

# TRABAJOS ORIGINALES ORIGINAL WORKS

---

## Estudio de la influencia de los factores de polimerización en la formación de nanopartículas de polibutil-cianoacrilato y la cinética de liberación de fármaco in vitro

*Study of influence of polymerization factors on formation of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles and in vitro drug release kinetics*

HARIVARDHAN-REDDY L, MURTHY RSR\*

Drug delivery research laboratory, Center of relevance and excellence in NDDS, Pharmacy Department, G.H. Patel building, M.S. University of Baroda, Vadodara-390002, Gujarat, India.

\*Autor de contacto: Teléfono: (0265) 2434187/2794051. Fax: (0265) 2418928

Correo electrónico: m\_rsr@rediffmail.com

### RESUMEN

Las nanopartículas de polibutil-cianoacrilato se sintetizaron mediante polimerización por dispersión y se caracterizaron mediante espectroscopía  $^1\text{H-NMR}$ , calorimetría diferencial de barrido y microscopía electrónica de transmisión. Se estudiaron propiedades de las partículas tales como el tamaño y el potencial zeta, y la influencia de la concentración y el tipo de estabilizador en el tamaño de las partículas. También se estudió la influencia de factores de polimerización tales como la concentración de monómero, la temperatura y el tiempo de polimerización en el tamaño y la distribución de las partículas, y su efecto en la eficacia de captura de las nanopartículas, utilizando clorhidrato de doxorubicina (DH) como fármaco modelo. Las concentraciones elevadas de monómero dieron lugar a la formación de partículas de mayor tamaño con distribución de tamaño bimodal y amplia y aumentaron la captura del fármaco. La polimerización a baja temperatura dio lugar a la formación de partículas más pequeñas, mientras que a temperatura elevada ( $60\text{ }^\circ\text{C}$ ) se produjo aglomeración y se redujo la captura del fármaco. Los tiempos de polimerización elevados no mostraron tener mucha influencia en el tamaño de las partículas, pero aumentaron la captura del fármaco. Se realizó la carga del fármaco en las nanopartículas mediante técnicas de incorporación y adsorción y se determinó la captura del fármaco. Las nanopartículas cargadas mediante técnicas de incorporación y adsorción mostraron una liberación rápida de fármaco en  $0,001\text{ N HCl}$ . La liberación de fármaco en ambos tipos de nanopartículas siguió la ecuación de Higuchi. También se intentó establecer una correlación crítica entre las propiedades de las partículas y el comportamiento de la liberación de fármaco, así como subrayar su importancia en diversas facetas de la administración de fármaco.

PALABRAS CLAVE: Polibutil-cianoacrilato. Nanopartícula. Doxorubicina. Polimerización. Captura de fármaco. Liberación de fármaco.

### ABSTRACT

*Poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles were synthesized by dispersion polymerization and characterized by  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy, differential scanning calorimetry and transmission electron microscopy. Particle properties such as zeta potential and size, and the influence of concentration and type of stabilizer on particle size were studied. The influence of polymerization factors such as monomer concentration, polymerization time and temperature on the particle size and distribution, and their effect on entrapment efficiency of the nanoparticles was studied, using doxorubicin hydrochloride (DH) as a model drug. High monomer concentrations lead to the formation of larger particles with broad and bimodal size distribution, and increased the drug entrapment. Polymerization at low temperatures resulted in smaller particles, and agglomeration was found at high temperature ( $60^\circ\text{C}$ ), with reduced drug entrapment. High polymerization times did not show much influence on particle size, but increased the drug entrapment. Drug loading into nanoparticles was*

**carried out by incorporation and adsorption techniques, and drug entrapment was determined. The nanoparticles loaded by incorporation and adsorption techniques showed rapid drug release in 0.001N HCl. Drug release from both types of nanoparticles followed Higuchi equation. An attempt was also made to critically correlate the particle properties and drug release behavior and emphasize its importance in various facets of drug delivery.**

KEY WORDS: Poly(butyl cyanoacrylate). Nanoparticle. Doxorubicin. Polymerization. Drug entrapment. Drug release.

## INTRODUCCIÓN

El desarrollo de sistemas de transporte coloidales no ha constituido un área de gran interés en el campo de la administración de fármacos. Las nanopartículas poliméricas son los sistemas de transporte que se han investigado en mayor profundidad. Las nanopartículas de polialkil-cianoacrilato han empezado a suscitar recientemente un creciente interés en el ámbito de la administración de fármacos dirigida debido a su facilidad de síntesis, biodegradabilidad, capacidad para alterar la biodistribución de los fármacos y reducida toxicidad.<sup>1-5</sup> La polimerización aniónica de los monómeros de alquil cianoacrilato en un medio acuoso ácido con un estabilizador da lugar a la formación de nanopartículas de elevada porosidad y superficie lisa.<sup>1,6</sup> Los parámetros experimentales como el pH y la temperatura demostraron tener una mayor influencia en las propiedades de las partículas sintetizadas.<sup>7</sup> La polimerización con un pH bajo favorece la formación de nanopartículas, mientras que un pH superior a 3,5 acelera la síntesis de polímeros y da lugar a la formación de agregados de mayor tamaño.<sup>7</sup> La preparación de nanopartículas que contienen un fármaco se puede realizar mediante la disolución del fármaco en un medio de polimerización antes de la adición de monómero o mediante la adsorción del fármaco en la superficie de la nanopartícula previamente sintetizada. Se han publicado varios estudios sobre las nanopartículas de polialkil-cianoacrilato relacionados con la incorporación de diversos fármacos<sup>5, 8-10</sup>, la estabilidad<sup>11</sup>, la toxicidad<sup>1</sup> y la biodistribución.<sup>12</sup> Sin embargo, se ha prestado poca atención al estudio de la influencia real de los factores de polimerización en las propiedades de las partículas y su efecto en la eficacia de captura de las nanopartículas para la obtención de una formulación optimizada. Respecto a las posibilidades de aplicación, las propiedades de las partículas tales como el tamaño, la distribución de tamaño y las características de la superficie tienen una gran importancia, especialmente para la administración de fármacos dirigida, ya que influyen en la biodistribución de las nanopartículas.

## INTRODUCTION

Development of colloidal carrier systems has now been an area of great interest in the field of drug delivery. Amongst these carriers, polymeric nanoparticles are the most extensively investigated. Poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles have recently gained increasing interest in targeting and drug delivery, because of the ease of synthesis, biodegradability, ability to alter bio-distribution of drugs and lower toxicity.<sup>1-5</sup> Anionic polymerization of alkyl cyanoacrylate monomers in aqueous acidic media containing a stabilizer leads to the formation of nanoparticles with high porosity and smooth surface.<sup>1,6</sup> The experimental parameters such as pH and temperature were reported to have greater influence on the properties of particles formed.<sup>7</sup> Polymerization at low pH favor nanoparticle formation, but pH > 3.5 leads to rapid polymer formation resulting in larger aggregates rather than nanoparticles.<sup>7</sup> Drug containing nanoparticles can be prepared either by dissolving drug in polymerization medium prior to the monomer addition, or by adsorption of drug on the preformed nanoparticle surface. Several reports were published on polyalkyl cyanoacrylate nanoparticles regarding incorporation of various drugs<sup>5, 8-10</sup>, stability<sup>11</sup>, toxicity<sup>1</sup> and biodistribution.<sup>12</sup> But a little attention has been given to study clearly the influence of polymerization factors on the particle properties, and their effect on entrapment efficiency of nanoparticles to obtain an optimized formulation. In view of applicability, the particle properties such as size, size distribution and surface characteristics have great importance especially for targeted drug delivery<sup>13</sup>, as they influence the biodistribution of nanoparticles.

Doxorubicin hydrochloride (DH) is an antineoplastic anthracycline antibiotic widely used in the treatment of acute lymphoblastic leukemia, acute myeloblastic leukemia, malignant lymphoma, hodgkin's disease and breast carcinoma. The anthracycline ring is lipophilic, and the molecule is amphoteric having acidic functions in the ring phenolic groups and a basic function in the sugar amino group. DH causes cytotoxicity

El clorhidrato de doxorubicina (DH) es un antibiótico de antraciclina antineoplástico ampliamente utilizado en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda, la leucemia mieloblástica aguda, los linfomas malignos, la enfermedad de Hodgkin y el carcinoma mamario. El anillo de antraciclina es lipofílico y la molécula es anfotérica, con funciones ácidas en los grupos fenólicos del anillo y una función básica en el grupo de aminoazúcares. El DH causa citotoxicidad mediante la intercalación específica del núcleo de la antraciclina planar con la doble hélice del ADN.<sup>14</sup>

Las nanopartículas de polibutil-cianoacrilato (PBC) que contienen doxorubicina pueden ser uno de los posibles sistemas de transporte para la administración de fármacos, debido a su biodegradabilidad y a las propiedades de su superficie (carga negativa). Estos sistemas se pueden utilizar eficazmente en la quimioterapia del cáncer, especialmente en los casos de carcinomatosis peritoneal y carcinomas linfáticos. Partiendo de la considerable importancia de las propiedades de las partículas en tales aplicaciones, en este informe se presenta un estudio detallado del efecto de factores de polimerización tales como la concentración de monómero, el tiempo y la temperatura de polimerización en la distribución y el tamaño de las partículas, y la influencia de estos parámetros en la eficacia de captura de las nanopartículas. Se investigó el efecto del tipo de estabilizador y de su concentración en el tamaño y la distribución de las partículas. También se estudió la cinética de liberación de fármaco de las nanopartículas preparadas mediante incorporación y adsorción de fármaco.

## MATERIALES

el monómero de n-butyl cianoacrilato fue proporcionado gratuitamente por Sun Pharmaceutical Industries Limited (India), las muestras de dextran 40 (peso molecular 40.000) y dextran 70 (peso molecular 70,000) fueron proporcionadas también de forma gratuita por Claris life sciences limited (India). El sulfato de dextran se obtuvo de Hi-media (India). La muestra de clorhidrato de doxorubicina fue proporcionada gratuitamente por RPG life sciences (India). Todos los demás productos químicos y reactivos utilizados en el estudio eran de grado analítico. El

ty by specific intercalation of planar anthracycline nucleus with the DNA double helix.<sup>14</sup>

Poly(butyl cyanoacrylate) (PBC) nanoparticles containing doxorubicin could be one of the potential carriers for drug delivery, because of their biodegradability and surface properties (negative charge). These systems could be effectively used in the chemotherapy of cancer especially in peritoneal carcinomatosis and lymphatic carcinomas. The particle properties being considerably important in such applications, the present communication reports a detailed study of the effect of polymerization factors such as monomer concentration, polymerization temperature and time on particle size and distribution, and influence of these parameters on entrapment efficiency of nanoparticles. The effect of stabilizer type and concentration on particle size and distribution was investigated. Kinetics of drug release from nanoparticles prepared by incorporation and adsorption of drug was also studied.

## MATERIALS

n-butyl cyanoacrylate monomer was gifted by Sun Pharmaceutical Industries Limited (India), Dextran 40 (molecular weight 40,000) and Dextran 70 (molecular weight 70,000) were gift samples from Claris life sciences limited (India). Dextran sulfate was obtained from Hi-media (India). Doxorubicin hydrochloride was a gift sample from RPG life sciences (India). All other chemicals and reagents used in the study were of analytical grade. Water used in the study was distilled and filtered through 0.22 µm filter (Pall, India) before use.

## METHODS

### *Synthesis of poly(butyl cyanoacrylate) (PBC) nanoparticles:*

Poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles were prepared by dispersion polymerization by slight modification of the previously reported method.<sup>11</sup> Briefly, monomer was added drop-wise into the acidic medium (0.001N HCl) containing dextran 70 under controlled stirring at 700 RPM. Polymerization was continued for 3h, after which the nanoparticle dispersion was neutralized to pH

agua utilizada en el estudio era agua destilada y filtrada a través de un filtro de 0,22  $\mu$  (Pall, India) antes de su uso.

## MÉTODOS

### *Síntesis de nanopartículas de polibutil-cianoacrilato (PBC):*

Las nanopartículas de polibutil-cianoacrilato se prepararon mediante polimerización por dispersión con una ligera modificación respecto al método empleado anteriormente.<sup>11</sup> En síntesis, el monómero se añadió mediante goteo al medio ácido (0,001 N HCl) que contenía dextran 70 removiendo de forma controlada a 700 rpm. La polimerización continuó durante 3 horas, transcurridas las cuales se neutralizó la dispersión de nanopartículas hasta un pH de 7,0 mediante un tampón de fosfato (pH 7,4) con NaOH y se siguió removiendo durante 1 hora para obtener una polimerización completa.

### *Síntesis de nanopartículas de polibutil-cianoacrilato cargadas con doxorubicina (DPBC)*

La preparación de las nanopartículas de DPBC fue similar a la de las nanopartículas de PBC. Se disolvieron DH y dextran 70 en 0,001 N HCl y se añadió lentamente el monómero mediante goteo al medio de polimerización removiendo de forma constante a 700 rpm. Después de 3 horas de polimerización, la dispersión se neutralizó hasta un pH de 7,0 mediante un tampón de fosfato de pH 7,4 y se siguió removiendo durante 1 hora para obtener una polimerización completa.

### *Estimación de doxorubicina en las nanopartículas de DPBC:*

La dispersión de nanopartículas se centrifugó a 15.000 rpm durante 30 minutos en un centrifugador por enfriamiento (Remi C24, Remi instruments, India). Se decantó el sobrenadante y el sedimento se lavó tres veces con agua destilada para separar el fármaco libre de las nanopartículas y se liofilizó. Las nanopartículas liofilizadas se pesaron y se disolvieron en metanol, y se analizaron las soluciones en un espectrofotóme-

7.0 with 7.4 pH phosphate buffer containing NaOH (7.4 pH PB), and stirring was continued for 1h to allow complete polymerization.

### *Synthesis of doxorubicin loaded poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles (DPBC)*

DPBC nanoparticles were prepared similar to PBC nanoparticles. DH and dextran 70 were dissolved in 0.001N HCl, and monomer was slowly added drop-wise into the polymerization medium, under continuous stirring at 700 RPM. After 3h of polymerization, the dispersion was neutralized to pH 7.0 with 7.4 pH PB, and stirring was continued for 1h to allow complete polymerization.

### *Estimation of doxorubicin in DPBC nanoparticles:*

The nanoparticulate dispersion was centrifuged at 15000 RPM for 30 min in a cooling centrifuge (Remi C24, Remi instruments, India). The supernatant was decanted and sediment was washed thrice with distilled water to separate the free drug from nanoparticles, and lyophilized. The lyophilized nanoparticles were weighed and dissolved in methanol, and the solutions were analyzed in UV-Visible spectrophotometer (Hitachi U 2000, Japan) at 495 nm.

### *Characterization of nanoparticles*

#### *<sup>1</sup>H-NMR spectroscopy*

<sup>1</sup>H-NMR spectrum of PBC nanoparticles was recorded on FT-NMR Avance 400 MHz Fourier transform nuclear magnetic resonance spectrometer (Bruker-Biospin, AG, Switzerland). The nanoparticles were dissolved in chloroform-d<sub>1</sub> (Merck, Germany) and transferred to a 5 mm NMR tube. The sample was spinned at 20 RPS at a power level of -4.0db, and pulse length of 5  $\mu$ s, with a delay time of 10 s. NMR tube containing sample was placed in 5 mm broad band probe head, and pulse programming was performed at Zg (zero go) with sweep width of 18 ppm. The spectrum of sample was recorded after carrying out 32 scans.

tro UV-Visible (Hitachi U 2000, Japón) a 495 nm.

### *Caracterización de las nanopartículas*

#### <sup>1</sup>Espectroscopía H-NMR

<sup>1</sup>El espectro H-NMR de las nanopartículas de PBC se registró en un espectrómetro de resonancia magnética nuclear FT-NMR Avance Fourier Transform de 400 MHz (Bruker-Biospin, AG, Suiza). Las nanopartículas se disolvieron en cloroformo-d<sub>1</sub> (Merck, Alemania) y se transfirieron a un tubo de RMN de 5 mm. La muestra se centrifugó a 20 rps a un nivel de potencia de -4,0 db, con una longitud de pulso de 5 μs y un tiempo de demora de 10 s. El tubo de RMN que contenía la muestra se colocó en una cabeza de sonda de banda ancha de 5 mm y se realizó una programación del pulso con paso por cero con un ancho de barrido de 18 ppm. El espectro de la muestra se registró después de 32 barridos.

#### *Calorimetría diferencial de barrido (CDB)*

Los análisis mediante CDB de las nanopartículas se realizaron en un calorímetro diferencial de barrido (Mettler Toledo, Suiza) con una velocidad de calentamiento de 10 °C por minuto en un rango comprendido entre 50 y 350 °C.

#### *Microscopía electrónica de transmisión (MET)*

Los estudios de MET se realizaron con el microscopio electrónico de transmisión Philips Technai-20. Las nanopartículas se dispersaron en agua destilada desionizada y se colocó una gota de la dispersión diluida en una rejilla de cobre con una película de carbono de 200 mesh. Se utilizó un 2% de uranyl-acetato para teñir las nanopartículas.

#### *Medición del tamaño de las partículas*

La medición del tamaño de las partículas se realizó por dispersión de luz dinámica utilizando el analizador de tamaño de partículas Malvern Hydro 2000 SM (Malvern instruments, RU). La

#### *Differential scanning calorimetry (DSC)*

DSC analysis of the nanoparticles was carried out in Mettler Toledo differential scanning calorimeter (Mettler Toledo, Switzerland) at a heating rate of 10°C per minute in the range of 50°C to 350°C.

#### *Transmission electron microscopy (TEM)*

TEM studies were performed in Philips Technai-20 transmission electron microscope. Nanoparticles were dispersed in de-ionized distilled water and one drop of the diluted dispersion was placed on 200-mesh carbon coated copper grid. 2% uranyl acetate was used as staining agent for nanoparticles.

#### *Particle size measurement*

Particle size measurement was carried out by laser scattering using Malvern Hydro 2000 SM particle size analyzer (Malvern instruments, UK). Aqueous nanoparticulate dispersion was added to the sample dispersion unit containing stirrer and stirred in order to minimize the inter particle interactions, and laser obscuration range was maintained between 10-20%. The analysis was performed thrice and average values were taken.

The number of particles (N<sub>p</sub>) was calculated by the following equation<sup>15</sup>,

$$N_p = 6 M_0 X_m / \pi \rho D_n^3.$$

Where D<sub>n</sub> is a number average diameter of the polymer particles obtained from dynamic light scattering, X<sub>m</sub> is fractional conversion, M<sub>0</sub> is amount of monomer charged in g/cm<sup>3</sup> into the polymerization medium, ρ is the density of the polymer in g/cm<sup>3</sup> and N<sub>p</sub> is number of particles/cm<sup>3</sup>.

#### *Zeta potential measurement*

Zeta potential of nanoparticles was measured in Malvern Zetasizer 3000 HS<sub>A</sub> (Malvern Instruments, UK). The aqueous nanoparticulate dispersion was diluted in various media such as 0.001 N HCl, 0.9% saline, 7.4 pH phosphate buffer and 8.0 pH tris buffer, and the zeta potential was measured.

dispersión acuosa de nanopartículas se añadió a la unidad de dispersión de la muestra que contenía un agitador y se removió para minimizar las interacciones entre las partículas, manteniendo un intervalo de oscurecimiento de láser comprendido entre el 10 y el 20%. El análisis se realizó tres veces y se consideraron los valores medios.

El número de partículas ( $N_p$ ) se calculó mediante la siguiente ecuación<sup>15</sup>:

$$N_p = 6 M_o X_m / \pi \rho D_n^3.$$

Donde  $D_n$  es el valor medio del diámetro de las partículas de polímero obtenido mediante dispersión de luz dinámica,  $X_m$  es una conversión fraccional,  $M_o$  es la cantidad de monómero cargada en el medio de polimerización medida en g/cm<sup>3</sup>,  $\rho$  es la densidad del polímero en g/cm<sup>3</sup> y  $N_p$  es el número de nanopartículas por cm<sup>3</sup>.

### *Medición del potencial zeta*

La determinación del potencial zeta de las nanopartículas se realizó con un equipo Malvern Zetasizer 3000 HS<sub>A</sub> (Malvern Instruments, RU). La dispersión acuosa de nanopartículas se diluyó en varios medios (0,001 N HCl, solución salina al 0,9 %, tampón de fosfato de pH 7,4 y tampón tris de pH 8,0) y se midió el potencial zeta.

### *Adsorción de fármaco en las nanopartículas de PBC*

Se estudió la adsorción de DH en las nanopartículas de PBC a varios pH (3,0, 5,0, 7,0 y 8,0). Se sintetizaron las nanopartículas de PBC y se ajustó el pH de las dispersiones con una solución de 0,1 N NaOH. A continuación, la solución acuosa de DH se añadió a las dispersiones removiendo simultáneamente y se incubó a una temperatura de  $37 \pm 2$  °C durante intervalos de tiempo predeterminados. Una vez finalizado el período de incubación, se centrifugaron las dispersiones y se decantó el sobrenadante. El sedimento se volvió a dispersar en agua destilada y se liofilizó. El liofilizado se pesó y se disolvió en metanol, y se calculó el contenido de fármaco de las soluciones en un espectrofotómetro UV-Visible (Hitachi U 2000, Japón) a 495 nm.

### *Drug adsorption to PBC nanoparticles*

Adsorption of DH to PBC nanoparticles was studied at various pH such as 3.0, 5.0, 7.0 and 8.0. PBC nanoparticles were synthesized, and the dispersions were adjusted to different pH with 0.1N NaOH solution. Aqueous solution of DH was then added to the dispersions under stirring, and incubated at  $37 \pm 2$  °C for predetermined time intervals. After incubation period, the dispersions were centrifuged and supernatant was decanted. The sediment was re-dispersed in distilled water and lyophilized. The lyophilizate was weighed and dissolved in methanol, and solutions were analyzed for drug content in UV-Visible spectrophotometer (Hitachi U 2000, Japan) at 495 nm.

### *Drug release from DPBC nanoparticles*

Release of DH from DPBC nanoparticles was performed in 0.001N HCl and 0.9% saline. Dialysis bag technique was used for the release study as reported by Marchal-Heussler et al.<sup>8</sup> The aqueous nanoparticulate dispersion was placed in cellulose dialysis bag (Hi-Media, cutoff 5000) and is sealed at both ends. The dialysis bag was dipped in the receptor compartment containing dissolution medium, which was stirred continuously at 100 rpm maintained at  $37 \pm 2$  °C. The receptor compartment was closed to prevent evaporation of dissolution medium. Samples were withdrawn at regular time intervals and the same volume was replaced by fresh dissolution medium. The samples were analyzed in UV-Visible spectrophotometer at 495 nm. All experiments were repeated thrice and the average values were taken.

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Synthesis and mechanism of formation of PBC nanoparticles:*

PBC nanoparticles were synthesized by dispersion polymerization of n-butyl cyanoacrylate by slow and drop-wise addition of monomer into the polymerization medium containing stabilizer. The mechanistic events involved in the polymerization are discussed here. Controlled concentration of hydroxyl ions present in the medium,

### ***Liberación de fármaco de las nanopartículas de DPBC***

La liberación de DH de las nanopartículas de DPBC se realizó en 0,001 N HCl y solución salina al 0,9%. Para el estudio de la liberación se utilizó la técnica de la bolsa de diálisis referida por Marchal-Heussler et al.<sup>8</sup> La dispersión acuosa de nanopartículas se colocó en una bolsa de diálisis de celulosa (Hi-Media, máximo 5000) y se selló por ambos lados. La bolsa de diálisis se introdujo en un compartimento receptor que contenía un medio de disolución, que se removió continuamente a 100 rpm y se mantuvo a una temperatura de  $37 \pm 2$  °C. El compartimento receptor se cerró para evitar la evaporación del medio de disolución. Las muestras se fueron retirando a intervalos de tiempo regulares y el volumen retirado se sustituyó por un medio de disolución fresco. Las muestras se analizaron en el espectrofotómetro UV-Visible a 495 nm. Todos los experimentos se repitieron tres veces y se consideraron los valores medios.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### ***Síntesis y mecanismo de formación de las nanopartículas de PBC:***

Las nanopartículas de PBC se sintetizaron mediante polimerización por dispersión de n-butilcianoacrilato añadiendo lentamente monómero mediante goteo al medio de polimerización que contenía el estabilizador. En esta sección se tratarán los aspectos mecanicistas implicados en el proceso de la polimerización. La concentración controlada de los iones hidróxilos presentes en el medio hace que las unidades monoméricas empiecen a formar oligómeros. Estos oligómeros se van propagando y la longitud de sus cadenas aumenta hasta alcanzar un nivel crítico a partir del cual se produce una reducción de la solubilidad de los oligómeros y éstos salen de la fase acuosa para formar partículas primarias (proceso de nucleación homogénea). Las gotitas dispersas de monómero migran a las partículas primarias dando lugar a la formación de estructuras hinchadas. El monómero de las partículas primarias hinchadas continúa su proceso de polimerización mediante la entrada y propagación de iones que produce un crecimiento de la par-

te iniciar monoméricos unidades para formar oligómeros. Estos oligómeros se propagan, aumentan en longitud y experimentan una reducción de solubilidad en la fase acuosa tras alcanzar una longitud crítica de cadena, entonces precipitan fuera de la fase acuosa para formar partículas primarias (termedas como nucleación homogénea). El monómero difunde desde las gotitas dispersas hacia las partículas primarias dando lugar a la formación de estructuras hinchadas. El monómero en las partículas primarias hinchadas se polimeriza por entrada de iones y su propagación dando lugar al crecimiento de la partícula, que continúa hasta que todos los monómeros de las gotitas dispersas son utilizados. En esta etapa, el estabilizador cubre la superficie de la partícula y causa estabilización por el mecanismo de repulsión estérica.

### ***Characterization of nanoparticles***

PBC nanoparticles were characterized by <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy [Figure 1]. The results obtained were tabulated (Table 1) indicating the peak position, peak multiplicity and number of protons. The spectrum confirms the presence of all functional groups of polymer and its complete formation.

Figure 2 shows DSC thermograms of both PBC and DPBC nanoparticles. PBC nanoparticles showed glass transition temperature (T<sub>g</sub>) at 192.9°C, and a  $\Delta H$  value of 1230 mJ. DPBC nanoparticles showed T<sub>g</sub> at 189.7°C and  $\Delta H$  value of 1546 mJ.

Table 2 shows the zeta potential of PBC and DPBC nanoparticles in four different media such as 0.001N HCl, 0.9% saline, 7.4 pH phosphate buffer and 8.0 pH tris buffer. Zeta potential of both PBC and DPBC nanoparticles increased with increase in pH, being high in 8.0 pH tris buffer and low in 0.001N HCl. The results obtained were in accordance with that reported by Muller et al.<sup>16</sup> for alkyl cyanoacrylates such as polymethyl, polyethyl, polyisobutyl and polyisohexyl nanoparticles. This trend is due to increase in degree of dissociation of free acrylic acid groups of polymer with increase in pH, being low at low pH values. At the same time, the contribution of dextran in observed high zeta potential values of nanoparticles due to its dissociation in aqueous medium cannot be ruled out.

tícula que continúa hasta que se han utilizado todas las gotitas de monómero. En esta fase, el estabilizador cubre la superficie de la partícula y causa una estabilización mediante un mecanismo de repulsión estérica.

### *Caracterización de las nanopartículas*

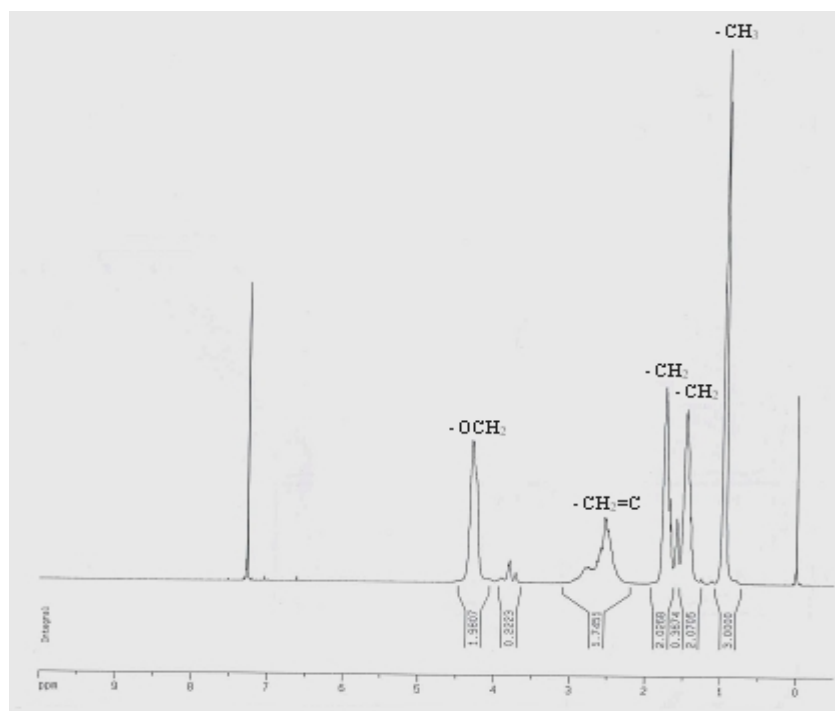
Las nanopartículas de PBC se caracterizaron mediante espectroscopía H-NMR<sup>1</sup> [Figura 1]. Los resultados obtenidos se tabularon (Tabla 1) indicando la posición máxima, la multiplicidad máxima y el número de protones. El espectro confirma la presencia de todos los grupos funcionales de polímero y su completa formación.

La Figura 2 muestra los termogramas de CDB de las nanopartículas de PBC y DPBC. Las nanopartículas de PBC mostraron una temperatura de transición vítrea de 192,9 °C y un valor  $\Delta H$  de 1.230 mJ. Las nanopartículas de DPBC mostraron una temperatura de transición vítrea de 189,7°C y un valor  $\Delta H$  de 1.546 mJ.

La Tabla 2 muestra el potencial zeta de las nanopartículas de PBC y DPBC en cuatro medios diferentes: 0,001 N HCl, solución salina al 0,9%, tampón de fosfato de pH 7,4 y tampón tris de pH 8,0. Tanto el potencial zeta de las nanopartículas de PBC como el de las nanopartículas de DPBC aumentó al incrementar el pH, con un resultado alto en el tampón tris de pH 8,0 y bajo en 0,001 N HCl. Los resultados coincidieron con los obtenidos por Muller et al.<sup>16</sup> para las nanopartículas de polialkil-cianoacrilatos como el polimetil, polietil, polisobutil y polisohexil cianoacrilato. Esta tendencia se debe a que el incremento de pH produce un aumento del grado de disociación de los grupos de ácidos acrílicos libres del polímero, que disminuye al reducir el pH. Al mismo tiempo, no se puede descartar la contribución del dextran en el incremento que se aprecia en los valores de potencial zeta de las nanopartículas debido a su disociación en medio acuoso.



**FIGURA 1.** <sup>1</sup>H-NMR de polibutil-cianoacrilato.  
**FIGURE 1.** <sup>1</sup>H-NMR spectrum of Poly(butyl cyanoacrylate).

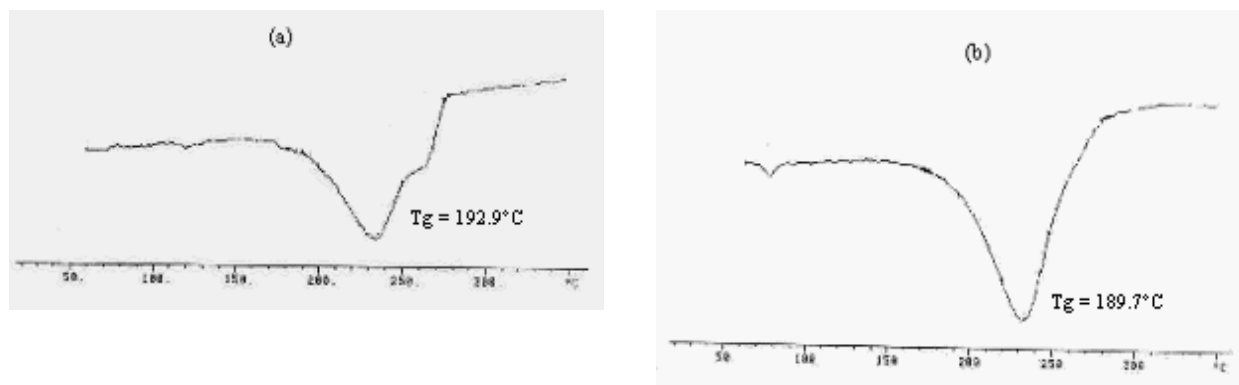


**TABLA 1.** Resultados del espectro <sup>1</sup>H-NMR de las nanopartículas de PBC.

**TABLE 1.** Results of <sup>1</sup>H-NMR spectrum of PBC nanoparticles.

Nº de muestra <i>S.No.</i>	Posición máxima (ppm) <i>Peak position (ppm)</i>	Multiplicidad <i>Multiplicity</i>	Nº de protones <i>No. of protons</i>
1	0,96	Multiplete	3
2	1,42	Multiplete	2
3	1,74	Multiplete	2
4	2,53	Multiplete	2
5	4,28	Triplete deformado	2
6	7,26	Singlete	2

**FIGURA 2.** Termogramas de CDB de (a) nanopartículas de PBC y (b) nanopartículas de DPBC.  
**FIGURE 2.** DSC thermograms of (a) PBC nanoparticles and (b) DPBC nanoparticles.



**TABLA 2.** Valores de potencial zeta de nanopartículas de PBC y DPBC.

**TABLE 2.** Zeta potential values of PBC and DPBC nanoparticles.

Medio de dispersión <i>Dispersion medium</i>	NP de PBC <i>PBC NPs</i>	NP de DPBC <i>DPBC NPs</i>
0,001 N HCl	-3,7	6,3
Solución salina 0,9% <i>0.9 % Saline</i>	-11,9	-4,3
Tampón de fosfato pH 7,4 <i>7.4 pH Phosphate buffer</i>	-30,4	-6,7
Tampón tris pH 8,0 <i>8.0 pH Tris buffer</i>	-42,8	-16,4

PBC = polibutil-cianoacrilato, DPBC = polibutil-cianoacrilato cargado con doxorubicina, NP = nanopartículas.  
 PBC = Poly(butyl cyanoacrylate), DPBC = Doxorubicin loaded poly(butyl cyanoacrylate), NPs = nanoparticles.

La incorporación de DH a las nanopartículas provocó una reducción del potencial zeta en todos los medios. Las nanopartículas de DPBC mostraron un potencial zeta positivo en 0,001 N HCl y una drástica reducción del potencial zeta en el tampón de fosfato de pH 7,4 y el tampón tris de pH 8,0 en comparación con las nanopartículas de PBC. Esto se debe probablemente a la adsorción del fármaco en la superficie de la nanopartícula durante la polimerización, que da lugar a una ocultación de la carga polimérica. Hawley et al.<sup>17</sup> observaron una reducción similar del potencial zeta de las nanosferas de poli(DL-láctido-co-glicólido) revestidas de poloxámero.

El potencial zeta de las nanopartículas tiene una gran importancia para la administración de fármacos a través de membranas biológicas. La relevancia de esta propiedad es especialmente significativa en el caso de la administración de fármacos a través de los vasos linfáticos, en la

Incorporation of DH into nanoparticles resulted in a reduction in zeta potential in all the media. DPBC nanoparticles exhibited positive zeta potential in 0.001N HCl, and a drastic reduction in zeta potential in phosphate buffer pH 7.4 and tris buffer pH 8.0 in comparison to PBC nanoparticles. This is probably due to drug adsorption on nanoparticle surface during polymerization, leading to masking of polymeric charge. Similar reduction in zeta potential of poloxamer coated poly(DL-Lactide-co-glycolide) nanospheres was reported by Hawley et al.<sup>17</sup>

Zeta potential of nanoparticles becomes increasingly important, when delivering drugs through biological membranes. This is especially true in case of lymphatic delivery, where the interstitium of lymphatic system being negatively charged, freely allows the anionic particles to penetrate<sup>18</sup> aiding in high particle concentration at required site. In such cases, poly(butyl cya-

que la carga negativa del intersticio del sistema linfático permite una libre penetración de las partículas aniónicas<sup>18</sup> que contribuye al aumento de la concentración de partículas en el lugar necesario. En estos casos, las nanopartículas de polibutil-cianoacrilato podrían constituir un sistema benéfico para la administración de fármacos.

### *Efecto de los factores de polimerización en el tamaño y la distribución de las partículas*

#### Concentración de monómero

Para estudiar el tamaño y el patrón de distribución de las partículas, se midió el tamaño de las nanopartículas obtenidas con diferentes concentraciones de monómero. Se seleccionaron concentraciones de monómero comprendidas entre 0,5% v/v y 4% v/v. El tamaño de las partículas obtenidas fue menor con concentraciones bajas de monómero y aumentó al incrementar la concentración de monómero, con un tamaño máximo a 4% v/v. No obstante, en estos casos el patrón de distribución de las partículas es más importante que su tamaño medio. La Figura 3 muestra la representación compilada de las curvas de tamaño de las nanopartículas con diferentes concentraciones de monómero. Los resultados fueron diferentes de los obtenidos por Douglas et al.<sup>19</sup>, que mostraban un patrón indefinido de tamaño de partículas con concentraciones de monómero superiores al 1% v/v. En la figura se aprecia un claro desplazamiento de las curvas de tamaño hacia valores de diámetro mayores al aumentar las concentraciones de monómero. También se realizó otra observación importante con relación a la curva de distribución. Las curvas se abrieron al utilizar concentraciones altas de monómero mostrando una clara distribución bimodal con concentraciones superiores al 3,5% v/v, mientras que el efecto apenas fue apreciable a 3% v/v. La apertura de las curvas conducente a una distribución bimodal a concentraciones altas de monómero se puede explicar por el mecanismo de la coagulación. Con concentraciones bajas de monómero (0,5% v/v), la cantidad de monómero que se puede polimerizar es baja y se distribuye uniformemente por las partículas primarias dando lugar al crecimiento controlado de las partículas y a su coagulación. Además, a

noacrylate) nanoparticles could be a beneficial system for drug delivery.

### *Effect of polymerization factors on particle size and distribution*

#### Monomer concentration

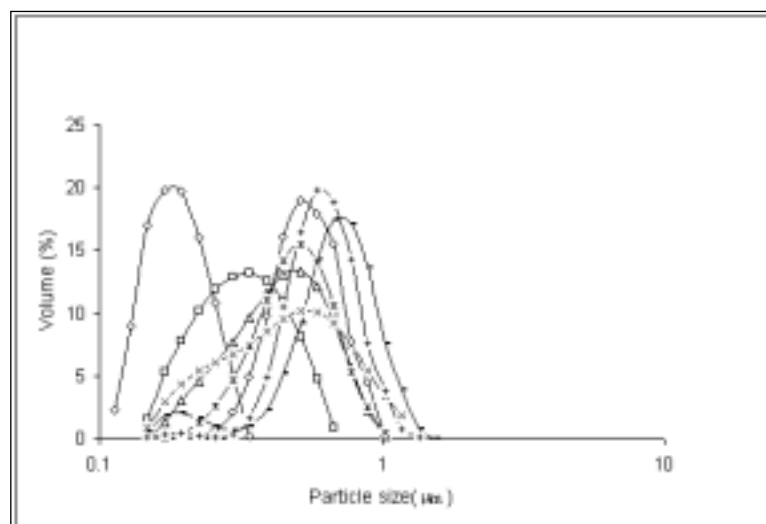
Particle size measurements were done for nanoparticles obtained with various monomer concentrations to study the particle size and distribution pattern. Monomer concentrations were selected in the range of 0.5% v/v to 4% v/v. Smaller particles were obtained at low monomer concentration, and the particle size increased with monomer concentration, showing a maximum size at 4% v/v. However, it is the particle distribution pattern, which is more important than the average particle size in such cases. Figure 3 shows the compiled graph of size curves of nanoparticles at various monomer concentrations. The results obtained were different from those reported by Douglas et al.<sup>19</sup>, who showed an indefinite pattern of particle size at monomer concentrations above 1% v/v. From the figure it is evident that the size curves shift towards larger particle diameter at increasing monomer concentrations. At the same time, another important observation was made regarding the curve distribution. The curves showed broadening at high monomer concentrations, exhibiting a clear bimodal distribution above 3.5% v/v, and the effect was very slight at 3% v/v. Broadening of curves leading to bimodal distribution at high monomer concentrations can be explained on the basis of coagulation mechanism. At low monomer concentration (0.5% v/v), the amount of monomer to be polymerized is low, which diffuses uniformly into the primary particles, resulting in controlled particle growth and coagulation. Also, because of less particle concentration, the stabilizer effectively covers the particle surface, preventing agglomeration and resulting in smaller particle size. At high monomer concentrations, the primary particles undergo saturation with more monomer, and further polymerization at this condition leads to formation of larger particles. Also, the effective concentration of stabilizer reduces due to increase in particle concentration, resulting in improper surface coverage (Figure 4). This leads to particle coagulation and increa-

consecuencia de la menor concentración de partículas, el estabilizador cubre eficazmente la superficie de las partículas, lo que evita la aglomeración y favorece la formación de partículas de menor tamaño. Con concentraciones altas de monómero, se produce una saturación de las partículas primarias y la polimerización que se produce en estas condiciones da lugar a la formación de partículas de mayor tamaño. Además, la concentración efectiva del estabilizador se reduce al aumentar la concentración de partículas impidiendo una cobertura adecuada de la superficie (Figura 4). Esto da lugar a la coagulación y el aumento de tamaño de las partículas. El efecto del estabilizador se ha confirmado al realizar una polimerización con una concentración mayor de estabilizador (dextran 70 al 0,2% w/v), en la que se observó una reducción del tamaño medio de las partículas. El valor de  $N_p$  (número de partículas) calculado a partir de los datos de medición del tamaño de las partículas fue disminuyendo al aumentar la concentración de monómero hasta producirse la coagulación de las partículas al 3% v/v. Sin embargo, con concentraciones de monómero superiores al 3% v/v, el valor de  $N_p$  aumentó debido a la reducción del valor  $D_n$  como consecuencia de la distribución bimodal de las partículas. Después de esta fase, la correlación entre la concentración de monómero y el valor  $N_p$  puede no ser apropiada.

se in size. The effect of stabilizer has been confirmed by performing polymerization at increased stabilizer concentration (0.2% w/v dextran 70), which showed a reduction in average particle size. The  $N_p$  (number of particles) calculated from particle size measurement data, decreased with increased monomer concentration upto 3 % v/v, indicating coagulation of particles. However, above 3 % v/v monomer the  $N_p$  increased due to reduction in  $D_n$  as a result of bimodal particle distribution. Hence after this stage, correlation of monomer concentration with  $N_p$  may not be appropriate.

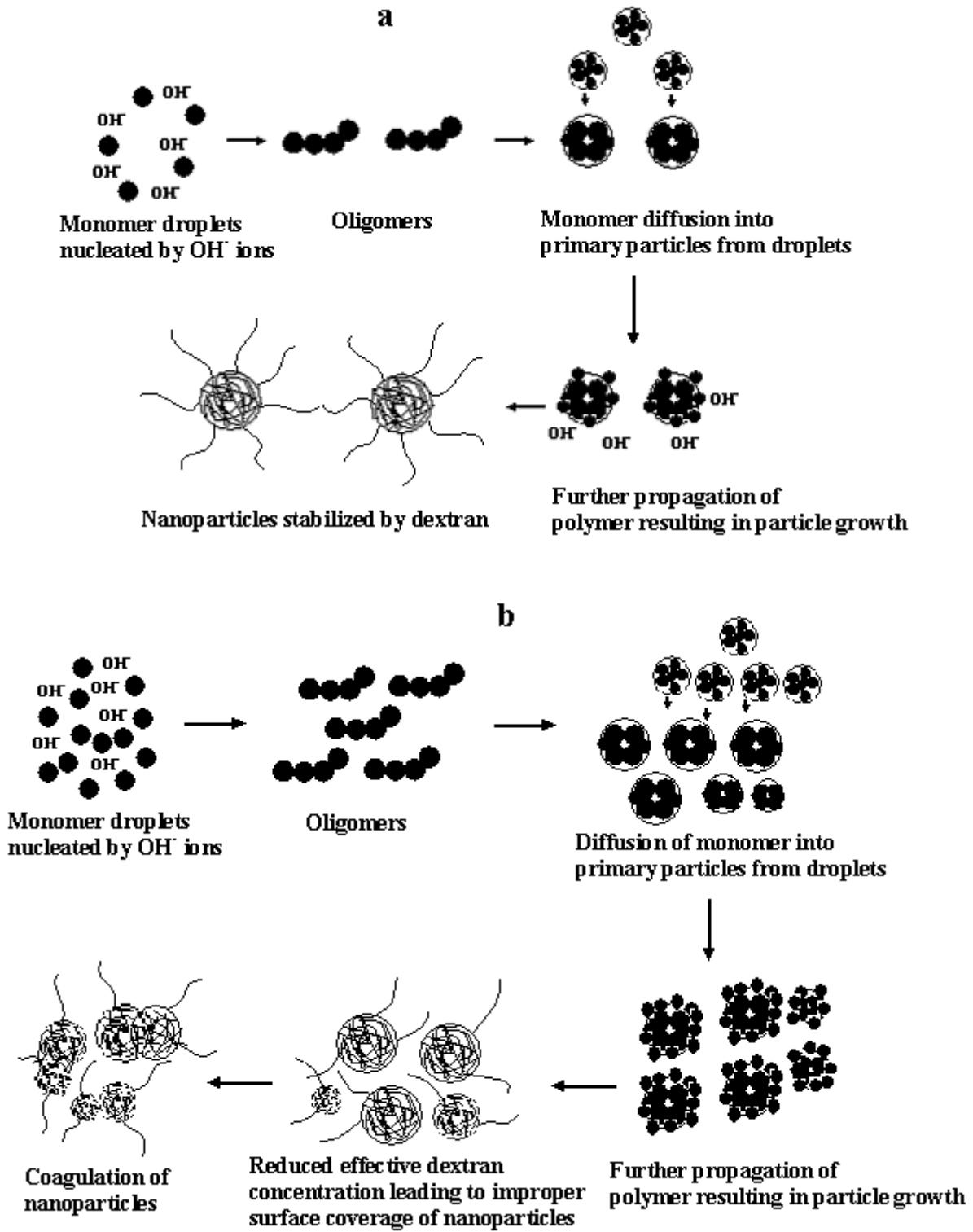
**FIGURA 3.** Curvas de distribución de tamaño de partículas de nanopartículas de PBC sintetizadas con diferentes concentraciones de monómero. (—◇—) 0,5% v/v, (—□—) 1% v/v, (—△—) 1,5% v/v, (—×—) 2% v/v, (—\*—) 2,5% v/v, (—○—) 3% v/v, (—+—) 3,5% v/v, (—■—) 4% v/v.

**FIGURE 3.** Particle size distribution curves of PBC nanoparticles synthesized with various monomer concentrations. (—◇—) 0.5 % v/v, (—□—) 1 % v/v, (—△—) 1.5 % v/v, (—×—) 2 % v/v, (—\*—) 2.5 % v/v, (—○—) 3 % v/v, (—+—) 3.5 % v/v, (—■—) 4 % v/v.



**FIGURA 4.** Mecanismo propuesto de formación de partículas con (a) concentraciones bajas de monómero y (b) concentraciones altas de monómero.

**FIGURE 4.** Proposed mechanism of particle formation at (a) low monomer concentration, and (b) high monomer concentration.



### *Temperatura de polimerización*

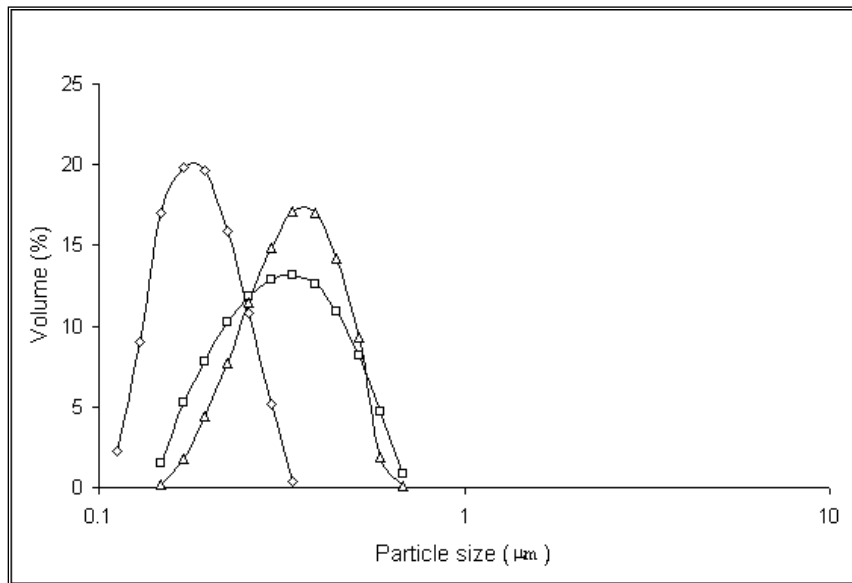
La polimerización del n-butyl cianoacrilato se realizó a varias temperaturas (10 °C, 37 °C y 60 °C) en matraces de polimerización a temperatura controlada. La Figura 5 muestra las curvas de tamaño de nanopartículas preparadas a tres temperaturas diferentes. El tamaño medio de las partículas se fue incrementando al aumentar la temperatura hasta alcanzar un tamaño máximo de 342 nm a 60 °C. En la figura se aprecia un claro desplazamiento de las curvas de tamaño hacia valores de diámetro mayores al aumentar la temperatura. Los resultados fueron diferentes de los obtenidos por Behan et al.<sup>7</sup>, que manifestaron que el aumento de temperatura parecía tener un efecto benéfico en el proceso de formación de partículas. Sin embargo, las fotografías de microscopía electrónica de barrido (MEB) del informe revelaron una aglomeración de partículas en forma de bultos a 65 °C con pH 2,0 y 3,0. Los datos de tamaño de las partículas y las micrografías electrónicas de transmisión del presente estudio (Figura 6) también muestran una aglomeración de partículas en las nanopartículas sintetizadas a 60 °C. Se observa un aumento del número de partículas ( $N_p$ ) calculado a partir de los datos de medición del tamaño de las partículas en las nanopartículas preparadas a 10 °C y una disminución del valor  $N_p$  a 60 °C. Estos datos revelan una clara aglomeración de partículas a temperatura elevada, que se puede atribuir al incremento de la energía cinética del sistema y al choque entre las partículas, así como la reducida eficacia del estabilizador para estabilizar las partículas a esta temperatura. Por tanto, las temperaturas de polimerización elevadas no ofrecen ninguna ventaja significativa para el proceso de formación de nanopartículas en comparación con temperaturas más bajas.

### *Polymerization temperature*

Polymerization of n-butyl cyanoacrylate was performed at various temperatures such as 10°C, 37°C and 60°C in temperature controlled polymerization flasks. Figure 5 shows the size curves of nanoparticles prepared at three different temperatures. The average particle size was found to increase with increase in temperature, exhibiting a maximum particle size (342 nm) at 60°C. A clear shift in size curves towards the larger particle diameter is evident from the figure. The results obtained were different from those reported by Behan et al.<sup>7</sup>, who stated that higher temperatures appear to have a beneficial effect on particle formation process. But, the SEM photographs shown in the report reveal particle agglomeration in the form of lumps at 65°C at pH 2.0 and 3.0. Our particle size data and transmission electron micrographs (Figure 6) also support the particle agglomeration in nanoparticles synthesized at 60°C. The number of particles ( $N_p$ ) calculated from particle size measurement data show high  $N_p$  in nanoparticles prepared at 10°C, and a low  $N_p$  at 60°C. This strongly suggests the particle agglomeration at high temperature, which can be attributed to increased kinetic energy of the system and inter-collision of particles, and also the reduced efficacy of stabilizer to stabilize the particles at this temperature. Hence high polymerization temperature does not offer any significant advantage in nanoparticle formation compared to lower temperature.

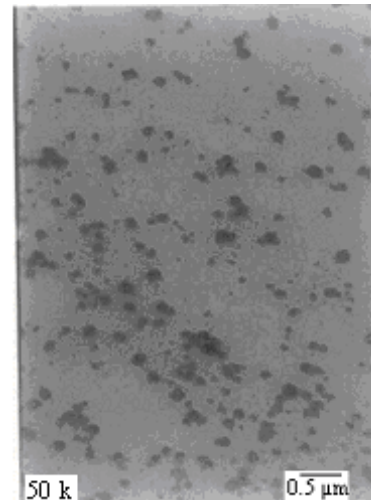
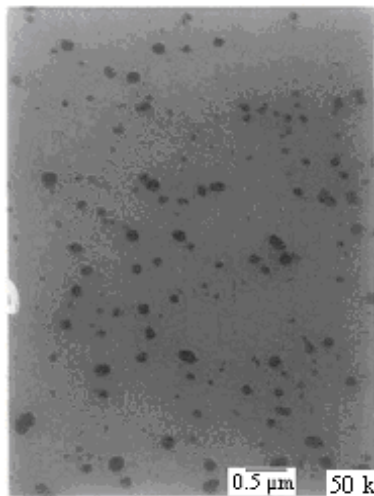
**FIGURA 5.** Curvas de distribución de tamaño de partículas de nanopartículas de PBC sintetizadas a diferentes temperaturas. (◊) 10 °C, (◻) 37 °C, (◄) 60 °C.

**FIGURE 5.** Particle size distribution curves of PBC nanoparticles synthesized at different temperatures. (◊) 10°C, (◻) 37°C, (◄) 60°C.



**FIGURA 6.** Micrografías electrónicas de transmisión de nanopartículas de PBC sintetizadas a diferentes temperaturas (a) 37 °C y (b) 60 °C.

**FIGURE 6.** Transmission electron micrographs of PBC nanoparticles synthesized at different temperatures (a) 37°C, (b) 60°C.



### *Tiempo de polimerización*

El aumento del tiempo de polimerización no supuso una diferencia significativa en el tamaño de las partículas ni en su distribución, lo que indica la posibilidad de una completa formación y estabilización de las partículas dentro del tiempo normal de polimerización empleado en el estudio (3 horas).

### *Polymerization time*

High polymerization times did not show much difference in particle size and distribution, indicating the complete particle formation and stabilization within the normal polymerization time (3 h) used in the study.

### *Concentración y tipo de estabilizador*

Se utilizaron cuatro estabilizadores diferentes (dextran 40, dextran 70, sulfato de dextran y polietileno glicol-6000) con diferentes concentraciones para la síntesis de las nanopartículas y se estudió su efecto en el tamaño de las partículas (Figura 7). Se observó una reducción del tamaño de las partículas al aumentar la concentración de estabilizador con todos los estabilizadores. Las concentraciones elevadas de estabilizador hicieron posible una estabilización eficaz de las partículas mediante la adecuada cobertura de su superficie y evitaron la aglomeración, dando lugar a la formación de partículas de menor tamaño. En la Figura 8 se aprecia un claro desplazamiento de las curvas de tamaño de partículas hacia valores de tamaño menores y un estrechamiento de la distribución de tamaño al aumentar la concentración de estabilizador. El tamaño más reducido se obtuvo en las nanopartículas que contenían dextran 40, lo que indica un mayor efecto estabilizador en comparación con otros estabilizadores de dextran utilizados en el estudio. De estos datos se deduce que es posible obtener nanopartículas de diferente tamaño mediante la incorporación de distintos tipos de estabilizadores de dextran a diversas concentraciones. Las nanopartículas sintetizadas con grandes cantidades de dextran y, por tanto, de reducido tamaño, podrían servir como depósitos de fármaco circulantes por el sistema sanguíneo. Se cree que las cadenas estéricas de moléculas de dextran reducen la opsonización y aumentan el tiempo de permanencia en la sangre de los sistemas de partículas.<sup>20</sup> Las nanopartículas sintetizadas con polietileno glicol-6000 como estabilizador también podrían reducir la opsonización debido a su propiedad de estabilización estérica. Estos sistemas serían útiles para la administración de fármacos dirigida al tratamiento de tumores, ya que una permanencia prolongada de las nanopartículas en la sangre posibilita una mejor penetración en los tejidos tumorales debido a su naturaleza porosa y elevada permeabilidad vascular (efecto EPR)<sup>21</sup>.

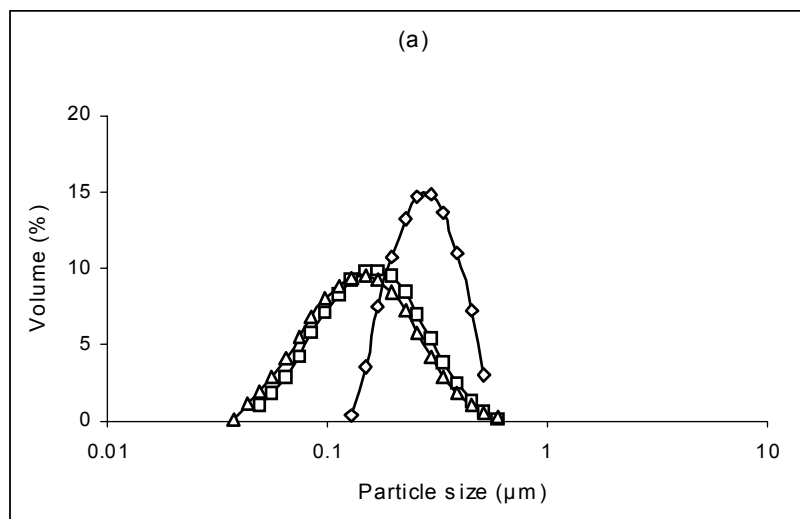
### *Stabilizer type and concentration*

Four different stabilizers, dextran 40, dextran 70, dextran sulfate and polyethylene glycol-6000 were used at various concentrations in the synthesis of nanoparticles, and their effect on particle size was studied (Fig. 7). A reduction in particle size was observed with increase in stabilizer concentration with all stabilizers. High concentrations of stabilizer effectively stabilize the particles by proper surface coverage and prevent agglomeration, resulting in smaller particle size. A clear shift of particle size curves towards the smaller size and narrowing of the size distribution with increased stabilizer concentration is evident from Figure 8. Nanoparticles containing dextran 40 exhibited lowest particle size, indicating better stabilizing effect compared to other dextrans used in the study. Thus it is evident that, nanoparticles of different size could be obtained by incorporating different types of dextrans as stabilizer at varied concentrations. Nanoparticles synthesized with high amounts of dextrans coupled with the resultant low particle size could be advantageous as long circulating drug reservoir in blood. The steric chains of dextran molecules are believed to reduce opsonization, and increase the blood residence time of the particulate systems.<sup>20</sup> The nanoparticles synthesized with polyethylene glycol-6000 as stabilizer also could reduce opsonization because of its steric stabilization property. Such systems would be useful in targeted drug delivery to tumors, as prolonged blood residence of nanoparticles lead to enhanced uptake by tumors because of their leaky nature and high vascular permeability (EPR effect)<sup>21</sup>.



**FIGURA 7.** Curvas de distribución de tamaño de partículas de nanopartículas de PBC sintetizadas con diferentes estabilizadores a diversas concentraciones (a) Dextran 40 (◊-0,1% w/v, ◻-0,3% w/v, ▲-0,5% w/v), (b) Dextran 70 (◊-0,1% w/v, ◻-0,3% w/v, ▲-0,5% w/v), (c) Sulfato de dextran (◊-0,1% w/v, ◻-0,3% w/v, ▲-0,5% w/v), (d) Polietileno glicol-6000 (◊-0,1% w/v, ◻-0,3% w/v, ▲-0,5% w/v).

**FIGURE 7.** Particle size distribution curves of PBC nanoparticles synthesized using different stabilizers at varied concentrations (a) Dextran 40 (◊-0.1 % w/v, ◻-0.3 % w/v, ▲-0.5 % w/v), (b) Dextran 70 (◊-0.1 % w/v, ◻-0.3 % w/v, ▲-0.5 % w/v), (c) Dextran sulfate (◊-0.1 % w/v, ◻-0.3 % w/v, ▲-0.5 % w/v), (d) Polyethylene glycol-6000 (◊-0.1 % w/v, ◻-0.3 % w/v, ▲-0.5 % w/v).



#### *Efecto de los factores de polimerización en la eficacia de captura de las nanopartículas*

Se estudió el efecto de variables de formulación tales como la concentración de monómero, la temperatura y el tiempo de polimerización con objeto de optimizar estos parámetros para obtener nanopartículas con una mayor eficacia de captura. El aumento de la concentración de monómero produce una mayor eficacia de captura de las nanopartículas (Tabla 3). Se observó una eficacia de captura superior en las nanopartículas preparadas con monómero al 2% v/v (74,35%) que en las nanopartículas preparadas con una concentración de monómero del 1% v/v (63,62 %). La utilización de concentraciones elevadas de monómero da lugar a la formación de grandes cantidades de polímeros, que se traduce en la incorporación de una mayor cantidad de fármaco y en el consiguiente aumento de la eficacia de captura.

#### *Effect of polymerization factors on entrapment efficiency of nanoparticles*

The effect of formulation variables such as monomer concentration, polymerization time and temperature were studied to optimize these parameters to obtain nanoparticles with better entrapment efficiency. Increase in monomer concentration lead to increased entrapment efficiency of nanoparticles (Table 3). The entrapment efficiency was found comparatively higher in nanoparticles prepared with 2 % v/v monomer (74.35 %), than with 1% v/v (63.62 %). High monomer feed results in the formation of large amount of polymer, and hence incorporate more amount of drug, resulting in high entrapment efficiency.

**TABLA 3.** Influencia de la concentración de monómero en la eficacia de captura de las nanopartículas de polibutil-cianoacrilato cargadas con doxorubicina.

**TABLE 3.** Influence of monomer concentration on entrapment efficiency of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles loaded with doxorubicin.

Concentración de monómero añadida (mg) <i>Monomer concentration added (mg)</i>	Eficacia de captura (%) <i>Entrapment efficiency (%)</i>
100	66,69
125	67,47
150	69,14
175	70,7
200	76,93

Al aplicar una temperatura de polimerización elevada (60 °C), se observó una reducción de la eficacia de captura de las nanopartículas, posiblemente debida al aumento del nivel de filtración del fármaco. El fármaco demostró ser estable a 60 °C durante 3 meses.<sup>22</sup> Se puede descartar, por tanto, el aspecto de la degradación del fármaco en estas condiciones de polimerización.

La utilización de tiempos de polimerización elevados aumentó la eficacia de captura de las nanopartículas (Tabla 4). Esto se puede atribuir al mayor nivel de conversión de monómero a polímero que se observa al aumentar el tiempo de polimerización y que se traduce en una mayor eficacia de captura del fármaco.

High polymerization temperature (60°C) reduced the entrapment efficiency of nanoparticles, which may be due to the increased drug leaching. The drug was reported to be stable at 60°C for 3 months.<sup>22</sup> Hence the aspect of drug degradation at these polymerization conditions can be ruled out.

High polymerization times increased the entrapment efficiency of the nanoparticles (Table 4). This may be attributed to the high monomer to polymer conversion with time resulting in increased drug entrapment.

**TABLA 4.** Influencia del tiempo de polimerización en la eficacia de captura de las nanopartículas de polibutil-cianoacrilato cargadas con doxorubicina.

**TABLE 4.** Influence of polymerization time on entrapment efficiency of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles loaded with doxorubicin.

Tiempo de polimerización (h) <i>Polymerization time (h)</i>	Eficacia de captura (%) <i>Entrapment efficiency (%)</i>
4	66,69
8	66,91
12	67,66
24	68,16

La preparación de nanopartículas con fármaco se realizó mediante la carga de diversas concentraciones de DH por el método de incorporación para estudiar el efecto de la concentración de fármaco en la eficacia de captura de las nanopartículas. Al aumentar la concentración de doxorubicina se produjo un incremento de la eficacia de captura de las nanopartículas que alcanzó su nivel máximo con una concentración de DH de 7 mg, a partir de la cual se observó una disminución de la eficacia de captura (Tabla 5). Esta reducción de la eficacia de captura se puede deber a una saturación de DH en las nanopartículas que imposibilita el aumento de la eficacia de captura al añadir más fármaco.

Drug containing nanoparticles were prepared by loading various concentrations of DH by incorporation method to study the effect of drug concentration on entrapment efficiency of nanoparticles. Increase in added concentration of doxorubicin showed an increased entrapment efficiency of nanoparticles upto 7 mg DH concentration, and a decline afterwards (Table 5). This may be due to saturation of nanoparticles with DH, and hence further drug addition did not increase the entrapment efficiency.

**TABLA 5.** Influencia de la cantidad de doxorubicina cargada en la eficacia de captura de las nanopartículas de polibutil-cianoacrilato.

**TABLE 5.** Influence of the amount of doxorubicin loaded on entrapment efficiency of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles.

Cantidad de doxorubicina cargada en las nanopartículas(mg) <i>Amount of doxorubicin loaded into nanoparticles(mg)</i>	Eficacia de captura (%) <i>Entrapment efficiency (%)</i>
2,2	56,88
5,0	63,72
7,0	65,98
10,0	35,73

#### *Estudios de adsorción de DH en las nanopartículas de PBC*

Illum et al.<sup>23</sup> estudiaron la adsorción de diferentes concentraciones de doxorubicina en nanopartículas preparadas con dextran 70 y poloxámero 338 como estabilizadores. Sin embargo, estos autores no estudiaron el efecto del pH ni la influencia del método de carga en la liberación de fármaco de las nanopartículas. Se utilizaron diferentes valores de pH para estudiar la adsorción de DH en las nanopartículas de PBC a fin de determinar la eficacia de fijación del fármaco y el efecto del pH en dicha fijación. Las condiciones de pH seleccionadas fueron 3,0, 5,0, 7,0 y 8,0. El estudio no se realizó con valores de pH superiores a 8,0, debido a que el DH tiene propiedades de indicador y su color pasa de naranja-rojo a azul-violeta en condiciones alcalinas a un pH aproximado de 9,0.<sup>22</sup>

#### *Adsorption studies of DH to PBC nanoparticles*

Illum et al.<sup>23</sup> studied adsorption of doxorubicin at various concentrations to nanoparticles prepared by using dextran 70 and poloxamer 338 as stabilizers. However, the authors did not report the effect of pH and influence of loading method on drug release from the nanoparticles. Adsorption of DH to PBC nanoparticles was performed at various pH in order to determine the binding efficiency, and also the effect of pH on drug binding. The pH conditions selected were 3.0, 5.0, 7.0 and 8.0. The study was not performed above pH 8.0, because DH shows indicator like properties, turning orange-red to blue-violet in alkaline conditions at about pH 9.0.<sup>22</sup>

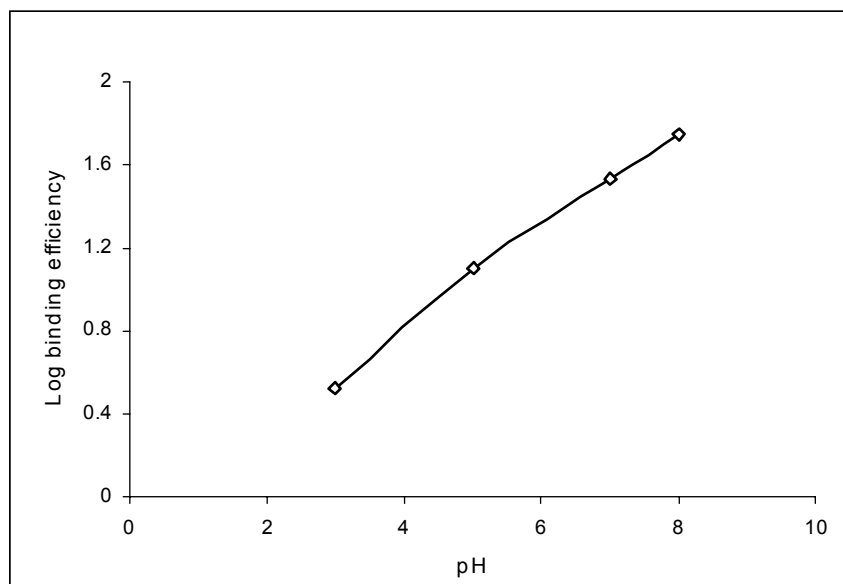
Increase in pH beyond 3.0 showed an improved drug adsorption onto PBC nanoparticles, with higher binding at pH 8.0. The increased extent of adsorption of drug with pH is due to increase

Al ir aumentando el pH a partir de 3,0 se observó una mejor adsorción del fármaco en las nanopartículas de PBC, con una mayor fijación en la condición de pH superior (8,0). El aumento del grado de adsorción del fármaco con valores de pH más elevados se debe al aumento del grado de ionización del fármaco ( $pK_a = 8,22$ ) y a la menor afinidad con el medio acuoso. La curva lineal ( $R^2 = 0,994$ ) del gráfico de eficacia de fijación registrada a diferentes pH (Figura 8) indica la existencia de una relación lineal entre los pH del medio de dispersión en la adsorción de fármaco en las nanopartículas.

in ionization of drug ( $pK_a = 8.22$ ), and also decreased affinity towards the aqueous medium. A plot of log binding efficiency versus pH (Figure 8), gave a linear curve ( $R^2 = 0.994$ ), indicating a linear relationship between pH of dispersion medium on drug adsorption to nanoparticles.

**FIGURA 8.** Influencia del pH sobre la eficacia de fijación del fármaco de las nanopartículas de PBC ( $R^2 = 0,994$ , calculado a partir de la ecuación de regresión).

**FIGURE 8.** Influence of pH on drug binding efficiency of PBC nanoparticles ( $R^2 = 0.994$ , calculated from the regression equation).



Se realizaron estudios de adsorción de DH en nanopartículas de PBC a un pH de 7,0 (pH fisiológico) mediante la incubación de las dispersiones a  $37 \pm 2$  °C durante períodos de tiempo diferentes hasta alcanzar un máximo de 12 horas. Sin embargo, no se produjo un aumento significativo en la cantidad de fármaco adsorbida después de una hora, lo que indica una rápida adsorción.

Time-dependant adsorption studies of DH to PBC nanoparticles at pH 7.0 (physiological pH), were conducted by incubating the dispersions at  $37 \pm 2$  °C for different time periods upto 12 h. However, there was no much increase in the amount of drug adsorbed beyond one hour, indicating rapid adsorption.

#### **Liberación de fármaco in vitro de nanopartículas de DPBC**

Se realizaron estudios sobre la liberación de fármaco in vitro de nanopartículas de DPBC

#### ***In vitro drug release from DPBC nanoparticles***

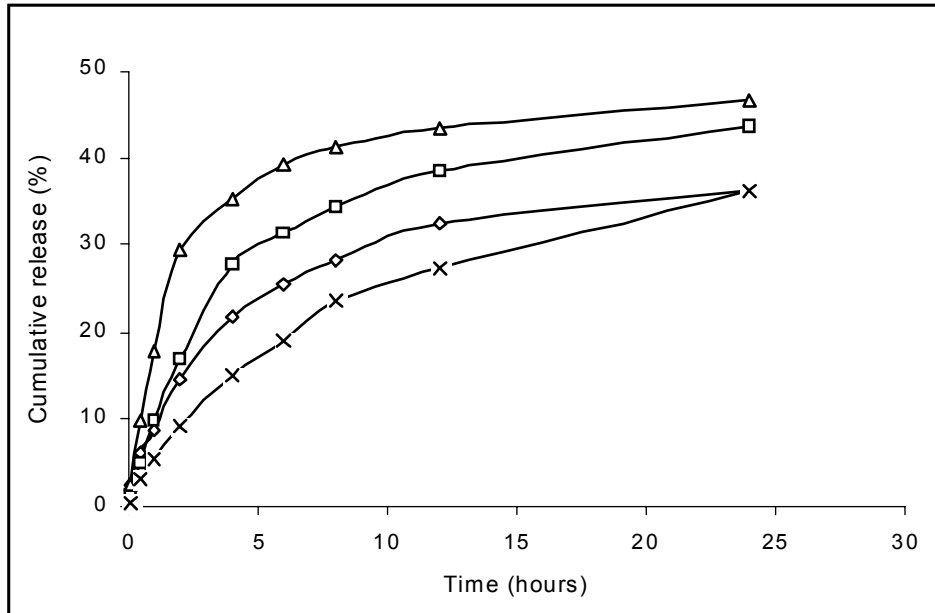
Studies on in vitro drug release from DPBC nanoparticles prepared by incorporation (DPBC-incorporated) and adsorption (DPBC-adsorbed) of drug were carried out in two different media such as 0.001N HCl and 0.9 % saline (Figure 9)

mediante incorporación (DPBC incorporado) y adsorción (DPBC adsorbido) de fármaco en dos medios diferentes, 0,001 N HCl y solución salina al 0,9% (Figura 9) a fin de evaluar el grado de liberación en el medio ácido y en el medio con concentración de sal fisiológica. Las nanopartículas de DPBC preparadas mediante incorporación y adsorción mostraron una liberación rápida y elevada de fármaco en 0,001 N HCl. Esto se debe a la mayor afinidad del fármaco con el medio de disolución a consecuencia del bajo grado de ionización al pH del medio. Este patrón de liberación de DH de las nanopartículas de PBC podría resultar ventajoso para la administración intracelular de fármaco. A partir del estudio de los datos de liberación *in vitro*, cabría esperar que tras la administración parenteral se produjera una disminución de la velocidad de liberación de fármaco de las nanopartículas en espacio extracelular (debido al pH fisiológico). Después de la penetración celular, se puede producir una rápida liberación del fármaco al pH ácido endosomal que se traducirá en una mayor concentración intracelular, semejante a la de los liposomas sensibles al pH descritos por Horwitz et al.<sup>24</sup> En las nanopartículas preparadas mediante incorporación de fármaco, se observó una liberación de DH más rápida que la de las nanopartículas adsorbidas. Los valores  $t_{25}$  (tiempo necesario para la liberación de un 25% de fármaco) calculados a partir de las curvas de liberación de las nanopartículas con fármaco adsorbido fueron superiores (3,2 h en 0,001 N HCl y 8,8 h en solución salina al 0,9%) que los de las nanopartículas con fármaco incorporado (1,4 h en 0,001 N HCl y 5,6 h en solución salina al 0,9%). Estos datos sugieren un mayor grado de fijación del DH en la superficie de las nanopartículas que, de no ser tal, se traduciría en una mayor velocidad de desorción y liberación.

in order to evaluate the release in both acidic and media with physiological salt concentration. DPBC nanoparticles prepared by incorporation and adsorption showed rapid and high drug release in 0.001N HCl. This is due to the greater affinity of drug towards dissolution medium due to low ionization at the pH of medium. Such release pattern of DH from PBC nanoparticles could be advantageous in intracellular drug delivery. From the *in vitro* release data it could be expected that after parenteral administration, the nanoparticles exhibit slow drug release in extracellular space (due to physiological pH). After entry into cells, rapid drug release is possible at endosomal acidic pH resulting in high intracellular concentration, similar to that of pH sensitive liposomes reported by Horwitz et al.<sup>24</sup> Nanoparticles prepared by drug incorporation showed rapid release of DH than that of drug adsorbed nanoparticles. The  $t_{25}$  (time for 25 % drug release) values calculated from release plots were high for drug adsorbed nanoparticles (3.2 h in 0.001N HCl and 8.8 h in 0.9 % saline) than for drug incorporated nanoparticles (1.4 h in 0.001N HCl and 5.6 h in 0.9 % saline). This further suggests strong binding of DH to nanoparticle surface, which otherwise should result in faster desorption and release.

**FIGURA 9.** Perfiles de liberación de clorhidrato de doxorubicina de nanopartículas de polibutil-cianocrilato en medios diferentes (—◇—) DPBC incorporado (solución salina al 0,9%), (—△—) DPBC incorporado (0,001 N HCl), (—□—) DPBC adsorbido (0,001 N HCl), (—×—) DPBC adsorbido (solución salina al 0,9%).

**FIGURE 9.** Release profiles of Doxorubicin hydrochloride from Poly butyl cyanoacrylate nanoparticles in different media (—◇—) DPBC-incorporated (0.9 % saline), (—△—) DPBC-incorporated (0.001N HCl), (—□—) DPBC-adsorbed (0.001N HCl), (—×—) DPBC-adsorbed (0.9 % saline).



Los análisis cinéticos se realizaron mediante una representación de  $M_t/M_\infty$  frente a  $t^{1/2}$  (ecuación de Higuchi). El patrón de liberación de fármaco siguió la ecuación de Higuchi para las nanopartículas preparadas mediante incorporación y adsorción de fármaco en ambos medios (0,001 N HCl y solución salina al 0,9%), lo que indica una liberación de los sistemas matriciales. Esto se puede atribuir a una difusión del fármaco por las nanopartículas tras la adsorción debido a su estructura porosa con unas características de liberación semejantes a las de los sistemas matriciales.

## CONCLUSIONES

Algunas variables experimentales, como la concentración de monómero y la temperatura de polimerización, demostraron tener un importante influencia en el tamaño y la distribución de las partículas. Las concentraciones de monómero elevadas dieron lugar a la formación de partículas de mayor tamaño con una distribución de tamaño más amplia y una mayor eficacia de captura de las nanopartículas. La distribución y el tama-

The kinetic analysis was performed by plotting  $M_t/M_\infty$  versus  $t^{1/2}$  (Higuchi equation). The drug release pattern followed Higuchi equation for nanoparticles prepared by incorporation and adsorption of drug in both 0.001N HCl and 0.9 % saline indicating release from the matrix systems. This can be attributed to the diffusion of drug into nanoparticles upon adsorption due to their porous structure and simulating the release characteristics of matrix systems.

## CONCLUSIONS

Experimental variables such as monomer concentration and polymerization temperature showed a profound effect on the particle size and distribution. High monomer concentrations resulted in larger particles with broader size distribution and high entrapment efficiency of the nanoparticles. The particle size and distribution are important in drug delivery, as they influence the biodistribution of nanoparticles in vivo. High polymerization temperature showed particle agglomeration and broad size distribution, and hence

ño de las partículas son factores importantes para la administración de fármacos, ya que influyen en la biodistribución de las nanopartículas in vivo. Al aumentar la temperatura de polimerización, se observó una mayor distribución de tamaño y una aglomeración de partículas. El aumento de temperatura no supone, por tanto, ninguna ventaja en la formación de nanopartículas. La concentración y el tipo de estabilizador demostraron tener una gran influencia en el tamaño de las nanopartículas, permitiendo la obtención de nanopartículas de diferente tamaño y distribución mediante la variación del tipo de estabilizador y de la concentración del mismo. Las nanopartículas preparadas con concentraciones elevadas de los estabilizadores dextran y PEG-6000 podrían reducir la opsonización de las partículas en el sistema sanguíneo y prolongar el tiempo de circulación. La lenta liberación de DH de las nanopartículas en solución salina al 0,9% (condición fisiológica) tiene una gran utilidad en la quimioterapia del cáncer y en la prevención de la metástasis, ya que una liberación prolongada de fármaco en el lugar de destino ofrece la ventaja de permitir una continua exposición celular al fármaco, que se traduce en una muerte efectiva de las células tumorales.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores del presente estudio manifiestan su agradecimiento a la University Grants Commission (UGC) de la India por la financiación de este trabajo de investigación.

did not offer any advantage in nanoparticle formation. Nanoparticle size was greatly influenced by stabilizer type and concentration offering a choice to obtain nanoparticles of diverse size and distributions by varying the type and concentration of stabilizer. The nanoparticles prepared using higher concentrations of dextran and PEG-6000 as stabilizers could reduce the opsonization of particles in blood and may result in prolonged circulation time. Slow release of DH from nanoparticles in 0.9 % saline (physiological condition) indicates its usefulness in chemotherapy of cancers and prevention of metastasis, as prolonged drug release at the target site offers advantage of continuous cell exposure to drug, resulting in effective cell kill.

### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank University Grants Commission (UGC) India for funding this research work.

### BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Couvreur P, Kante B, Roland M, Guiot P, Bauduin P, Speiser P. Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomal carriers: preparation, morphological and sorptive properties. *J Pharm Pharmacol* 1979; 3: 1331-1332.
2. Beck PH, Kreuter J, Muller EG, Schatton W. Improved peroral delivery of avarol with poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 1994; 40: 134-137.
3. Kreuter J, Alyautdin RN, Kharkevich DA, Ivanov AA. Passage of peptides through the blood-brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles). *Brain Res* 1995; 674: 171-174.
4. Schroeder U, Sabel BA. Nanoparticles, a drug carrier system to pass the blood-brain barrier, permit central analgetic effects of i.v. dalargin injections. *Brain Res* 1996; 710: 121-124.
5. Verdun C, Couvreur P, Vranckx H, Lenaerts V, Roland M. Development of a nanoparticle controlled-release formulation for human use. *J Cont Rel* 1986; 3: 205-210.
6. Kreuter J. Physicochemical characterization of polyacrylic nanoparticles. *Int J Pharm* 1983; 14: 43-58.
7. Behan N, Birkinshaw C, Clarke N. Poly n-butyl cyanoacrylate nanoparticles: a mechanistic study of polymerization and particle formation. *Biomaterials* 2001; 22: 1335-1344.
8. Marchal-Heussler I, Maincent P, Hoffman M, Spittler J, Couvreur P. Antiglaucomatous activity of betaxolol chlorhydrate sorbed onto different isobutyl cyanoacrylate nanoparticle preparations. *Int J Pharm* 1990; 58: 115-122.

9. Brasseur N, Brault D, Couvreur P. Adsorption of hematoporphyrin onto polyalkyl cyanoacrylate nanoparticles: carrier capacity and drug release. *Int J Pharm* 1991; 70: 129-135.
10. Gaspar R, Preat V, Roland M. Nanoparticles of polyisohexyl cyanoacrylate (PIHCA) as carriers of primaquine: formulation, physico-chemical characterization and acute toxicity. *Int J Pharm* 1991; 68: 111-119.
11. Sommerfeld P, Schroeder U, Sabel BA. Long-term stability of PBCA nanoparticle suspensions suggests clinical usefulness. *Int J Pharm* 1997; 155: 201-207.
12. Douglas SJ, Davis SS, Illum L. Biodistribution of poly(butyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles in rabbits. *Int J Pharm* 1986; 34: 145-152.
13. Moghimi SM, Davis SS. Innovations in avoiding particles clearance from blood by kupfer cells: cause for reflection. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 1994; 11: 31-59.
14. Parfitt K. Antineoplastics and immunosuppressants. In: Parfitt K, ed., *Martindale*, 32nd ed. Pharmaceutical press, London, 1999: 529-531.
15. Bhawal S, Pokhriyal NK, Devi S. Translucent nanolatexes through emulsion polymerization of ethyl acrylate. *European Polymer Journal* 2002; 38: 735-744.
16. Muller RH, Lherm C, Herbot J, Blunk T, Couvreur P. Alkyl cyanoacrylate drug carriers: I. Physicochemical characterization of nanoparticles with different chain length. *Int J Pharm* 1992; 84: 1-11.
17. Hawley AE, Illum L, Davis SS. Lymph node localization of biodegradable nanospheres surface modified with poloxamer and poloxamine block co-polymers. *FEBS letters.* 1997; 400: 319-323.
18. Takakura Y, Matsumoto S, Hashida M, Sezaki H. Enhanced lymphatic delivery of mitomycin C conjugated with dextran. *Cancer Res* 1984; 44: 2505.
19. Douglas SJ, Illum L, Davis SS, Kreuter J. Particle size and size distribution of poly(butyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles. *J Colloid Interface Sci*, 1984; 101: 149-157.
20. Pain D, Das PK, Ghosh, PC, Bachhawat BK. Increased circulatory half-life of liposomes after conjugation with dextran. *J Biosci* 1984; 6: 811-816.
21. Duncan R. Polymer conjugates for tumor targeting and intracytoplasmic delivery. The EPR effect as a common gateway? *Pharm Sci Tech Today* 1999; 2: 441-449.
22. Vigevani A, Williamson MJ. Doxorubicin. In: Analytical profiles of drug substances. Florey K, ed., *Academic press*, New York, 1980; 245-274.
23. Illum L, Khan MA, Mak E, Davis SS. Evaluation of carrier capacity and release characteristics for poly(butyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles. *Int J Pharm* 1986; 30: 17-28.
24. Horwitz BA, Shintizky M, Kreutz W, Yatwin MB. pH sensitive liposomes: possible clinical implications. *Science (Wash DC)*. 1980; 210: 1253-1255.