

Polimerización del n-butil cianoacrilato en presencia de surfactantes: estudio de la influencia de los factores de polimerización sobre propiedades de las partículas, carga de fármacos y evaluación de la cinética de liberación de fármacos

Polymerization of n-butyl cyanoacrylate in presence of surfactant: study of influence of polymerization factors on particle properties, drug loading and evaluation of its 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. e-mail: murthyrsr@sify.com

RESUMEN

Se sintetizaron nanopartículas de polibutil-cianoacrilato mediante polimerización por emulsión en presencia de un surfactante no iónico (poloxámero 188), en concentraciones superiores a CMC, y se caracterizaron mediante mediciones de potencial zeta, microscopía electrónica de transmisión y análisis de tamaño. Se estudiaron los efectos de factores de polimerización tales como concentración de monómeros, temperatura de polimerización y concentración de surfactante sobre el tamaño de la partícula y su distribución. Al variar la concentración no se apreciaron diferencias significativas en el tamaño medio de las partículas ni en su distribución. A temperaturas de polimerización elevadas se observó un aumento significativo en el tamaño de las partículas y una distribución más extendida, en comparación con los resultados obtenidos a temperaturas bajas y moderadas, lo que se puede atribuir a la deshidratación del óxido de propileno y de los bloques de óxido de etileno dentro del surfactante. Las concentraciones de surfactante en el rango del estudio no mostraron una influencia apreciable en el tamaño y el patrón de distribución de las nanopartículas. La carga de fármacos en las nanopartículas mediante la técnica de incorporación dio como resultado un mayor grado de captura que la técnica de la adsorción. Sin embargo, las nanopartículas cargadas con fármaco mediante la técnica de adsorción presentaron un mayor grado de liberación de clorhidrato de doxorubicina tanto en 0,001N HCl como en solución salina al 0,9 %. Los resultados del análisis cinético revelaron que las nanopartículas seguían la ecuación de Higuchi, lo que indica la posibilidad de penetración del fármaco en la matriz porosa de las nanopartículas tras la adsorción del mismo.

PALABRAS CLAVE: Liberación del fármaco. Polimerización por emulsión. Nanopartículas. Poloxámero 188. Polibutil-cianoacrilato. Factores de polimerización. Surfactante.

ABSTRACT

Polybutyl cyanoacrylate nanoparticles were synthesized by emulsion polymerization in presence of nonionic surfactant (Poloxamer 188) in concentration above CMC, and were characterized by particle size analysis, transmission electron microscopy and zeta potential measurements. Effect of polymerization factors such as monomer concentration, polymerization

temperature and surfactant concentration on the particle size and distribution were studied. Varied monomer concentrations did not show much difference in average particle size and particle distribution. High polymerization temperature showed significant increase in particle size and broader distribution compared to that of low and moderate temperatures which can be attributed to the dehydration of propylene oxide and ethylene oxide blocks within the surfactant. Surfactant concentrations in the range studied, did not show appreciable influence on size and distribution pattern of nanoparticles. Drug loading into nanoparticles by incorporation technique resulted in higher entrapment than the adsorption technique. However, the drug loaded nanoparticles prepared by adsorption technique showed high release of doxorubicin hydrochloride in both 0.001N HCl and 0.9 % saline. The results of kinetic analysis revealed that the nanoparticles followed Higuchi equation indicating the possibility of drug penetration into the porous matrix of nanoparticles following drug adsorption.

KEY WORDS: Drug release. Emulsion polymerization. Nanoparticles. Poloxamer 188. Polybutyl cyanoacrylate. Polymerization factors. Surfactant.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha observado un interés considerable en el desarrollo de dispositivos biodegradables para administrar de forma efectiva moléculas terapéuticas a velocidad controlada y en el lugar del cuerpo en que se necesitan. Se supone que mediante dicha forma de administración se evitan los efectos no deseados de las moléculas del fármaco, ya que la biodistribución está controlada¹. Las nanopartículas poliméricas son uno de los dispositivos prometedoros para la administración que cumplen los requisitos mencionados anteriormente. En la investigación sobre la administración de fármacos se han probado diversos polímeros, siendo ampliamente investigados los siguientes: PLA², PLGA³, policaprolactona⁴ y malenato de polimetilideno⁵, quitosan⁶ y gelatina⁷. Las nanopartículas de polibutil-cianoacrilato (PBC) cumplen requisitos ideales tales como la biodegradabilidad, la capacidad de alterar la biodistribución de fármacos y la facilidad de sintetización y purificación⁸⁻¹¹.

El primer informe sobre la síntesis de nanopartículas de PBC apareció en 1979¹¹. Posteriormente, se publicaron diversos informes relativos a las distribuciones del peso molecular¹², la toxicidad, la farmacocinética¹³, la biodistribución¹⁴, la estabilidad¹⁵ y la incorporación de diversos fármacos¹⁶⁻¹⁹. Las primeras nanopartículas de PBC se sintetizaban mediante polimerización por dispersión de monómero de cianoacrilato en presencia de un estabilizante^{11,20}. Se observó que el pH de polimerización óptimo para la formación de nanopartículas se encontraba por debajo de 5,0²⁰. La polimerización con un pH superior a 5,0 daba como resultado agregados de polímero con distribuciones de peso molecular multimodales amplias. Se consideró que la polimerización a temperatura elevada (60°C) tenía un efecto benéfico en el proceso de formación de partículas, como habían informado Behan et al²⁰.

INTRODUCTION

A considerable interest was found in the recent years in development of biodegradable devices for effective delivery of therapeutic molecules at a controlled rate to the required site in the body. Such a delivery is assumed to avoid the unwanted effects of drug molecules because of controlled biodistribution¹. Polymeric nanoparticles are one of the promising drug delivery devices which can meet the above requirements. Various polymers have been tried in drug delivery research out of which PLA², PLGA³, polycaprolactone⁴, polymethylidene malonate⁵, chitosan⁶ and gelatin⁷ are widely investigated. Polybutyl cyanoacrylate (PBC) nanoparticles meet ideal requirements for targeting such as biodegradability, ability to alter the biodistribution of drugs and easy to synthesize and purify⁸⁻¹¹.

The first report on synthesis of PBC nanoparticles was appeared in 1979¹¹. Later on several reports appeared regarding the molecular weight distributions¹², toxicity, pharmacokinetics¹³, biodistribution¹⁴, stability¹⁵ and incorporation of various drugs¹⁶⁻¹⁹. Earlier PBC nanoparticles were synthesized by dispersion polymerization of cyanoacrylate monomer in presence of a stabilizer^{11,20}. The optimum pH of polymerization for nanoparticle formation was found to be below 5.0²⁰. Polymerization above pH 5.0 resulted in polymer aggregates with broad multimodal molecular weight distributions. Polymerization at high temperature (60°C) was considered to have a beneficial effect on the particle formation process as reported by Behan et al²⁰.

Polymerization of monomers in the presence of surfactants above critical micellar concentration (CMC) (termed as emulsion polymerization) generally leads to the formation of particles with smaller size²¹. Emulsion polymerization possesses some inherent advantages such as high rate of polymerization with the formation of high

La polimerización de monómeros en presencia de surfactantes por encima de la concentración micelar crítica (CMC) (denominada polimerización por emulsión) conduce generalmente a la formación de partículas de menor tamaño²¹. La polimerización por emulsión presenta ciertas ventajas inherentes a ella, tales como un elevado índice de polimerización con formación de polímero de elevado peso molecular y un tamaño de partícula inferior. A este respecto, la polimerización por emulsión destaca entre las técnicas de polimerización por radicales libres²². De ahí que hayamos intentado sintetizar nanopartículas de PBC mediante polimerización por emulsión, utilizando clorhidrato de doxorubicina (DH) como fármaco modelo.

El clorhidrato de doxorubicina es una antraciclina antibiótica citotóxica ampliamente utilizada en el tratamiento del linfoma no Hodgkin, de la leucemia linfoblástica aguda, del carcinoma mamario y de otros tipos de cáncer. El mecanismo de citotoxicidad incluye la intercalación específica de núcleos de antraciclina planar de DH en la doble hélice del ADN, lo que impide la replicación posterior del ADN²³.

En la presente comunicación se indican los resultados de la síntesis de nanopartículas mediante polimerización por emulsión y su caracterización mediante mediciones de potencial zeta, microscopía electrónica de transmisión y análisis de tamaño. Durante la polimerización se estudió el proceso de formación de partículas mediante mediciones del tamaño de las mismas. Se estudiaron los efectos de factores de polimerización tales como concentración de monómeros, temperatura de polimerización y concentración de surfactante sobre el tamaño de la partícula y su distribución. La carga del fármaco en las nanopartículas se realizó mediante diversas técnicas, y se evaluaron sus efectos en la cinética de liberación del fármaco.

MATERIALES

El clorhidrato de doxorubicina era una muestra proporcionada gratuitamente por RPG life sciences limited (India). El n-butil cianoacrilato fue un amable regalo de Sun Pharmaceutical Industries Limited (India). El poloxámero 188 se obtuvo a través de BASF, Alemania. Todos

molecular weight polymer, with low particle size. In these respects, emulsion polymerization stands alone among the techniques of free radical polymerization²². Hence an attempt is made here to synthesize PBC nanoparticles by emulsion polymerization, using doxorubicin hydrochloride (DH) as a model drug.

Doxorubicin hydrochloride is a cytotoxic anthracycline antibiotic widely used in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma, acute lymphoblastic leukemia, breast carcinoma and several others types of cancers. The mechanism of cytotoxicity involves the specific intercalation of planar anthracycline nucleus of DH to the DNA double helix resulting in the prevention of further DNA replication²³.

The present communication reports the synthesis of PBC nanoparticles by emulsion polymerization and its characterization by particle size analysis, transmission electron microscopy and zeta potential measurements. Particle formation process was studied during polymerization by particle size measurements. Effect of polymerization factors such as monomer concentration, polymerization temperature and surfactant concentration on the particle size and distribution was studied. Drug loading to nanoparticles was done by different techniques and their effect on drug release kinetics was evaluated.

MATERIALS

Doxorubicin hydrochloride was a gift sample from RPG life sciences limited (India). N-butyl cyanoacrylate was a kind gift from Sun Pharmaceutical Industries Limited (India). Poloxamer 188 was obtained from BASF, Germany. All other chemicals and reagents used in the study were of analytical grade. Water used through out the study was distilled and filtered through 0.22 μ filter (Pall, India) before use.

METHODS

Synthesis of Polybutyl cyanoacrylate (PBC) nanoparticles

PBC nanoparticles were synthesized by anionic radical polymerization in acidic medium in the presence of poloxamer 188 above CMC.

los demás productos químicos y reactivos utilizados en el estudio eran de grado analítico. El agua utilizada en todo el estudio era agua destilada y filtrada a través de un filtro de 0,22 μ (Pall, India) antes de su uso.

MÉTODOS

Síntesis de nanopartículas de polibutirianoacrilato (PBC)

Las nanopartículas de PBC se sintetizaron mediante polimerización radical aniónica en medio ácido en presencia de poloxámero 188 en concentración superior a CMC. El poloxámero 188 es un surfactante de copolímero en bloque de polioxietileno-polioxipropileno. La CMC de poloxámero 188 comunicada²⁴ fue $4,8 \times 10^{-4}$ M. En síntesis, el monómero se añadió mediante goteo al medio ácido (0,001N HCl) que contiene 0,5 % w/v de poloxámero 188 removiendo de forma controlada a 700 rpm y 37 °C salvo que se estipulen otras condiciones. La polimerización continuó durante 3 horas. La dispersión de nanopartículas se neutralizó hasta un pH 7,0 añadiendo mediante goteo un tampón de fosfato (7,4 pH) con NaOH y removiendo durante 1 hora para permitir la polimerización completa.

Carga del fármaco en las nanopartículas

La carga del fármaco en las nanopartículas se realizó a través de dos métodos: a) adición de DH antes de la polimerización (DPBC-(in)) y b) adición de DH después de la formación de las nanopartículas (DPBC-(ad)). En el método DPBC-(in), el DH se disolvió en 0,001N HCl junto con un surfactante y la polimerización se realizó como en el caso de las nanopartículas de PBC. En el método DPBC-(ad), la solución acuosa de DH se añadió a la dispersión de partículas de DH mientras se removía y se incubó durante la noche a $37 \pm 2^\circ\text{C}$. La dispersión se centrifugó a 15000 rpm durante 30 minutos y el sedimento fue recogido y liofilizado.

Poloxamer 188 is polyoxyethylene-polyoxypropylene block co-polymer surfactant. The CMC of Poloxamer 188 was reported²⁴ to be 4.8×10^{-4} M. Briefly, monomer was added drop wise into the acidic medium (0.001N HCl) containing 0.5 % w/v Poloxamer 188 under controlled stirring at 700 RPM and 37°C unless otherwise stated. Polymerization was continued for 3h. The nanoparticle dispersion was neutralized to pH 7.0 by drop wise addition of 7.4 pH phosphate buffer containing NaOH, and stirred for 1h to allow complete polymerization.

Drug loading into nanoparticles

Drug loading into nanoparticles was done by two methods. a) addition of DH before polymerization (denoted as DPBC-(in)) and b) addition of DH after nanoparticle formation (denoted as DPBC-(ad)). In DPBC-(in), the DH was dissolved in 0.001N HCl along with surfactant and polymerization was performed as for PBC nanoparticles. In case of DPBC-(ad), the aqueous solution of DH was added to the PBC nanoparticle dispersion under stirring, and incubated overnight at $37 \pm 2^\circ\text{C}$. The dispersion was centrifuged at 15000 RPM for 30 min, and the sediment was collected and freeze dried.

Estimation of doxorubicin hydrochloride in DPBC nanoparticles

Nanoparticulate dispersion was centrifuged at 15000 RPM for 30 min in a cooling centrifuge (Remi C24, Remi, India). The supernatant was decanted and the sediment was washed thrice with distilled water to separate the free drug from nanoparticles, and freeze dried. The dried sample was weighed and dissolved in methanol, and estimated for drug content in UV-Visible spectrophotometer (Hitachi U 2000, Japan) at 495 nm. In case of drug adsorbed nanoparticles, the sediment was not washed and was directly freeze dried and dissolved in methanol for estimation.

Particle size measurement

Particle size measurements were carried out by dynamic light scattering using Malvern Hydro

Estimación de clorhidrato de doxorubicina en las nanopartículas de DPBC

La solución de nanopartículas se centrifugó a 15000 rpm durante 30 minutos en un centrifugador por enfriamiento (Remi C24, Remi, India). Se decantó la parte flotante y el sedimento se lavó tres veces con agua destilada para separar el fármaco libre de las nanopartículas y se liofilizó. La muestra seca se pesó y se disolvió en metanol y se calculó el contenido de fármaco a 495 nm en un espectrofotómetro de UV-visible (Hitachi U 2000, Japón). Si el fármaco había adsorbido nanopartículas, el sedimento no se lavó y fue liofilizado directamente y disuelto en metanol para su estimación.

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). Las soluciones acuosas de nanopartículas se inyectaron a través del puerto de inyección de la muestra y se mantuvo un intervalo de oscurecimiento láser comprendido entre el 10 y el 20 %. El análisis se realizó tres veces y se consideraron los valores medios.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Los estudios de microscopía electrónica de transmisión 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 solución diluida en una rejilla de cobre con una película de carbono de 200 mesh. Se utilizó un 2 % uranyl-acetato para teñir las nanopartículas.

Mediciones de potencial zeta

La determinación del potencial zeta de nanopartículas se realizó con un equipo Malvern Zetasizer 3000 HS_A (Malvern Instruments, RU). La solución acuosa de nanopartículas se diluyó en varios medios (0,001 N HCl, solución salina

2000 SM particle size analyzer (Malvern instruments, UK). Aqueous nanoparticulate dispersions were injected through sample injection port, and the laser obscuration range was maintained between 10-20%. The analysis was performed thrice and average values were taken.

Transmission electron microscopy (TEM)

TEM studies were performed in Philips Technai-20 transmission electron microscope (Philips, Holand). Nanoparticles were dispersed in deionized 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.

Zeta potential measurement

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

Release of DH from DPBC nanoparticles

Drug release from DPBC nanoparticles was performed in 0.001 N HCl and 0.9% saline (154.0 mM sodium chloride). The aqueous nanoparticle dispersion was placed in cellulose dialysis bag¹⁷ (Hi-Media, cutoff 5000) and was sealed at both ends. The dialysis bag was dipped in receptor compartment containing dissolution medium, which was stirred continuously at 100 rpm maintained at $37 \pm 2^\circ\text{C}$. The receptor compartment was covered to prevent the 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. Calibration curves were constructed in 0.001 N HCl and 0.9 % saline for analysis of drug samples in the same medium. All experiments were repeated thrice and the average values were taken.

al 0,9 %, tampón de fosfato pH 7,4 y tampón tris pH 8,0) y se midió el potencial zeta.

Liberación de DH de las nanopartículas de DPBC

La liberación de fármaco de nanopartículas de DPBC se realizó en 0,001 N HCl y solución salina al 0,9 % (154,0 mM de cloruro sódico). La solución acuosa de nanopartículas se colocó en una bolsa de diálisis de celulosa¹⁷ (Hi-Media, máximo 5000 mmr). 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 $37 \pm 2^\circ\text{C}$. El compartimento receptor se cubrió 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. Las curvas de calibración se elaboraron en 0,001 N HCl y solución salina al 0,9 % para analizar las muestras de fármaco en el mismo medio. Todos los experimentos se repitieron tres veces y se consideraron los valores medios.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Formación de nanopartículas de PBC

Las nanopartículas de polibutil-cianoacrilato se sintetizaron en presencia de un surfactante polioxietileno-polioxipropileno (poloxámero 188) en concentración superior a CMC mediante polimerización radical aniónica en medio ácido a través de la lenta adición de monómeros a la fase acuosa que contenía el surfactante. El radical hidróxilo (OH) generado en la fase acuosa actúa como iniciador de la polimerización. De forma mecánica, la polimerización se puede considerar en dos fases: La fase 1, en la que se inicia la polimerización en las micelas y la fase 2, en la que se forman las partículas primarias. Las micelas formadas por el surfactante en la fase acuosa se unen al monómero para formar estructuras más complejas.²⁵ Una pequeña cantidad de surfactante se transfiere desde las micelas a la superficie, donde actúa como agente estabilizante. La entrada de radicales hidróxilos

RESULTS AND DISCUSSION

Formation of PBC nanoparticles

Polybutyl cyanoacrylate nanoparticles were synthesized in the presence of polyoxyethylene-polyoxypropylene surfactant (Poloxamer 188) above CMC by anionic radical polymerization in acidic medium by slow addition of monomer into the aqueous phase containing surfactant. The hydroxyl radicals generated in the aqueous phase acts as initiator for polymerization. Mechanistically, the polymerization can be considered in two stages. Stage 1 in which the polymerization is initiated in micelles, and stage 2 in which it proceeds in primary particles. Micelles formed by the surfactant in aqueous phase takes up monomer to form swollen structures.²⁵ A small amount of surfactant is transferred from micelles to its surface, where it acts as a stabilizing agent. The entry of hydroxyl radicals into the monomer swollen micelles initiates polymerization to form primary particles. The primary particles are essentially stabilized by surfactant molecules. Consequently, surfactant in the free state disappears quickly and so do the micelles.²⁶ The function of surfactant at this stage has become as that of a protective colloid. Monomer present in the emulsion droplets diffuses into primary particles resulting in swollen particles. The entry of hydroxyl radical into particle causes initiation of monomer for further polymerization resulting in particle growth. The polymerization continues till all the monomer in the droplets is utilized.

When the free radical enters a particle, polymerization is initiated and continues until it is terminated by the entry of another radical into the particle.²⁷ Thus it is possible for a molecule to grow to very high molecular weight before the radical is terminated. This process occurs simultaneously in large number of particles, and as the particles are isolated in the medium by the intervening aqueous phase, a growing polymer molecule in one particle cannot terminate its counter part in another particle²². Hence the overall rate of polymerization is high as indicated by rapid achievement of constant particle size with narrow size distribution (Figure 1). The findings are in contrast with that observed by Behan et al²⁰ in dispersion polymerization of n-butyl cyanoacrylate, where a continuous variation

en las micelas del monómero inicia la polimerización para formar las partículas primarias. Las partículas primarias se estabilizan principalmente con moléculas surfactantes. Por consiguiente, el surfactante en estado libre desaparece rápidamente y lo mismo ocurre con las micelas.²⁶ La función del surfactante en esta fase es la misma que la de un coloide protector. El monómero se presenta en la emulsión en forma de gotitas que migran a las partículas primarias transformándose en partículas hinchadas. La entrada del radical hidróxilo en la partícula origina el monómero para la posterior polimerización que da lugar al crecimiento de la partícula. La polimerización continúa hasta que se han utilizado todas las gotitas de monómero.

Cuando el radical libre entra en una partícula, la polimerización comienza y continúa hasta que finaliza con la entrada de otro radical en la partícula.²⁷ De este modo, es posible que una molécula crezca hasta alcanzar un peso molecular muy elevado antes de que el radical alcance la fase de terminación. Este proceso se desarrolla al mismo tiempo en un gran número de partículas y, como las partículas están aisladas en el medio a través de la fase acuosa, una molécula de polímero que esté creciendo en una partícula no puede terminar su crecimiento en otra partícula²². Por lo tanto, la tasa media de polimerización es alta, como muestra el rápido alcance de un tamaño de partículas constante con reducida distribución de tamaño (Figura 1). Los resultados contrastan con los obtenidos por Behan et al²⁰ a partir del análisis de la polimerización por dispersión del n-butyl cianoacrilato, en la que se observa una continua variación en la distribución del tamaño a lo largo del proceso de polimerización. El tamaño más reducido de nanopartículas de PBC sintetizadas mediante polimerización por emulsión se debe al alto grado de compartimentalización del locus de polimerización en presencia del surfactante. El tamaño mayor de partículas que se observa en las curvas de distribución se puede deber a la contribución de la polimerización en las gotitas de emulsión y a la nucleación homogénea. El microscopio electrónico de transmisión de nanopartículas reveló la naturaleza esférica de las mismas (Figura 2).

in size distribution was observed through out the polymerization. The smaller size of PBC nanoparticles synthesized by emulsion polymerization is due to the high degree of compartmentalization of polymerization locus in the presence of surfactant. The larger particles observed in distribution curves may be attributed to the contribution of polymerization in emulsion droplets and homogeneous nucleation. The transmission electron microscopy of nanoparticles revealed their spherical nature (Figure 2).

Drug loading into nanoparticles

Drug containing nanoparticles were prepared either by addition of DH to the polymerization medium prior to the monomer addition or after polymerization (DPBC-(in) and DPBC-(ad) respectively). The entrapment efficiencies were found to be 64.5 % and 61.5 % for DPBC-(in) and DPBC-(ad) nanoparticles respectively. This shows that there is no significant difference in entrapment efficiency of nanoparticles loaded by both methods. Generally, drug loading by adsorption method leads to lower entrapment efficiencies. But in this case, the adsorption method showed comparable entrapment efficiency to that of DPBC-(in) nanoparticles. The reason for such high entrapment efficiency, as proposed by Illum et al²⁸ was the side by side association between the doxorubicin molecules and their end-on confirmation at the surface. The penetration of DH into porous cyanoacrylate nanoparticles²⁹ could be an additional mechanism contributing to the high drug entrapment following adsorption. The preparation of DPBC-(ad) nanoparticles is relatively simpler and involves the adsorption of DH to the preformed nanoparticles. The purification stage in DPBC-(in) nanoparticles may lead to the loss of small amounts of drug from the nanoparticles resulting in reduced entrapment efficiency. Hence, the drug loading by adsorption method is advantageous which also avoids the exposure of drug to the polymerization conditions.

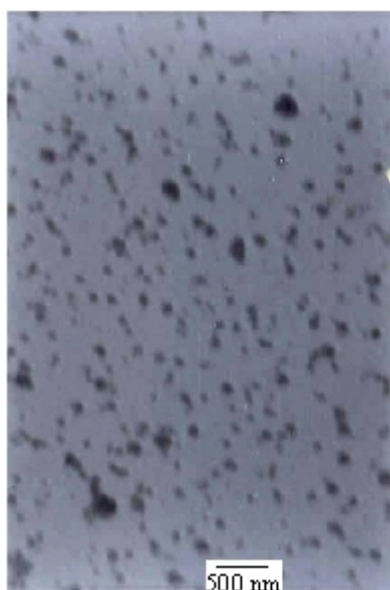
FIGURA 1.- Curvas de distribución de tamaño de partículas de la polimerización por emulsión del n-butil cianoacrilato en diferentes intervalos de tiempo. (◊) 5 min, (◻) 10 min, (△) 30 min, (◼) 45 min, (×) 1 h, (◇) 2 h, (+) 3 h, (—) 4 h

FIGURE 1.- Particle size distribution curves of the emulsion polymerization of n-butyl cyanoacrylate at various time intervals. (◊) 5 min, (◻) 10 min, (△) 30 min, (◼) 45 min, (×) 1 h, (◇) 2 h, (+) 3 h, (—) 4 h



FIGURA 2.- Micrografía electrónica de transmisión de nanopartículas de polibutil-cianoacrilato sintetizadas mediante polimerización por emulsión.

FIGURE 2.- Transmission electron micrograph of polybutyl cyanoacrylate nanoparticles synthesized by emulsion polymerization.



Carga del fármaco en las nanopartículas

Se prepararon nanopartículas con fármaco añadiendo DH al medio de polimerización antes de la adición de monómero (DPBC- (in) y después de la polimerización (DPBC- (ad), respectivamente). La eficacia de captura fue de un 64,5 % (método DPBC-(in) y de un 61,5 % (método DPBC-(ad), respectivamente. Estos resultados indican que no existe una diferencia significativa en la eficacia de captura de las nanopartículas cargadas con ambos métodos. Generalmente, la carga de fármaco realizada mediante el método de la adsorción produce un menor grado de eficacia de captura. Sin embargo, en este caso la eficacia de captura obtenida mediante el método de adsorción fue similar a la resultante de la carga de nanopartículas mediante el método DPBC-(in). La razón de esta elevada eficacia de captura, como propusieron Illum et al²⁸, fue la estrecha asociación entre las moléculas de doxorubicina y su confirmación final en la superficie. La penetración de DH en las nanopartículas porosas de cianoacrilato²⁹ pudo constituir un mecanismo adicional que contribuyó al alto grado de captura de fármaco posterior a la adsorción. La preparación de las nanopartículas de DPBC-(ad) es relativamente sencilla e implica la adsorción de DH en las nanopartículas preformadas. La fase de purificación de las nanopartículas cargadas mediante el método DPBC-(in) puede conducir a una pérdida de pequeñas cantidades del fármaco cargado en las nanopartículas que puede provocar, a su vez, una reducción en la eficacia de captura. Por lo tanto, la carga de fármaco mediante el método de adsorción resulta ventajosa e impide la exposición del fármaco a las condiciones de polimerización.

*Efecto de los factores de la polimerización en el tamaño y la distribución de las nanopartículas de PBCA**Concentración de monómeros*

Se realizaron mediciones del tamaño de las nanopartículas sintetizadas con diferentes concentraciones de monómeros para estudiar el tamaño y el patrón de distribución. Las concentraciones de monómeros se seleccionaron en un intervalo comprendido entre el 0,5 % y el 4 % v/v. Las nanopartículas mostraron un tamaño y una distribución similar con las diferentes concen-

Effect of polymerization factors on size and distribution of PBCA nanoparticles
Monomer concentration

Particle size measurements were done for nanoparticles synthesized with different monomer concentrations, to study the size and distribution pattern. Monomer concentrations were selected in the range of 0.5 % - 4 % w/v. The nanoparticles showed similar size and distribution with the monomer concentrations used in the study (Figure 3). A slight shift in particle size distribution towards larger diameter was observed with monomer concentrations above 2.5 % w/v. However the average particle size was not significantly different with that obtained from low monomer concentrations. At Poloxamer concentration above CMC, the number of micelles elevates²⁴ resulting in high degree of compartmentalization of polymerization locus. Hence even at high monomer concentrations, due to the formation of large number of micelles by the surfactant, the particle size remained similar to that of the size obtained at low monomer concentrations.

Polymerization temperature

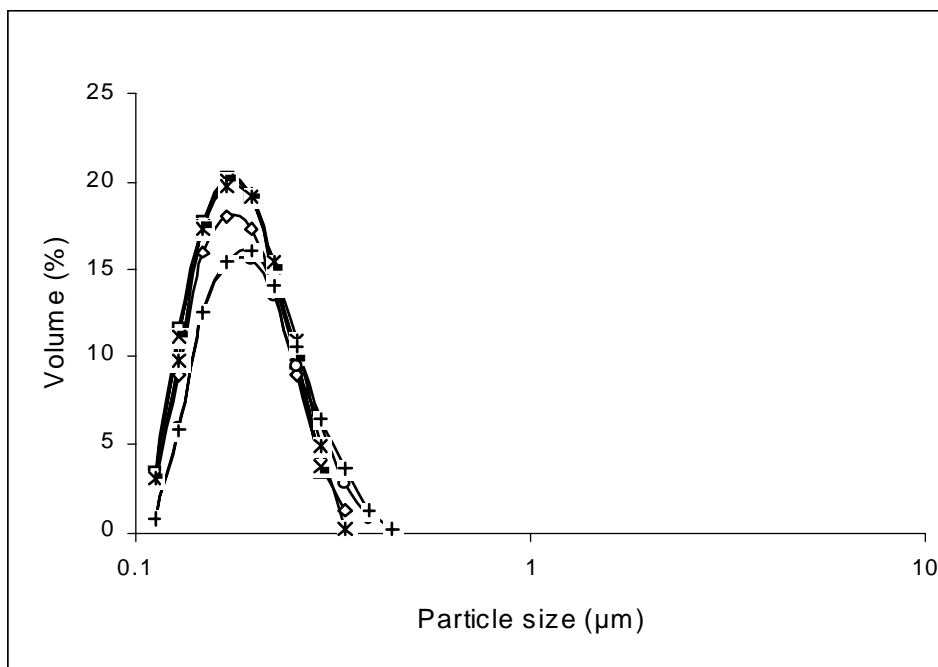
Figure 4 shows the particle size and distribution pattern of nanoparticles synthesized at different temperatures such as 10°C, 37°C and 60°C. The size and distribution of nanoparticles did not vary much at low and moderate temperatures (10°C and 37°C respectively). At 60°C, a significant increase in particle size with broad particle distribution was observed. The distribution curve showed a definite shift towards the larger particle size. Several factors may contribute to the formation of larger particles at high temperature. Micelle formation of Poloxamer 188 in aqueous solution is critically dependant upon temperature. Below room temperature, both propylene oxide (PO) and ethylene oxide (EO) blocks within the poloxamer molecule are hydrated and are relatively soluble in water. With increase in temperature the PO block dehydrates and becomes insoluble resulting in the formation of micelles. The critical micelle temperature (CMT) (temperature at which micelles are formed) for Poloxamer range between 25 to 40°C.²⁴ Larger particle size obtained at high temperature can be

traciones de monómeros empleadas en el estudio (Figura 3). Se observó un ligero cambio en la distribución del tamaño de las partículas (aumento de diámetro) al utilizar concentraciones de monómeros superiores al 2,5 % v/v. Sin embargo, no se apreció una diferencia significativa en el tamaño medio de las mismas al utilizar diferentes concentraciones de monómeros. Con una concentración de poloxámero superior a CMC, se produce un aumento del número de micelas²⁴ responsable del mantenimiento constante del alto grado de compartimentalización del locus de polimerización. Por lo tanto, incluso con concentraciones elevadas de monómeros, el tamaño de las partículas es similar al obtenido con bajas concentraciones como consecuencia de la formación de un gran número de micelas en presencia del surfactante.

attributed to more dehydration of both types of blocks within the Poloxamer molecule. High temperature also leads to increase in kinetic energy of system, and polymerization at these conditions may cause increase in inter-particle collisions resulting in agglomeration and high particle size, similar to that observed by Douglas et al³⁰ in case of dispersion polymerization of butyl cyanoacrylate. The broad particle distribution at high temperature can be attributed to homogeneous nucleation due to increase in aqueous solubility of monomer.

FIGURA 3.- Curvas representativas del efecto de la concentración de monómeros en el tamaño y la distribución de las nanopartículas de polibutil-cianoacrilato. (—○—) 0,5 % w/v monómero, (—□—) 1 % w/v monómero, (—△—) 1,5 % w/v monómero, (—×—) 2 % w/v monómero, (—·—) 2,5 % w/v monómero, (—◇—) 3 % w/v monómero, (—+—) 3,5 % w/v monómero, (—) 4 % w/v monómero.

FIGURE 3.- Curves representing the effect of monomer concentration on particle size and distribution of polybutyl cyanoacrylate nanoparticles. (—○—) 0.5 % w/v monomer, (—□—) 1 % w/v monomer, (—△—) 1.5 % w/v monomer, (—×—) 2 % w/v monomer, (—·—) 2.5 % w/v monomer, (—◇—) 3 % w/v monomer, (—+—) 3.5 % w/v monomer, (—) 4 % w/v monomer.

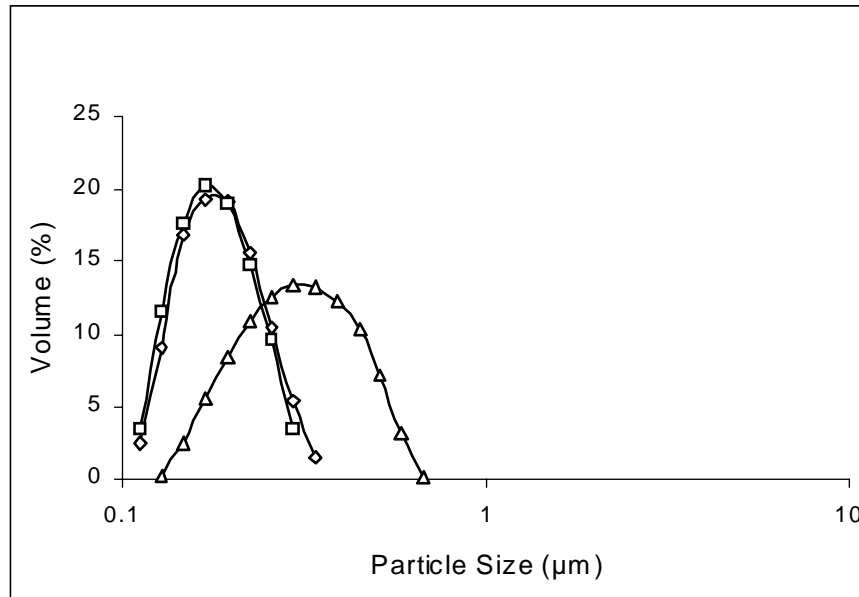


Temperatura de polimerización

La Figura 4 muestra el patrón de distribución y el tamaño de nanopartículas sintetizadas a diferentes temperaturas (10 °C, 37 °C y 60 °C). El tamaño y la distribución de las nanopartículas no presentó una diferencia significativa al aplicar una temperatura baja (10 °C) o moderada (37 °C). A 60 °C, se apreció un aumento significativo en el tamaño de las partículas y una distribución más extensa. La curva de distribución muestra un cambio evidente hacia un mayor tamaño de las partículas. Pueden intervenir varios factores en la formación de partículas de mayor tamaño a temperatura elevada. La formación de micelas de poloxámero 188 en solución acuosa depende estrechamente de la temperatura. Por debajo de la temperatura ambiente, los bloques de óxido de etileno y propileno presentes en la molécula de poloxámero se hidratan y son relativamente solubles en agua. Al aumentar la temperatura, el bloque de óxido de propileno se deshidrata y se convierte en insoluble, lo que da lugar a la formación de micelas. La temperatura micelar crítica o TMC (temperatura a la que se forman las micelas) para el poloxámero está comprendida entre 25 y 40 °C.²⁴ El aumento del tamaño de las partículas que se observa a alta temperatura se puede atribuir al mayor grado de deshidratación de los dos tipos de bloques dentro de la molécula de poloxámero. La elevación de la temperatura también produce un aumento de la energía cinética del sistema y, en estas condiciones, la polimerización puede provocar un aumento del número de colisiones entre las partículas causante de una aglomeración y de un aumento de tamaño de las partículas semejante al observado por Douglas et al³⁰ en el caso de la polimerización por dispersión del butil-cianoacrilato. La extensa distribución de partículas a temperatura elevada se puede atribuir a la nucleación homogénea resultante del aumento de la solubilidad en agua del monómero.

FIGURA 4.- Curvas representativas del efecto de la temperatura de polimerización en el tamaño y la distribución de las nanopartículas de polibutil-cianoacrilato. (◊) 10°C, (◻) 37°C, (△) 60°C

FIGURE 4.- Curves representing the effect of polymerization temperature on particle size and distribution of polybutyl cyanoacrylate nanoparticles. (◊) 10°C, (◻) 37°C, (△) 60°C.



Concentración de surfactante

La Figura 5 muestra el tamaño y las curvas de distribución de nanopartículas sintetizadas con diferentes concentraciones de surfactante. Se utilizaron concentraciones de surfactante del 0,3 % w/v, 0,5 % w/v y 0,7 % w/v. El tamaño y la distribución de las nanopartículas no varió significativamente al utilizar diferentes concentraciones, debido posiblemente a la CMC de surfactante. El surfactante añadido al medio de polimerización forma micelas a CMC. Después de la absorción y polimerización del monómero, parte del surfactante migra a la superficie para producir la estabilización de las partículas. A continuación se produce otra polimerización en la propia partícula primaria, que da lugar a la formación de la partícula como locus de polimerización, y la función del surfactante se limita a la estabilización de la dispersión coloidal. En esta fase, la concentración de surfactante se reduce a consecuencia de la desaparición de micelas y a la utilización de surfactante para la estabilización de las partículas. Con concentraciones de surfactante muy superiores a CMC, la formación de micelas es muy rápida y la absorción de monómero por la partícula primaria y su polime-

Surfactant concentration

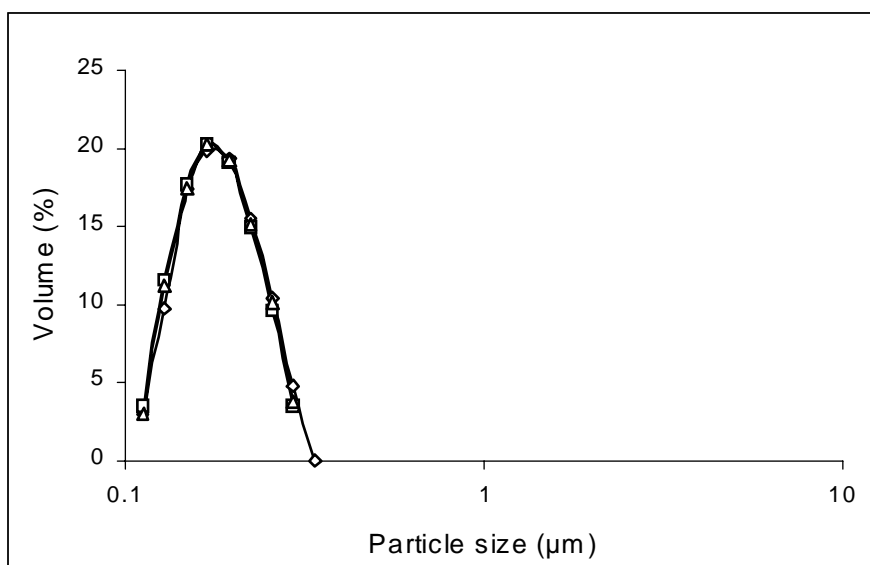
Figure 5 shows the size and distribution curves of nanoparticles synthesized at various surfactant concentrations. The surfactants were used in the concentrations 0.3 % w/v, 0.5 % w/v and 0.7 % w/v. The size and distribution of nanoparticles did not vary much with varied surfactant concentrations which can be explained on the basis of CMC of surfactant. The surfactant added in the polymerization medium forms micelles at CMC. After uptake of monomer and its polymerization, some amount of surfactant migrates to the surface for particle stabilization. Further polymerization proceeds in the primary particle itself, forming the particle as polymerization locus, and the role of surfactant now is only to stabilize colloidal dispersion. At this stage, the surfactant concentration reduces due to disappearance of micelles and utilization of surfactant for particle stabilization. At surfactant concentration far above the CMC the micelle formation is very rapid, and monomer uptake by the primary particle and its polymerization proceeds till all the monomer in the system is utilized. The amount of surfactant added in all the three cases in the study is well above the CMC. Under such a condition, an

rización continúa hasta que se ha utilizado todo el monómero del sistema. La cantidad de surfactante añadida en los tres casos del estudio fue bastante superior a la CMC. En tales condiciones, también habría cabido esperar un aumento en la conversión de monómero debido a su efecto solubilizador mediante el aumento del número de micelas y el mantenimiento de la elevada temperatura de compartimentalización del locus de polimerización. Con menores concentraciones de surfactante (es decir, concentraciones superiores a CMC), la polimerización puede ser incompleta debido a la baja tasa de conversión de monómero y, en consecuencia, se puede producir un aumento del tamaño de las partículas del sistema.

increase in monomer conversion could also be expected due to its solubilizing effect by more micelles and maintenance of high degree of compartmentalization of the polymerization locus. At lower surfactant concentrations (i.e. the concentration just above CMC), incomplete polymerization may take place due to low monomer conversion, and thus a larger particle size of the system could be expected.

FIGURA 5.- Curvas representativas del efecto de la concentración de surfactante en el tamaño y la distribución de las nanopartículas de polibutil-cianoacrilato. (◊) 0,3 % w/v poloxámero 188, (◻) 0,5 % w/v poloxámero 188, (△) 0,7 % w/v poloxámero 188.

FIGURE 5.- Curves representing the effect of surfactant concentration on particle size and distribution of polybutyl cyanoacrylate nanoparticles. (◊) 0.3 % w/v Poloxamer 188, (◻) 0.5 % w/v Poloxamer 188, (△) 0.7 % w/v Poloxamer 188.



Mediciones de potencial zeta

La Tabla 1 muestra el potencial zeta de las nanopartículas de PBC y DPBC en cuatro medios diferentes: 0,001N HCl, solución salina al 0,9%, tampón de fosfato pH 7,4 y tampón tris pH 8,0. Las nanopartículas de PBC y DPBC presentaron un bajo potencial zeta en 0,001N HCl, que aumentó en el orden siguiente: 0,001N HCl < solución salina 0,9% < tampón de fosfato pH 7,4 < tampón tris pH 8,0. Los resultados coinci-

Zeta potential measurement

Table 1 shows the zeta potential of PBC and DPBC nanoparticles in four different media such as 0.001N HCl, 0.9% saline, pH 7.4 phosphate buffer and pH 8.0 tris buffer. Both PBC and DPBC nanoparticles showed low zeta potential in 0.001N HCl, and increased in the order of 0.001N HCl < 0.9% saline < pH 7.4 phosphate buffer < pH 8.0 tris buffer. The results obtained were in accordance with that reported by Muller et al.³¹ in

dieron con los obtenidos por Muller et al.³¹ a partir del estudio de las nanopartículas de polimetil, polietil, polisobutil y polisohehexil cianoacrilato. El bajo potencial zeta de las nanopartículas a pH bajo o medio se debe al bajo grado de disociación de los grupos de polímeros libres de ácido acrílico, que es más elevado a valores de pH superiores. La incorporación de DH a las nanopartículas de PBC provocó una ligera reducción del potencial zeta en todos los medios. Esta reducción de potencial se puede atribuir a una adsorción de DH en la superficie de la nanopartícula que dio lugar a la ocultación de la carga de superficie. Las nanopartículas con superficie hidrófila y alto potencial zeta (carga de superficie negativa) podrían constituir un sistema benéfico para la administración de fármacos. La superficie hidrófila de las nanopartículas sintetizadas mediante polimerización por emulsión podría evitar la opsonización de las partículas³² y el rápido aclaramiento de la circulación sanguínea. El aumento del tiempo de circulación provoca un aumento de la vida media del fármaco y del nivel de absorción de las nanopartículas en las células en general y, preferentemente, en los tejidos malignos debido a la naturaleza porosa de este endotelio.³³ Por otra parte, el reducido tamaño y la carga negativa de las nanopartículas puede favorecer el transporte en el medio de carga preferencial al sistema linfático a través del intersticio cargado negativamente³⁴ que, de lo contrario, actuaría como barrera para la entrada de varias moléculas terapéuticas. Esta función se puede explotar de manera efectiva en la selección de moléculas terapéuticas para el tratamiento de los carcinomas linfáticos.

case of polymethyl, polyethyl, polyisobutyl and polyisohehexyl cyanoacrylate nanoparticles. Low zeta potential of nanoparticles at low pH of medium is due to the low degree of dissociation of free acrylic acid groups of polymer, which is high at high pH values. Incorporation of DH into PBC nanoparticles resulted in a slight reduction in zeta potential in all the media. This can be attributed to the adsorption of DH on the nanoparticle surface, leading to masking of surface charge. Such nanoparticles with hydrophilic surface and high zeta potential (negative surface charge) could be a beneficial system for drug delivery. The hydrophilic surface of nanoparticles synthesized by emulsion polymerization, when administered intravenously could avoid opsonization of particles³² and rapid clearance from blood circulation. The increased circulation time results in increased half-life of drug and increased uptake of nanoparticles into cells in general and preferentially into malignant tissues due to the leaky nature of its endothelium.³³ On the other hand, the small size and negative charge of nanoparticles can have preferential charge mediated transport into the lymphatic system through the negatively charged interstitium³⁴ which otherwise is a barrier for the entry of several therapeutic molecules. This feature can be effectively exploited in targeting the therapeutic molecules for the treatment of lymphatic carcinomas.

TABLA 1.- Valores de potencial zeta de nanopartículas de PBC y DPBC sintetizadas mediante polimerización por emulsión. PBC = Polibutil-cianoacrilato, DPBC = Polibutil-cianoacrilato cargado con doxorubicina, NP = Nanopartículas.

TABLE 1.- Zeta potential values of PBC and DPBC nanoparticles synthesized by emulsion polymerization. PBC = Polybutyl cyanoacrylate, DPBC = Doxorubicin loaded polybutyl cyanoacrylate, NPs = Nanoparticles.

Medio de dispersión Dispersion medium	NP de PBC PBC NPs	NP de DPBC DPBC NPs
0,001N HCl	-0,5	1,3
Solución salina 0,9 % 0,9% saline	-3,2	-2,6
Tampón de fosfato pH 7,4 pH 7,4 phosphate buffer	-5,1	-4,5
Tampón tris pH 8,0 pH 8,0 Tris buffer	-27,5	-21,5

Liberación de DH in vitro de las nanopartículas de DPBC

Se realizaron estudios de liberación de fármacos in vitro de nanopartículas cargadas mediante los métodos DPBC-(in) y DPBC-(ad) en dos medios diferentes (0,001N HCl y solución salina al 0,9 %) para evaluar la liberación en medio fisiológico y ácido. Se observó una continua y mayor velocidad de liberación en las nanopartículas cargadas mediante el método DPBC-(ad) en ambos medios. En el caso de las nanopartículas cargadas mediante el método DPBC-(in), se apreció una velocidad de liberación inicial superior seguida de una repentina disminución (Figura 6). Los valores t_{25} (tiempo transcurrido para la liberación del 25 % de fármaco) para las nanopartículas cargadas mediante el método DPBC-(in) en 0,001N HCl y solución salina al 0,9 % fueron de 3,6 horas y 4,5 horas, respectivamente. En el caso de las nanopartículas cargadas mediante el método DPBC-(ad), el tiempo de liberación fue de 2,9 horas y 5 horas, respectivamente. En ambos lotes, la velocidad de liberación fue comparativamente superior en el medio de 0,001N HCl que en el medio salino, posiblemente debido a la protonación del grupo 3'-NH₂ de doxorubicina en medio ácido. El patrón de lenta liberación de fármaco en solución salina al 0,9 % y rápida liberación en medio ácido de las nanopartículas podría resultar ventajoso en los casos de administración intracelular de fármacos. En la administración

In vitro release of DH from DPBC nanoparticles

In vitro drug release studies of DPBC-(in) and DPBC-(ad) nanoparticles were performed in two different media such as 0.001N HCl and 0.9 % saline to evaluate the release in acidic and physiological media. DPBC-(ad) nanoparticles showed higher and continuous rate of release in both the media. While, DPBC-(in) nanoparticles showed initial higher rate of release followed by a sudden decrease (Figure 6). The t_{25} (time taken for 25 % drug release) values for DPBC-(in) nanoparticles in 0.001N HCl and 0.9 % saline were 3.6 h and 4.5 h respectively. While, for DPBC-(ad) nanoparticles, it was 2.9 h and 5 h respectively. In both the batches, the release was comparatively higher in 0.001N HCl than in saline media, presumably due to protonation of 3'-NH₂ group of doxorubicin in acidic media. The pattern of slow drug release in 0.9 % saline, and fast release in acidic media by nanoparticles could be advantageous when drugs are intended for intracellular delivery. When administered parenterally, it could be expected that the nanoparticles exhibit slow release in the physiological media till it reaches the intracellular site, and a rapid release at endosomal acidic pH aiding in high intracellular concentration, similar to that observed by Horwitz et al.³⁵ in case of pH sensitive liposomes.

por vía parenteral, cabría esperar que las nanopartículas mostraran una menor velocidad de liberación en medio fisiológico hasta alcanzar el medio intracelular y una rápida liberación a pH ácido endosomal que contribuiría a un aumento de la concentración intracelular semejante al observado por Horwitz et al.³⁵ en el estudio de los liposomas sensibles al pH.

FIGURA 6.- Liberación de clorhidrato de doxorubicina de nanopartículas de PBCA en dos medios diferentes. (—◇—) DPBC-(ad) en 0,001N HCl, (—□—) DPBC-(ad) en 0,9 % solución salina, (—△—) DPBC-(in) en 0,9 % solución salina, (—×—) DPBC-(in) en 0,001N HCl.

FIGURE 6.- Release of Doxorubicin hydrochloride from PBCA nanoparticles in two different media. (—◇—) DPBC-(ad) in 0.001N HCl, (—□—) DPBC-(ad) in 0.9 % saline, (—△—) DPBC-(in) in 0.9 % saline, (—×—) DPBC-(in) in 0.001N HCl.

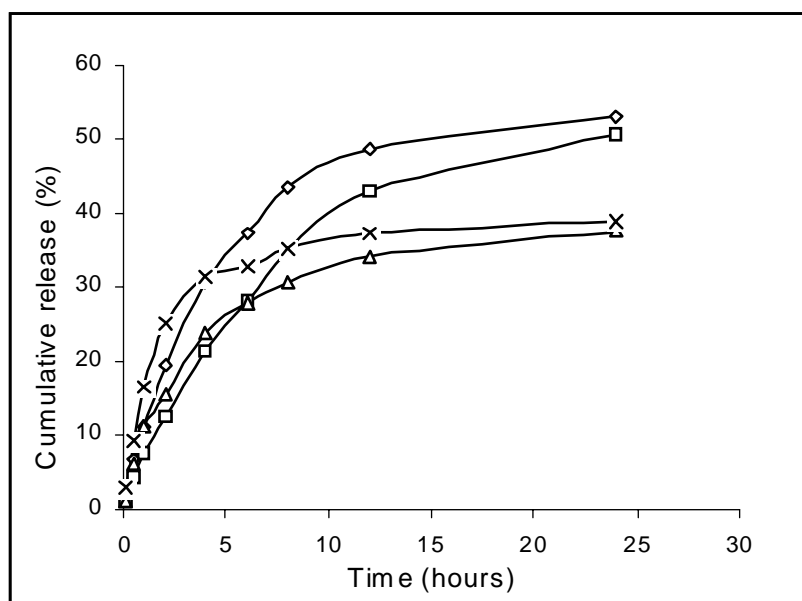


TABLA 2.- Valores de exponente difusional ('n') obtenidos a partir del análisis cinético de liberación de fármacos de nanopartículas de DPBC en varios medios.

TABLE 2.- Diffusional exponent ('n') values obtained from the kinetic analysis of drug release of DPBC nanoparticles in various media.

Tipo de preparación Type of preparation	Medio de liberación Release medium	Valor 'n' 'n' value
NP de DPBC (incorporadas) DPBC NPs (incorporated)	0,001N HCl	0,47
NP de DPBC (incorporadas) DPBC NPs (incorporated)	0,9% solución salina 0,9% saline	0,63
NP de DPBC (adsorbidas) DPBC NPs (adsorbed)	0,001N HCl	0,63
NP de DPBC (adsorbidas) DPBC NPs (adsorbed)	0,9% solución salina 0,9% saline	0,71

El análisis cinético de la liberación de fármaco se realizó según la ecuación (Ritger y Peppas 1987)³⁶,

$$Mt/M_{\infty} = kt^n \quad (1)$$

$$\text{Log } (Mt/M_{\infty}) = \text{Log } k + n \text{ log } t \quad (2)$$

Donde (Mt/M_{∞}) es la fracción liberada, k la constante cinética y n el exponente difusional. En la Tabla 2 se muestran los resultados del análisis cinético.

Los resultados del análisis cinético muestran que la liberación de DH de las nanopartículas cargadas mediante el método DPBC-(in) se realizó según la difusión Fickian en 0,001N HCl, mientras que la difusión fue anómala en el medio salino. Las nanopartículas cargadas mediante el método DPBC-(ad) en ambos medios siguieron la ecuación Higuchi (Mt/M_{∞} frente a $t^{1/2}$) con liberación de fármaco de sistemas matriciales. Esta observación indica que las moléculas de doxorubicina penetran en la matriz porosa de las nanopartículas de DPBC después de la adsorción.

CONCLUSIONES

La polimerización del n-butil cianoacrilato en presencia de un surfactante en concentración superior a CMC conduce a la formación de nanopartículas de tamaño inferior. La polimerización con diferentes concentraciones de monómeros no mostró una influencia significativa en el tamaño y la distribución de las partículas. La polimerización a temperatura baja (10 °C) y moderada (37 °C) dio lugar a la formación de partículas de menor tamaño, mientras que la polimerización a alta temperatura (60 °C) provocó la formación de partículas más grandes, posiblemente como consecuencia de una mayor deshidratación de los bloques de óxido de etileno y óxido de propileno del poloxámero y a la aglomeración de partículas. Estos resultados indican que la polimerización a altas temperaturas no presenta ninguna ventaja sobre la polimerización a temperatura baja y moderada. Las diferentes concentraciones de surfactante utilizadas en el estudio no afectaron significativamente al patrón de distribución y tamaño de las partículas. Las nanopartículas mostraron valores crecientes de potencial zeta con aumento de pH del medio de medida y se observó una reducción de

The kinetic analysis of drug release was performed according to the equation (Ritger and Peppas 1987)³⁶,

$$Mt/M_{\infty} = kt^n \quad (1)$$

$$\text{Log } (Mt/M_{\infty}) = \text{Log } k + n \text{ log } t \quad (2)$$

Where (Mt/M_{∞}) is the fractional amount released, k is the diffusional constant and n is the diffusional exponent. The results of kinetic analysis are given in Table 2.

The results of kinetic analysis reveal that the release of DH from DPBC-(in) nanoparticles followed Fickian diffusion in 0.001N HCl, while it showed anomalous diffusion in saline media. DPBC-(ad) nanoparticles in both the media followed Higuchi equation (Mt/M_{∞} versus $t^{1/2}$) indicating the drug release from matrix systems. This observation indicates that the doxorubicin molecules do penetrate into the porous matrix of the DPBC nanoparticles following adsorption.

CONCLUSIONS

Polymerization of n-butyl cyanoacrylate in presence of a surfactant above CMC lead to the formation of nanoparticles with smaller size. Polymerization at varied monomer concentrations did not show much influence on particle size and distribution. Polymerization at low and moderate temperatures (10°C and 37°C) yielded particles with smaller size, while higher temperature (60°C) resulted in larger particles, which may be due to more dehydration of PO and EO blocks of poloxamer and particle agglomeration. This indicates that polymerization at high temperatures do not offer any advantage over the polymerization at low and moderate temperatures. Variable surfactant concentrations considered in the study did not show much change in particle size and distribution pattern. Nanoparticles exhibited increased zeta potential values with increased pH of the media of measurement, and a reduction in zeta potential was observed upon drug loading. Such nanoparticles with hydrophilic surface due to the adsorption of surfactant, and negative charge could be an efficient system for delivering drugs, requiring prolonged blood circulation time and, for targeting to lymphatic system. Nanoparticles loaded by incorporation and adsorption of DH showed prolonged release,

potencial zeta tras la carga de fármaco. Estas nanopartículas con superficie hidrófila a consecuencia de la adsorción de surfactante y carga negativa podrían constituir un sistema efectivo para la administración de fármacos con un tiempo de circulación sanguínea prolongado de aplicación en el sistema linfático. Las nanopartículas cargadas mediante incorporación y adsorción de DH mostraron una liberación prolongada que indica su utilidad en administraciones controladas.

indicating their usefulness in controlled delivery applications.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are thankful to University Grants Commission (UGC) India for funding this work.

AGRADECIMIENTOS

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

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Kreuter J. Nanoparticles. In: Kreuter J (ed.) Colloidal drug delivery systems, Marcel Dekker, New York, 1994; pp 219-342.
2. Jackanicz TM, Nash HA, Wise DL, Gregory JB. Poly lactic acid as a biodegradable carrier for contraceptive steroids. *Contraception* 1973; 8: 227-34.
3. Wise DL, Fellman TD, Sanderson JE, Wentworth RL. Lactide/glycolide acid polymers, In Gregoriadis G (Ed.) Drug carriers in biology and medicine. Academic press, London, 1979; pp 237-70.
4. Pitt CG, Gratzl MM, Jeffcot AR, Zweidinger R, Schindler A. Sustained release drug delivery systems II: factors affecting release rate for poly(ϵ -caprolactone) and related biodegradable polyesters. *J Pharm Sci* 1979; 68: 1534-38.
5. Lescure F, Seguin C, Breon P, Bourrinet P, Roy D, Couvreur P. Preparation and characterization of novel poly(methylidene malonate 2.1.2.)-made nanoparticles. *Pharm Res* 1994; 9: 1270-77.
6. Fernandez-Urrusuno R, Calvo P, Remunan-Lopez C, Villa-Jato JL, Alonso MJ. Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharm Res* 1999; 16: 1576-81.
7. Farrugia CA, Grover MJ. Gelatin behavior in dilute aqueous solutions: Designing a nanoparticulate formulations. *J Pharm Pharmacol* 1999; 51: 643-49.
8. Beck PH, Kreuter J, Muller EG, Schatton W. Improved peroral delivery of avarol with polybutyl cyanoacrylate nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 1994; 40: 134-37.
9. 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: 171-74.
10. 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: 121-24.
11. Couvreur P, Kante B, Roland M, Guiot P, Bauduin P, Speiser P. Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties. *J Pharm Pharmacol* 1979; 31: 331-32.
12. El-Egakey MA, Bentele V, Kreuter J. Molecular weights of polycyanoacrylate nanoparticles. *Int J Pharm* 1983; 13: 349-52.
13. Grislain L, Couvreur P, Lenaerts V, Roland M, Deprez-Decampeneere D, Speiser P. Pharmacokinetics and biodistribution of a biodegradable drug-carrier. *Int J Pharm.* 1983; 15: 335-45.
14. Douglas SJ, Davis SS, Illum L. Biodistribution of poly(butyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles in rabbits. *Int J Pharm.* 1986; 34: 145-52.
15. Sommerfeld P, Schroeder U, Sabel BA. Long-term stability of PBCA nanoparticle suspensions suggests clinical usefulness. *Int J Pharm* 1997; 155:201-07.
16. 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.
17. 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.
18. Brasseur N, Brault D, Couvreur P. Adsorption of hematoporphyrin onto polyalkyl cyanoacrylate nanoparticles: carrier capacity and drug release. *Int J Pharm* 1991; 70: 129-35.

19. 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: 111-19.
20. Behan N, Birkinshaw C, Clarke N. Poly n-butyl cyanoacrylate nanoparticles: a mechanistic study of polymerization and particle formation. *Biomaterials* 2001; 22: 1335-44.
21. Bhawal S, Pokhriyal NK, Devi S. Translucent nanolatexes through emulsion polymerization of ethyl acrylate. *European Polymer Journal* 2002; 38: 735-44.
22. Bovey FA, Kolthoff IM, Medalia AI, Meehan EJ. In: Bovey FA, Kolthoff IM, Medalia AI, Meehan EJ (eds.) *Emulsion polymerization*, Interscience publishers, New York, 1955; pp 1-22.
23. Vigevani A, Williamson MJ. Doxorubicin. In: Florey K, (ed.) *Analytical profiles of drug substances*. Academic press, New York, 1980; pp 245-74.
24. Kabanov AV, Batrakova EV, Alakhov VY. Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J Cont Rel* 2002; 82: 189-212.
25. Dunn AS. In: Lovell PA, El-Aasser MS (eds.) *Emulsion polymerization and emulsion polymers*, John Wiley Inc., New York, 1997; pp 126-135.
26. Ballard MJ, Napper DH, Gilbert RG. Kinetics of emulsion polymerization of methyl methacrylate. *J Polymer Sci: Polymer Chemistry edition* 1984; 22: 3225-3253.
27. Pearson LT, Louis PE, Gilbert RG, Napper DH. Studies of particle formation in styrene emulsion polymerizations using 9-vinyl anthracene as a probe molecule. *J Polymer Sci Part-A: Polymer Chemistry* 1991; 29: 515-523.
28. Illum L, Khan MA, Mak E, Daviss SS. Evaluation of carrier capacity and release characteristics for poly(butyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles. *Int J Pharm* 1986; 30: 17-28.
29. Kreuter J. Physicochemical characterization of polyacrylic nanoparticles. *Int J Pharm*. 1983; 14: 43-58.
30. Douglas SJ, Illum L, Davis SS, Kreuter J. Particle size and size distribution of poly(butyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles I. Influence of physicochemical factors. *J Colloid Interface Sci* 1984; 101: 149-58.
31. 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.
32. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice. *Pharmacol Rev* 2001; 53: 283-318.
33. Duncan R. Polymer conjugates for tumor targeting and intracytoplasmic delivery. The EPR effect as a common gateway? *Pharm Sci Tech Today* 1999; 2: 441-49.
34. Takakura Y, Matsumoto S, Hashida M, Sezaki H. Enhanced lymphatic delivery of mitomycin C conjugated with dextran. *Cancer Res* 1984; 44: 2505.
35. Horwitz BA, Shintizky M, Kreutz W, Yatwin MB. pH sensitive liposomes: possible clinical implications. *Science (Wash DC)* 1980; 210: 1253-55.
36. Ritger PL, Peppas NA. A simple equation for description of the solute release. II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *J Cont Rel* 1987; 5: 37-42.