a seguinte:

$$Q = \left[ \frac{D\varepsilon}{\tau} (2C_{tot} - C_s) C_s t \right]^{1/2}$$

Em que  $Q$  é a quantidade de fármaco libertado por unidade de área no tempo  $t$ ;  $D$  é o coeficiente de difusão do fármaco;  $\varepsilon$  e  $\tau$  são a porosidade e a tortuosidade da membrana, respectivamente;  $C_{tot}$  é a concentração total de fármaco na suspensão;  $C_s$  é a solubilidade do fármaco. Assumindo que o coeficiente de difusão e os outros parâmetros nesta equação se mantêm constantes ao longo do processo de libertação, esta pode ser reduzida a  $Q = Kt^{1/2}$ . Pela análise da equação se compreende que a velocidade de cedência é proporcional à raiz quadrada das concentrações e do coeficiente de difusão e assim susceptível de se fazer variar por modificação daqueles valores. O coeficiente de difusão pode ser alterado, fazendo variar a viscosidade do excipiente, pois segundo a equação de Einstein-Stokes para as partículas coloidais aquele coeficiente é inversamente proporcional à viscosidade do veículo (Nogueira Prista *et al.*, 1996). A aplicação deste modelo com a consequente linearização dos perfis de cedência, permite prever tempos de libertação total do clenbuterol de 15, 60 e 268 dias para os injectáveis preparados com a misturas contendo respectivamente 0%, 9% e 18% de lanolina (Fig. 5).

## Discussão

Os resultados obtidos apontam claramente para a possibilidade da utilização da mistura contendo 9% de lanolina como veículo de uma suspensão de libertação prolongada de clenbuterol. No entanto, o sistema *in vitro*

utilizado para aferição dos perfis de libertação do clenbuterol (Fig. 1) apresenta algumas limitações, tais como a agitação unilateral, o que pode contribuir para a acumulação do fármaco sobre a membrana. Este facto foi observado com a suspensão de clenbuterol em azeite puro, cuja baixa viscosidade permitiu a acumulação de cristais de fármaco sobre a membrana com a consequente libertação rápida de cerca de 5 mgcm<sup>-2</sup> (Fig. 4). Inicialmente descrito para o estudo de preparações farmacêuticas de aplicação tópica (Barry, 1988), este sistema pode ainda apresentar problemas adicionais quando se pretende efectuar ensaios prolongados. Por exemplo, podem verificar-se, além dos problemas já enunciados, perdas de rigor e dificuldades experimentais devidas à evaporação da solução tampão, razão pela qual têm vindo a ser descritos sistemas alternativos de fluxo horizontal, que as evitam (Banakar, 1992).

O resultados indicam que associação de duas técnicas frequentemente utilizadas para prolongar a absorção de fármacos em formulações parentéricas, isto é, a preparação de suspensões e o emprego de um veículo oleoso, constitui uma abordagem promissora para a administração de clenbuterol a animais sujeitos a restrição alimentar, como sejam aqueles que são criados em regime de extensão em países tropicais. Os excipientes oleosos constituídos por misturas de azeite e lanolina demonstraram ser adequados para preparação da suspensão injectável de clenbuterol, cuja viscosidade não é afectada pelo processo de esterilização pelo calor seco. Os estudos *in vitro* de cedência do clenbuterol demonstraram que a velocidade de cedência do fármaco pode ser manipulada de modo a obter o perfil de libertação mais adequado ao maneio em regime de extensão. Naturalmente, quaisquer extrapolações têm limitações pois cada animal pode apresentar idiosincrasias impossíveis de prever *in vitro*, como a reacção inflamatória ao traumatismo provocado pela injeção, possível deposição da suspensão no tecido subcutâneo, presença de enzimas e provável metabolização dos excipientes. Apesar disto deverão iniciar-se os trabalhos *in vivo* de forma a estudar o comportamento da suspensão em animais de laboratório e estabelecer uma correlação com os dados agora descritos.

## Bibliografia

- BAKER B.K., DARLYMPLE, R.H., INGLE, D.L. e RICKS, C.A. (1984). Use of a beta-adrenergic agonist to alter muscle and fat deposition in lambs. *J. Anim. Sci.*, 59, 1256-1261.
- BANAKAR, U.V. (1992). Dissolution testing devices. In: Banakar, U.V. (Ed.). *Pharmaceutical Dissolution Testing*. Marcel Dekker, New York. pp. 53-105.
- BARRY, B.W. (1988). Topical preparations. In: Aulton, M.E. (ed.), *Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design*. Churchill Livingstone. Edinburgh. pp 381-411.
- BRAMBILLA, G., LOIZZO, A., FONTANA, L., STROZZI, M., GUARINO, A. e SOPRANO, V. (1997). Food poisoning following consumption of clenbuterol-treated veal in Italy. *JAMA*, 278, 635.

- BROSSARD, C. E WOUESSIDJEWE, D. (1990). Contrôle de dissolution des formes pharmaceutiques orales solides à libération ralentie. *STP Pharma. Sci.*, 6, 728-741.
- BUYNE, J., DECUYPERE, E., HYGHEBAERT, G. E HERREMANS, M. (1991). The effect of clenbuterol supplementation on growth performance and on plasma hormone and metabolite levels of broilers. *Poultry Sci.* 70, 993-1002.
- CARDOSO, L.A. E STOCK, M.J. (1996). Effect of clenbuterol on growth and body composition during food restriction in rats. *J. Anim. Sci.* 74, 2245-2252.
- CARDOSO, L.A. E STOCK, M.J. (1998). Effect of clenbuterol on hormone levels and nitrogen and energy balance in food restricted rats. *J. Anim. Sci.* 76, 1012-1018.
- DALRYMPLE, R.H. E INGLE, D.L. (1987). Effects of the beta-agonist cimaterol on growth, food efficiency and carcass composition in poultry in the USA. In *Beta-agonists and their Effect on Animal Growth and Carcass Quality*. Elsevier Applied Science Publishers Ltd., Essex.
- EMEA/MRL/723/99 (2000). *Clenbuterol: Summary Report (2)*.
- FAO STATISTICAL DATABASES. (2000). Food and Agriculture Organisation of the United Nations. <http://apps.fao.org/>.
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA. (1997). 3<sup>rd</sup> Ed., Council of Europe, Strasbourg.
- FORD, J.L. (1988). Parenteral products. In: Aulton, M.E. (ed.), *Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design*. Churchill Livingstone. Edinburgh. pp 359-380.
- KUIPER, H.A., NOORDAM, M.Y., VAN DOOREN-FLIPSEN, M.M., SCHILT, R. E ROOS, A.H. (1998). Illegal use of beta-adrenergic agonist: European Community. *J. Anim. Sci.*, 76, 195-207.
- LEE, J.-C. E PUTNAM, M. (2000). Veterinary sustained-release parenteral products. In: Senior, J. e Radomsky, M. (Eds.), *Sustained-Release Injectable Products*. Interpharm Press, Denver, pp. 309-334.
- MEYER, H.H.D. E RINKE, L.M. (1991). The pharmacokinetics and residues of clenbuterol in veal calves. *J. Anim. Sci.*, 69, 4538-4544.
- MURDAN, S. E FLORENCE, A.T. (2000). Non-aqueous solutions and suspensions as sustained-release injectable formulations. In: Senior, J. e Radomsky, M. (Eds.), *Sustained-Release Injectable Products*. Interpharm Press, Denver, pp. 71-108.
- NOGUEIRA PRISTA, L., CORREIA ALVES, A. E MORGADO, R.M.R. (1996). *Tecnologia Farmacêutica*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- REEDS, P.J., HAY, S.M., DORWARD, P.M. E PALMER, R.M. (1988). The effect of beta agonists and antagonists on muscle growth and body composition of young rats. *Comp. Biochem. Physiol.*, 89C, 337-341.
- ROTHWELL, N.J. E STOCK, M.J. (1987). Influence of clenbuterol on energy balance, thermogenesis and body composition in lean and genetically obese Zucker rats. *Int. J. Obesity*, 11, 641-64.
- SMITH, D.J. (1998). The pharmacokinetics, metabolism, and tissue residues of beta-adrenergic agonists in livestock. *J. Anim. Sci.*, 76, 173-194.
- STOUT, P.J., HOWARD, S.A. E MAUGER, J.W. (1991). Dissolution of pharmaceutical suspensions. In: Swarbrick, J. e Boylan, J.C. (Eds.), *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Vol. IV. Marcel Dekker, New York. pp. 169-192.
- TAVEIRA, O. (1998). Estudo da Intervenção Metabólica do Clenbuterol em Ovinos Submetidos a Restrição Alimentar. Tese de mestrado de Medicina Veterinária e Zootécnia Tropical. FMV, Universidade Técnica de Lisboa.
- VITAL, M.A.B.F. (1996). Agonistas e antagonistas adrenergicos. In: Spinoza, H.S., Górnaiak, S.L. e Bernardi, M.M. (eds.), *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 65-74.
- WINFIELD, A.J. (2000). Lanolin. In: Kibbe, A.H. (Ed.), *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. The Pharmaceutical Press, London. pp. 286-287.
- WILLIAMSON, G. E PAYNE, W.J.A. (1980). Cattle Production. In: Rhind, W.J.A. (ed). *Animal Husbandry in the Tropics*. Longman Group Ltd, London. pp. 196.