

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento tecnológico de micropartículas nanorrevestidas: caracterização  
físico-química e biológica

RUY CARLOS RUVEN BECK

PORTO ALEGRE, 2005



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento tecnológico de micropartículas nanorrevestidas: caracterização físico-química e biológica

Tese apresentada por **Ruy Carlos Ruver Beck** para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Profa. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres

Co-Orientador: Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado – Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 25.5.2005, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. José Aparício Brittes Funck

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Nelson Eduardo Duran Caballero

Universidade de Campinas

Prof. Dr. Pedro Ros Petrovick

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

B393d

Beck, Ruy Carlos Ruver

Desenvolvimento tecnológico de micropartículas nanorrevestidas: caracterização físico-química e biológica / Ruy Carlos Ruver Beck - Porto Alegre: UFRGS, 2005. – xx p., 318 p.: il., tab., gráf.

Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Micropartículas. 2. Nanopartículas 3. Dexametasona. 4. Diclofenaco. 5. Secagem por aspersão. I. Guterres, Sílvia Stanisçuaski. II. Pohlmann, Adriana Raffin. III. Título.

CDU: 615.453.2

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira CRB10/480

**Aos meus pais e irmãs,  
pelos incentivos e cumplicidade,  
e, em especial, à minha avó Otília,  
aos seus 94 anos,  
pelo exemplo de dedicação e amor.**



## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Sílvia S. Guterres, pela orientação, amizade, dedicação, confiança, estímulo e exemplo profissional durante os quatro anos de trabalho.

À Profa. Dra. Adriana R. Pohlmann, pela co-orientação, disponibilidade, estímulo e confiança demonstrados no decorrer deste trabalho.

Aos pesquisadores Prof. Dr. Edilson Benvenuti, Profa. Dra. Tania M. Costa, Profa. Dra. Márcia Gallas, Dra. Maria Inês Ré, Profa. Dra. Teresa Dalla Costa, pelas colaborações científicas.

Ao Prof. Dr. Claus-Michael Lehr, pela orientação e pela disponibilidade para a realização do estágio de doutorado no exterior.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e ao Corpo Docente deste PPGCF, por permitirem a realização deste trabalho e pelos conhecimentos transmitidos.

À Chefia, aos professores e colegas do Departamento de Farmácia Industrial, da Universidade Federal de Santa Maria, por oportunizarem a realização deste trabalho.

Aos bolsistas deste projeto Sandra E. Hass, Maria Lionzo e Cristiane Hoffmeister pela dedicação e auxílio nos procedimentos experimentais.

Aos colegas e amigos do Laboratório 405 pelos bons momentos de convivência e aprendizados coletivos. Em especial a amiga e colega Scheila, pelos momentos de discussão científica.

Aos colegas do Departamento de Biofarmácia e Tecnologia Farmacêutica, da cidade de Saarbrücken, Alemanha, pelas valiosas cooperações, aprendizados e receptividade.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Controle de Qualidade, Química Farmacêutica e Síntese, pelo grande companheirismo e auxílios sempre prestados. Em especial a Cristiane, Vanessa, Inara, Andréia, Patrícia e Eliane.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela obtenção da bolsa de doutorado e à Rede de Nanotecnologia/CNPq/MCT, pelo suporte financeiro deste projeto e oportunidades de crescimento científico.

E a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.





## **APRESENTAÇÃO**

---

---



## **APRESENTAÇÃO**

De acordo com as normas vigentes no Estatuto do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a presente tese foi redigida na forma de capítulos, para uma melhor organização e discussão dos resultados obtidos. Assim, este exemplar encontra-se dividido da seguinte forma:

Introdução, contendo a apresentação do tema e a formulação das hipóteses de trabalho;

Objetivos, geral e específicos;

Revisão de Literatura;

Capítulo 1-6: artigos em redação, aceitos ou submetidos à periódicos científicos que se referem às diferentes etapas do trabalho realizado:

Discussão Geral, visando um entendimento global dos resultados apresentados nas diferentes etapas do trabalho;

Conclusões; e

Referências Bibliográficas.



## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xvi
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xix
INTRODUÇÃO.....	01
OBJETIVOS.....	07
REVISÃO DA LITERATURA.....	11
1 Micropartículas.....	13
2 Secagem por aspersão.....	16
3 Nanopartículas.....	26
4 Diclofenaco.....	34
5 Dexametasona.....	51
CAPÍTULO 1: Micropartículas nanorrevestidas contendo diclofenaco: Desenho Experimental e Avaliação da Tolerância Gastrintestinal.....	59
1.1 Introdução.....	61
Publicação 01: Diclofenac-loaded Nanoparticle-coated Inorganic-Microparticles: Experimental Design and Gastrointestinal Tolerance Evaluation.....	63
CAPÍTULO 2: Micropartículas nanorrevestidas: Preparação e caracterização.....	103
2.1 Introdução.....	105
Publicação 02: Nanoparticle coated microparticles: preparation and characterisation	107
CAPÍTULO 3: Caracterização morfológica de micropartículas contendo diclofenaco, revestidas a partir de suspensões de nanoesferas poliméricas .....	123
3.1 Introdução.....	125
Publicação 03: Morphological characterization of nanosphere-coated diclofenac-loaded microparticles .....	127
CAPÍTULO 4: Micropartículas revestidas a partir de uma suspensão de nanocápsulas: estudo morfológico .....	157
4.1 Introdução.....	159

Publicação 04: Nanocapsule-coated microparticles: a morphological study.....	161
CAPÍTULO 5: Micropartículas nanorrevestidas obtidas apartir de uma dispersão polimérica: preparação, caracterização e avaliação da tolerância gastrointestinal.....	187
5.1 Introdução.....	189
Publicação 05: Nanostructure-Coated Diclofenac-loaded Microparticles: Preparation, Morphological Characterization, in vitro Release and in vivo Gastrointestinal Tolerance .....	191
CAPÍTULO 6: Micropartículas nanorrevestidas contendo dexametasone: correlação entre a liberação in vitro do fármaco e sua absorção através de monocamadas de células Caco-2.....	221
6.1 Introdução.....	223
Publicação 06: Dexamethasone-loaded nanoparticle-coated microparticles: correlation between the in vitro drug release and the drug absorption across Caco-2 cells monolayers.....	225
DISCUSSÃO GERAL.....	261
CONCLUSÕES.....	273
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	279
ANEXO 1: Metodologia empregada para o estudo de transporte do fármaco através das células Caco-2.....	301
ANEXO 2: Pareceres da Banca Examinadora.....	307
BIOGRAFIA.....	317

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Sal sódico do ácido 2-[2-{(2',6'-diclorofenil)amino}fenil]acético, diclofenaco sódico .....	34
Figura 2 Derivado amídico do diclofenaco com a cisteamina.....	43
Figura 3 Pró-fármaco polimérico, derivado do diclofenaco.....	45
Figura 4 Dexametasona.....	51
Figura 1.1 SEM micrographs of uncoated core and physical mixture of raw materials.....	96
Figura 1.2 SEM micrographs of nanosphere-coated microparticle (MP-NS-5) and nanocapsule-coated microparticle (MP-NC-3).....	97
Figura 1.3 SEM micrographs of NC-coated microparticles at different magnifications: particles from the sample of MP-NC-1 .....	98
Figura 1.4 Pore size distribution of Aerosil 200 <sup>®</sup> , uncoated-core, NS-coated microparticles and NC-coated microparticles obtained by BJH method.....	99
Figura 1.5 Diclofenac release profiles at phosphate buffer pH 5.0 from the uncoated core, physical mixture, NS-coated microparticles and NC-coated microparticles.....	100
Figura 1.6 Diclofenac release profiles at phosphate buffer pH 7.4 from the uncoated core, physical mixture, NS-coated microparticles and NC-coated microparticles.....	101
Figura 1.7 Mean organ lesional indexes following three consecutive daily doses of 20 mg.kg <sup>-1</sup> of diclofenac sodium solution, uncoated core, physical mixture, NS-coated microparticles and NC-coated microparticles.....	102
Figura 2.1 Chemical structure of diclofenac (salt and acid forms).....	111
Figura 2.2 Schematic model of microparticles: the drug is associated with polymeric nanoparticles and the drug is associated with inorganic core (Aerosil 200 <sup>®</sup> ).....	111
Figura 2.3 SEM micrographs of hydrophilic drug-loaded nanoparticle coated microparticles prepared in one step using nanospheres.....	115
Figura 2.4 Diclofenac release profiles from powders prepared with hydrophilic model in phosphate buffer pH 1.2, pH 5.0 and pH 7.4.....	116

Figura 2.5 Diclofenac release profiles from powders prepared with hydrophobic model in phosphate buffer pH 1.2, pH 5.0 and pH 7.4.....	119
Figure 3.1 Two approaches used to prepare the nanoparticle-coated diclofenac-loaded microparticles: core and coating prepared in one step and core and coating prepared in two steps.....	152
Figure 3.2 After adding the silicon dioxide into an acetone solution of the drug the solvent was evaporated and the core was added into the nanosphere suspension with or without triacetin and the mixture was spray-dried.....	153
Figure 3.3 SEM of hydrophobic drug-loaded samples: uncoated core-DicOH, NS-coated-MP-DicOH, NS-coated-MP-DicOH-triacetin, and hydrophilic drug-loaded samples: uncoated core-DicONa, NS-coated-MP-DicONa-1, NS-coated-MP-DicONa-2.....	154
Figure 3.4 SEM of the surface of a microparticle from NS-coated-MP-DicONa-2 sample.....	155
Figure 3.5 X-ray diffraction pattern of: DicOH; DicONa; Eudragit S100®; Uncoated core-DicOH; Uncoated core-DicONa; NS-coated-MP-DicOH; NS-coated-MP-DicOH-triacetin; NS-coated-MP-DicONa-1 and NS-coated-MP-DicONa-2.....	156
Figure 4.1. SEM micrographs of drug-loaded microparticles: uncoated core-DicOH, uncoated core-DicONa, NC-coated-MP-DicOH-triacetin and NC-coated-MP-DicONa-2.....	182
Figure 4.2. SEM micrographs of drug-loaded microparticles: uncoated core-DicOH, uncoated core-DicONa, MP-NC-DicOH-triacetin and MP-NC-DicONa-2.....	183
Figure 4.3. Light micrographs at a magnification x 120 of DicOH and DicONa-drug loaded microparticles, after redispersion in water.....	184
Figure 4.4. X-ray diffraction pattern of: DicOH; DicONa; Eudragit S100®; uncoated core-DicOH; uncoated core-DicONa; NC-coated-MP-DicOH; NC-coated-MP-DicOH-triacetin; NC-coated-MP-DicONa-1 and NC-coated-MP-DicONa-2.....	185
Figure 4.5. SEM micrographs of tablets: tablet surface and inner compartment.....	186
Figure 5.1 Schematic representation of nanostructure-coated microparticles, in which the drug is associated with the organic phase or with the inorganic phase.....	215



Figure 5.2 SEM micrographs of surface of a particle from the uncoated core and surface of a particle from the nanostructure-coated microparticles.....	216
Figure 5.3 Pore size distribution of commercial silicon dioxide (Aerosil 200®), uncoated-core and nanostructure-coated microparticles .obtained by BJH method.....	217
Figure 5.4 Release profiles (phosphate buffer pH 5.0) of diclofenac from the uncoated-core, physical mixture, and nanostructure-coated microparticles (MP).....	218
Figure 5.5 Release profiles (phosphate buffer pH 7.4) of diclofenac from the uncoated-core, physical mixture, and nanostructure-coated microparticles.....	219
Figure 5.6 Mean organ lesional index following three consecutive daily doses of 20 mg.kg <sup>-1</sup> of sodium diclofenac aqueous solution., uncoated-core, physical mixture, and nanostructure-coated microparticles .....	220
Figure 6.1. SEM micrographs of dexamethasone-loaded nanoparticle-coated microparticles: MP-NS (132 μm), MP-NS (1.39 μm), MP-NC (132 μm) and MP-NC (1.39 μm).....	253
Figure 6.2. AFM image showing the surface topography of MP-NC-PEG.....	254
Figure 6.3. X-ray diffraction pattern of: dexamethasone; Eudragit S100®; uncoated core; MP-NC; MP-NC-PEG; MP-NS and MP-NS-PEG.....	255
Figure 6.4. In vitro dexamethasone release profiles at pH 7.4.....	256
Figure 6.5. Dexamethasone transport across filters with or without Caco-2 cells monolayers from a dexamethasone solution in HBSS pH 7.4.....	257
Figure 6.6. Permeability of dexamethasone from a dexamethasone solution and from microparticle suspensions across Caco-2 cells monolayers.....	258
Figure 6.7. Cumulative mass transferred of dexamethasone as a function of the percentual of dexamethasone released .....	259
Figure 6.8. Permeability coefficients of dexamethasone across Caco-2 monolayers as a function of the A parameter calculated from the biexponential fit of release data.....	260

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Matrix of experiments of the 3 <sup>2</sup> factorial design.....	90
Tabela 1.2 Factors and levels available in the factorial deseign.....	91
Tabela 1.3 Categories of employed methods to compare the dissolution profiles.....	92
Tabela 1.4 Yields, encapsulation efficiencies, particle sizes and water content for the NS-coated microparticles.....	93
Tabela 1.5 Yields, encapsulation efficiencies, particle sizes and water content for the NC-coated microparticles.....	94
Tabela 1.6 Superficial area and pore volume of commercial silicon dioxide (Aerosil 200 <sup>®</sup> ), uncoated core and selected nanoparticle-coated microparticles.....	95
Tabela 2.1 Operational conditions to prepara nanocoating microparticles using a Mini Spray-Dryer Büchi 190 <sup>®</sup> equipment.....	113
Tabela 2.2 Spray-dried hydrophilic and hydrophobic drug-loaded nanoparticle-coated microparticles, chatracteristics, yields and encapsulation efficiencies.....	114
Tabela 3.1 Morphological characteristics of the silicon dioxide and of the organic-inorganic microparticles.....	150
Tabela 3.2 Particle sizes of the organic-inorganic drug loaded microparticles.....	151
Tabela 4.1 Morphological characteristics of the organic-inorganic loaded microparticles.....	181
Tabela 5.1 Superficial area and pore volume of nanostrucutre-coated microparticles (MP), uncoated core and commercial silicon dioxide (Aerosil 200 <sup>®</sup> ).....	212
Tabela 5.2 Dissolution efficiency determined for the uncoated core, physical mixture and nanostructure-coated microparticles at pH 5.0 and pH 7.4.....	213
Tabela 5.3 Model-dependent approaches used for mathematical modelling.....	214
Tabela 6.1 Operational conditions to prepare nanoparticle-coated microparticles using a Mini Spray-Dryer Büchi 190 <sup>®</sup> equipment.....	250
Tabela 6.2 Mathematical models used to compate the dissolution profiles.....	251
Tabela 6.3 Characteristics of the dexamethasone-loaded NP-coated microparticles.....	252

## RESUMO

Micropartículas nanorrevestidas (MP) foram preparadas através da secagem por aspersão (*spray-drying*), empregando-se suspensões poliméricas nanoestruturadas como material de revestimento (nanoesferas – NS, nanocápsulas – NC ou nanodispersão – ND). Foram realizados estudos utilizando-se o diclofenaco, tanto na sua forma hidrofílica (diclofenaco sódico), hidrofóbica (diclofenaco ácido) e a dexametasona como fármacos-modelo e o Eudragit S100<sup>®</sup>, como polímero. O trabalho foi delineado buscando-se o desenvolvimento de metodologias de preparação, o estudo dos fatores que influenciam o processo de revestimento, o conhecimento das características físico-químicas das MP e a avaliação das suas vantagens biológicas. As suspensões poliméricas (NC e NS) foram preparadas através da técnica da nanoprecipitação. As MP foram preparadas utilizando-se diferentes metodologias, de acordo com a hidrofobia do fármaco, envolvendo a combinação de técnicas de evaporação do solvente e secagem por aspersão. A influência dos fatores de secagem (fluxo de alimentação e temperatura de entrada) sobre as características das MP foi avaliada através de um delineamento fatorial 3<sup>2</sup>. A caracterização físico-química foi realizada determinando-se o rendimento do processo, taxa de encapsulação, umidade, tamanho de partícula (nano e micropartículas), área superficial e volume de poros, além das análises morfológicas através de microscopia óptica, eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (MFA) e análises por difração de raios-X. Além disso, foram avaliados os perfis de liberação do fármaco a partir destas MP (pH 1,2; 5,0 e 7,4), bem como a sua interação (transporte do fármaco e citotoxicidade) com células Caco-2. A vantagem biológica dos sistemas foi determinada pela avaliação do efeito protetor sobre a mucosa gastrointestinal frente aos efeitos tóxicos do diclofenaco. Através do delineamento fatorial foi possível estabelecer os parâmetros de secagem para a obtenção de MP com boas características de rendimento, taxa de encapsulação e umidade (fluxo de alimentação: 3,0 e 4,5 ml/min, para MP obtidas a partir de NC e NS, respectivamente; e temperatura de entrada: 170° C, para ambas). As MP apresentaram rendimentos entre 40 e 80% e taxas de encapsulação entre 70 e 115 %,

dependendo do tipo de revestimento nanoestruturado (NS, NC ou ND) e do fármaco empregado (diclofenaco ácido, diclofenaco sódico ou dexametasona). Todas as formulações apresentaram um teor de umidade menor que 3 %. As análises através de MEV demonstraram a presença de nanoestruturas adsorvidas à superfície das MP, independentemente da formulação estudada e com tamanhos de partículas diretamente relacionados ao tamanho das nanopartículas da suspensão original (170-200 nm para NC e 60-70 nm para NS). A observação morfológica através de MFA também permitiu a visualização destas nanoestruturas na superfície das MP. Essa observação foi associada à redução nas áreas superficiais das MP (40-50 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> e 115-135 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> para MP revestidas a partir de suspensões de NC ou NS, respectivamente) em relação ao núcleo não revestido (150-160 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>). Os resultados de liberação *in vitro* do fármaco a partir das MP demonstraram uma modificação da sua liberação, de acordo com o tipo de material nanoestruturado empregado, a natureza do fármaco e a presença de um plastificante (triacetina ou poligol 6000). A análise por difração de raios-X mostrou que o fármaco encontra-se na forma cristalina em praticamente todas as formulações. A vantagem biológica foi estudada em ratos e demonstrada pela redução na toxicidade gastrointestinal do diclofenaco apresentada pelas MP revestidas a partir de NC ou ND (índices lesionais totais: 24,20 e 29,89, respectivamente) em relação a uma solução aquosa do fármaco (índice lesional total: 156,11). Os estudos de interação das MP contendo dexametasona com as células Caco-2 demonstraram a sua potencialidade em modificar a absorção do fármaco em relação a uma solução aquosa do fármaco, sem apresentarem citotoxicidade sobre esta linhagem celular. Além disso, o estudo demonstrou a potencialidade do emprego deste modelo *in vitro* para prever a liberação do fármaco a partir de sistemas microparticulados. Assim, o conjunto destes estudos mostra que as micropartículas nanorrevestidas apresentam-se como uma nova aplicação dos sistemas nanoestruturados e como uma nova estratégia na obtenção de sistemas micro e multiparticulados de administração de fármacos.

Palavras-chave: dexametasona, diclofenaco, nanopartículas, micropartículas, micropartículas nanorrevestidas, secagem por aspersão.

## ABSTRACT

Technological Development of Nanoparticle-coated Microparticles: Physicochemical and Biological Characterization.

Nanoparticle-coated microparticles (MP) were prepared by spray-drying using nanostructured polymeric suspensions as coating material (nanospheres – NS, nanocapsules – NC ou nanodispersion – ND). Diclofenac, in its hydrophobic form (diclofenac acid) or in its hydrophilic form and dexamethasone were used as model drugs and Eudragit S100<sup>®</sup>, as polymer. The work was designed to develop the methodologies for the preparation of the microparticles, to study the influence of the spray-drying factors on the coating process, to determine the physico-chemical characteristics of the MP and to evaluate their biological advantages. Polymeric suspensions (NC e NS) were prepared by nanoprecipitation. MP were prepared employing different methods, according to the drug and by using solvent evaporation and spray-drying techniques. The influence of the spray-drying factors (feed rate and inlet temperature) on the characteristics of MP was evaluated using a 3<sup>2</sup> factorial design. Physico-chemical characterization was carried out determining the yield, encapsulation efficiency, moisture, particle size (nano and microparticles), surface area and pore volume, morphological observation by light microscopy, scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM). In vitro drug releases from MP were evaluated at pH 1,2, 5,0 and 7.4 as well as their interaction (transport studies and cytotoxicity) with Caco-2 cells. The biological advantage of these systems was evaluated in terms of their protector effect against the toxic effects of diclofenac on the gastrointestinal mucosa. By using a factorial design it was possible to establish the drying parameters to obtain MP presenting good yield, encapsulation efficiencies and moisture characteristics (feed rate: 3.0 and 4.5 ml.min<sup>-1</sup>, for MP coated by NC and NS, respectively; and inlet temperature: 170° C, for both). MP presented yields between 40 and 80 % and encapsulation efficiencies between 70 and 115 %, depending on the type of the nanostructured coating material (NS, NC or ND) and the drug employed

(diclofenac acid, sodium diclofenac or dexamethasone). All formulations presented a moisture content below 3 %. SEM analyses showed the presence of nanostructures adsorbed on the surface of MP, independently of the formulation and with particle sizes directly related to those verified in the original suspension (170-200 nm for NC and 60-70 nm for NS). The morphological observation by AFM also allowed to visualize these nanostructures on the surface of the microparticles. These observations were associated with a decrease in the surface area of microparticles ( $40\text{-}50\text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$  and  $115\text{-}135\text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$  for MP coated from NC or NS suspensions, respectively) compared to the uncoated core ( $150\text{-}160\text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ ). In vitro drug release profiles from MP demonstrated a modified release, according to the coating material, the drug and the presence of a plasticizer (triacetin ou polyethylene glycol 6000). X-ray analysis showed the drug in its cristalline form in pratically all formulations. The biological advantage was studied in rats and demonstred by the decrease of the gastrointestinal toxicity of diclofenac for the MP coated from NC or ND (total lesional indexes: 24.20 and 29.89, respectively) in comparison with an aqueous drug solution (total lesional index: 156.11). The interaction studies of dexamethasone-loaded MP with Caco-2 cells demonstrated their potentiality to modified the absorption of the drug compared to the aqueous drug solution, without citotoxicity on this cell line. Moreover the study showed the potentially to use this *in vitro* model to predict the drug release from microparticulated systems. In conclusion, the overall results showed that nanoparticle-coated microparticles may represent a new application for nanostructured systems representing new strategy to obtain micro and multiparticulated drug delivery systems. Key words: dexamethasone, diclofenac, nanoparticle-coated microparticles, nanoparticles, microparticles, spray-drying.

## **INTRODUÇÃO**

---

---





A microencapsulação tem sido foco de inúmeras pesquisas na área farmacêutica nas últimas décadas, envolvendo diferentes objetivos, entre eles a obtenção de produtos de liberação modificada de fármacos, diminuição da toxicidade gastrointestinal de antiinflamatórios não-esteróides, melhora na estabilidade ou aumento na biodisponibilidade de fármacos e o tratamento das doenças inflamatórias do intestino (Giunchedi *et al.*, 1995; Gohel & Amin, 1998; Esposito *et al.*, 2002; Lamprecht *et al.*, 2000a; Sajeev *et al.*, 2002; Gavini *et al.*, 2004; Saravanan *et al.*, 2004).

As micropartículas (1-1000  $\mu\text{m}$ ) são geralmente formadas a partir de materiais poliméricos, podendo ser preparadas através de inúmeros métodos descritos na literatura, entre os quais encontra-se a secagem por aspersão, amplamente estudada e cujas vantagens estão baseadas nos seguintes aspectos: a rapidez e a preparação em etapa única, a possibilidade de aplicação a fármacos termossensíveis e a maior facilidade de transposição de escala em relação a outros métodos de microencapsulação (Bodmeier & Chen, 1988; Wan *et al.*, 1992; Conte *et al.*; 1994).

Embora de produção mais complexa e mais onerosa, são inúmeras as vantagens inferidas pelos sistemas de administração multiparticulados em comparação aos sistemas unitários de administração de fármacos, entre as quais pode-se citar a distribuição rápida e uniforme pelo trato gastrointestinal, menor variação na biodisponibilidade, menor risco de toxicidade devido ao rompimento de um sistema unitário de liberação prolongada (*dose dumping*), maior reprodutibilidade de dose, compartimentalização de fármacos que apresentem incompatibilidades químicas, numa mesma forma farmacêutica, além da possibilidade de fracionamento e ajuste da dose (Lin *et al.*, 1991; Kawashima *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1997; Walter & von Nieciecki, 2001).

Paralelamente, a nanotecnologia também tem desempenhado um papel de destaque na área farmacêutica nas duas últimas décadas, principalmente no desenvolvimento de sistemas coloidais poliméricos (suspensões de nanopartículas),

buscando-se uma maior eficácia de fármacos, pelo aumento de sua especificidade e redução da sua toxicidade, assim como no desenvolvimento de sistemas de liberação modificada. Entretanto, estes sistemas apresentam uma instabilidade físico-química, caracterizada pela possibilidade de agregação das partículas, degradação do polímero e outras substâncias presentes, contaminação microbiológica e perda da substância ativa encapsulada, durante o armazenamento (Magenheim & Benita, 1991; Schaffazick *et al.*, 2003a).

Neste contexto, Müller e colaboradores (2000) estudaram a possibilidade da utilização da secagem por aspersão (*spray-drying*) na obtenção de nanocápsulas de diclofenaco na forma pulverulenta, utilizando o dióxido de silício coloidal (3,0 % m/v) como adjuvante de secagem. Através da análise por microscopia eletrônica de varredura, foi possível a observação das nanoestruturas adsorvidas à superfície das partículas de dióxido de silício coloidal, com diâmetros equivalentes às nanopartículas presentes nas suspensões originais. Esta técnica demonstrou-se potencialmente importante na obtenção de produtos secos a partir de sistemas coloidais poliméricos, os quais apresentaram uma redução na toxicidade gastrointestinal do diclofenaco, similares àquela verificada após a administração oral da suspensão de nanocápsulas contendo o mesmo fármaco (Müller *et al.*, 2001).

A avaliação do perfil farmacocinético dos produtos secos de nanocápsulas contendo diclofenaco demonstrou a possibilidade da utilização deste processo na obtenção de sistemas de liberação controlada do fármaco, já que este apresentou um tempo de meia-vida plasmática em torno de 8 h. Entretanto, entre as desvantagens destes pós pode-se citar a obtenção de um produto seco com uma baixa concentração de fármaco e a utilização de concentrações elevadas de tensoativos na formulação, dificultando a incorporação destes sistemas em formas farmacêuticas sólidas tradicionais, como comprimidos.

Ainda em busca da obtenção de produtos secos a partir de sistemas coloidais poliméricos, Schaffazick e colaboradores (2003b) empregaram com sucesso a liofilização na secagem de nanopartículas contendo diclofenaco. Os liofilizados de

nanoesferas e nanocápsulas de diclofenaco apresentaram um efeito protetor sobre a mucosa gastrointestinal similar àquele observado nos estudos anteriores de associação de diclofenaco com nanopartículas poliméricas.

Em relação ao perfil de liberação de fármacos a partir dos produtos secos contendo nanopartículas poliméricas, Obach (2002) demonstrou as diferenças nos perfis de liberação da indometacina, também um fármaco antiinflamatório não-esteróide, a partir de pós de nanocápsulas, nanoesferas e nanodispersão dos tensoativos. A dissolução da indometacina a partir destes sistemas mostrou-se dependente, principalmente, do pH do meio de liberação. Em pH mais elevado (meio intestinal e tampão fosfato pH 6,8) a dissolução da indometacina foi favorecida pela formação dos íons carboxilato. Foi possível também, nestes meios de pH alcalino, demonstrar a principal diferença nos perfis de liberação entre os sistemas, aplicando-se as metodologias  $f_1/f_2$ , eficiência de dissolução e a modelagem matemática. Os pós preparados a partir das nanoesferas e da nanodispersão apresentaram um melhor ajuste segundo o modelo biexponencial. Para nanocápsulas, no entanto, o melhor ajuste foi obtido pelo modelo de Weibull. Além disso, a liberação do fármaco a partir da formulação de nanocápsulas não foi completa nos pH alcalinos, explicada pela possível presença de indometacina dissolvida no núcleo oleoso das nanocápsulas (6,0 a 9,5 %). Também foram observadas menores variações nos perfis de dissolução entre amostras do mesmo lote, apontadas pelos baixos valores de desvio padrão encontrados, sugerindo que estes sistemas microparticulados podem levar à obtenção de formas farmacêuticas com menores variações nos perfis de liberação *in vitro*, se comparadas àquelas obtidas a partir de formas farmacêuticas convencionais.

Na seqüência, Raffin e colaboradores (2003) verificaram que o pó obtido a partir das secagem por aspersão das nanocápsulas contendo indometacina apresentava uma proteção efetiva da mucosa gastrointestinal frente aos efeitos tóxicos do fármaco, enquanto que o mesmo efeito não foi verificado para as formulações preparadas a partir de nanoesferas e da nanodispersão. Este estudo complementar demonstrou que, para estes sistemas estudados, pequenas diferenças, ainda que significativas, entre os

perfis de dissolução obtidos *in vitro*, podem levar a comportamentos bem diferenciados *in vivo*. No mesmo trabalho, os autores ainda demonstraram a influência da composição quali-quantitativa das suspensões nanoestruturadas no tipo de revestimento das partículas de dióxido de silício após a secagem por aspersão.

A partir do exposto, o presente projeto visa o estudo da utilização dos sistemas coloidais poliméricos (nanoesferas, nanocápsulas e uma nanodispersão polimérica) na preparação de micropartículas nanorrevestidas, buscando alternativas na obtenção de sistemas microparticulados a partir de nanopartículas poliméricas, neste caso, empregadas como material de revestimento. Esta técnica permite a utilização de polímeros insolúveis em solventes aquosos, evitando a utilização de solventes tóxicos ou explosivos no processo de revestimento, além de todas as outras vantagens relacionadas à utilização de sistemas microparticulados de administração de fármacos. Torna-se importante ressaltar ainda que na literatura científica pertinente não há nenhum relato da aplicação de sistemas nanoestruturados poliméricos na obtenção de um revestimento nanoestruturado de micropartículas (micropartículas nanorrevestidas).

Para a realização deste trabalho, o diclofenaco, um antiinflamatório não-esteróide, foi selecionado como fármaco modelo. A seleção do fármaco foi baseada na possibilidade de estudar a influência das características hidrofílicas/hidrofóbicas do fármaco, utilizando o mesmo esqueleto estrutural (diclofenaco sódico, como modelo hidrofílico e diclofenaco ácido, como modelo hidrofóbico). Além desta vantagem, considerando-se sua toxicidade sobre a mucosa gastrintestinal, dependendo da dose administrada, este fármaco permite uma avaliação das vantagens biológicas dos sistemas, utilizando um modelo de tolerância gastrintestinal. A microencapsulação da dexametasona, um antiinflamatório esteróide, também foi estudada levando-se em consideração suas características hidrofóbicas, com solubilidade independente do pH.

## **OBJETIVOS**

---

---



## **1. Objetivo geral**

Avaliar a viabilidade tecnológica de obtenção de micropartículas revestidas por nanopartículas poliméricas, através da secagem por aspersão, utilizando-se o diclofenaco e a dexametasona como fármacos modelo, e estudar a influência destes revestimentos sobre as características de liberação dos fármacos a partir destas micropartículas, de acordo com a estrutura dos materiais poliméricos empregados (nanoesferas ou nanocápsulas).

## **2. Objetivos específicos**

- Preparar e caracterizar as micropartículas obtidas através da secagem por aspersão utilizando sistemas poliméricos nanoestruturados como materiais de revestimento e fármacos com diferentes características: diclofenaco ácido (hidrofóbico ionizável); diclofenaco sódico (hidrofilico ionizável) e dexametasona (hidrofóbico não-ionizável);
- Preparar e caracterizar micropartículas utilizando uma dispersão aquosa coloidal do polímero (dispersão nanoestruturada), evitando a utilização de solventes orgânicos na etapa de preparação do material de revestimento e na etapa de revestimento;
- Estudar a influência de parâmetros do processo de secagem por aspersão sobre as características das micropartículas nanorrevestidas, utilizando um delineamento fatorial  $3^2$ ;
- Avaliar o efeito protetor sobre a mucosa gastrointestinal, após administração oral, em ratos, das micropartículas contendo diclofenaco como fármaco, em relação à solução aquosa do fármaco;

- Estudar a influência de fatores como o tipo de sistema nanoestruturado, natureza do fármaco e presença de plastificante na preparação das micropartículas;
- Estudar a interação das micropartículas nanorrevestidas com células epiteliais do intestino (células Caco-2), através de estudos de permeação do fármaco e de citotoxicidade, avaliando-se a possibilidade de utilização desta metodologia *in vitro* para prever as características de liberação do fármaco a partir dos sistemas microparticulados.



## **REVISÃO DE LITERATURA**

---

---



## 1. Micropartículas

As micropartículas são sistemas micrométricos (1 a 1000  $\mu\text{m}$ ), geralmente poliméricos, que podem ser classificados em duas categorias, de acordo com a sua constituição: as microesferas, que são sistemas matriciais micrométricos; e microcápsulas, que são sistemas reservatórios micrométricos, contendo uma substância ativa ou núcleo rodeado por uma membrana ou revestimento (Thies, 1996).

A microencapsulação tem sido amplamente estudada na área farmacêutica com vários objetivos, entre eles: desenvolvimento de formas de liberação controlada (Palmieri *et al.*, 1994; Torres *et al.*, 1995; Lewis, *et al.*, 1998; Hombreiro-Perez *et al.*, 2000; Giunchedi *et al.*, 2001; Palmieri *et al.*, 2001; Sajeev *et al.*, 2002; Satturwar *et al.*, 2002; Kortesuso *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002; Oneda e Ré, 2003; Hombreiro-Perez *et al.*, 2003; Blanco *et al.*, 2003; Kurkuri *et al.*, 2004), obtenção de micropartículas gastrorresistentes (Takenaka *et al.*, 1980; Lin *et al.*, 1991; Hasan *et al.*, 1992; Giunchedi *et al.*, 1995; Palmieri *et al.*, 2002), desenvolvimento de formas de liberação intrapulmonar, intranasal e intraarticular (Pavanetto *et al.*, 1994; Tuncay *et al.*, 2000; Columbano *et al.*, , 2003; Fiegel *et al.*, 2004), desenvolvimento de formas de liberação oftálmica (Zimmer e Kreuter, 1995, Herrero-Vanrell *et al.*, 2001; Gavini *et al.*, 2004), melhora na estabilidade de fármacos (Esposito *et al.*, 2002); diminuição da toxicidade gastrintestinal (Giunchedi *et al.*, 1995; Gohel & Amin, 1998; Chawla *et al.*, 2000), imunização oral (Delgado *et al.*, 1999; Fattal *et al.*, 2002; Yeh e Chiang, 2004) e intranasal (Vajdy *et al.*, 2001), aumento da biodisponibilidade (Kawashima *et al.*, 1993; De Jaeghere *et al.*, 2001; Morishita *et al.*, 2004), obtenção de grânulos ( Shaikh *et al.*, 1991) e tratamento das doenças inflamatórias do trato gastrintestinal (Rodríguez *et al.*, 1998; Lamprecht *et al.*, 2000a; Lamprecht *et al.*, 2001; Lamprecht *et al.*, 2004).

Existem vários métodos descritos na literatura para a preparação de micropartículas, os quais podem ser divididos em duas classes principais: métodos físicos e métodos químicos (Thies, 1996). A escolha do método de preparação depende da natureza do polímero, do fármaco, da utilização terapêutica e da duração da terapia.

O método escolhido deve satisfazer os seguintes requisitos: a estabilidade do fármaco não deve ser negativamente afetada durante o processo de microencapsulação ou no produto final; o rendimento do processo e a taxa de encapsulação do fármaco devem ser elevados; a obtenção e o perfil de liberação do fármaco devem ser reprodutíveis, de acordo com limites especificados; as micropartículas devem produzir pó de fluxo livre e não devem exibir agregação ou aderência (Jain *et al.*, 1998).

Os principais métodos relatados na literatura para a preparação de micropartículas (microesferas e microcápsulas) são: emulsificação-difusão/evaporação (Shaikh *et al.*, 1991, Kawashima *et al.*, 1993, Tuncay *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2002; Hombreiro-Perez *et al.*, 2000; Satturwar *et al.*, 2002; Fattal *et al.*, 2002; Hombreiro-Perez *et al.*, 2003); secagem por aspersão (Bodmeier & Chen, 1988; Giunchedi *et al.*, 1995; Giunchedi *et al.*, 2001; He *et al.*, 1999; Baras *et al.*, 2000; Palmieri *et al.*, 2001; Takenaka, 1980; Lin e Kao, 1991; Kristmundsdóttir *et al.*, 1996; Palomo *et al.*, 1997, Cortesi *et al.*, 2003; Columbano *et al.*, 2003; Blanco *et al.*, 2003; Oneda e Ré, 2003); coacervação complexa (Weiß *et al.*, 1993; Tirkkonen *et al.*, 1995; Wieland-Berghausen *et al.*, 2002; Kurkuri *et al.*, 2004) e separação de fases poliméricas (Franssen *et al.*, 1998; Hasan *et al.*, 1992; Kakish *et al.*, 2002; Sajeev *et al.*, 2002).

Conforme comentado anteriormente, as micropartículas são formadas geralmente a partir de materiais poliméricos, e de acordo com o objetivo do estudo, vários tipos de polímeros têm sido empregados na preparação de micropartículas utilizando-se os diferentes métodos de preparação já relatados. Dentre estes, podem ser citados os derivados de celulose – etilcelulose (Gohel & Amin, 1998; Yamada *et al.*, 2001; Al-Omran *et al.*, 2002; Sajeev *et al.*, 2002; Wieland-Berghausen *et al.*, 2002), acetoflatato de celulose (Takenaka *et al.*, 1980), acetobutirato de celulose (Rodriguez *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2002), carmelose sódica (Wan *et al.*, 1992; Billon *et al.*, 2000; Oneda e Ré, 2003), acetossuccinato de hipromelose (Wan *et al.*, 1992) e acetotrimelitato de celulose (Giunchedi *et al.*, 1995; Palmieri *et al.*, 2002); os polímeros biodegradáveis – poli(ácido láctico) (Bodmeier & McGinity, 1987; Conte *et al.*, 1994; Laçasse *et al.*, 1998), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (Tunçai *et al.*,

2000; Fattal *et al.*, 2002; Gavini *et al.*, 2004) e poli( $\epsilon$ -caprolactona) (Lamprecht *et al.*, 2000b; Baras *et al.*, 2000; Blanco *et al.*, 2003); os poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico) – Eudragit L100-55<sup>®</sup> (Weiß *et al.*, 1993; Delgado *et al.*, 1999; De Jaeghere *et al.*, 2001), Eudragit L 30D<sup>®</sup> (Lin e Kao, 1991), Eudragit NE 30D<sup>®</sup> (Oneda e Ré, 2003), Eudragit RS<sup>®</sup> e Eudragit RL<sup>®</sup> (Kristmundsóttir *et al.*, 1996; Espósito *et al.*, 2002; Satturwar *et al.*, 2002; Cortesi *et al.*, 2003; Hombreiro-Perez *et al.*, 2003). Eudragit S100<sup>®</sup> (Lee *et al.*, 2000; El-Kamel *et al.*, 2001; Palmieri *et al.*, 2002); os polissacarídeos – quitosana (Genta *et al.*, 1997; He *et al.*, 1999) e dextrana (Franssen *et al.*, 1998); e os polímeros naturais – albumina (Tuncay *et al.*, 2000; Giunchedi *et al.*, 2001) e gelatina (Franssen *et al.*, 1998; Saravanan *et al.*, 2004).

Após a etapa de preparação, as micropartículas são caracterizadas abrangendo os mais variados aspectos, tais como: rendimento do processo, taxa de encapsulação, teor de umidade ou perda por dessecação, tamanho de partícula e distribuição granulométrica, calorimetria diferencial de varredura, observação morfológica através de microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura ou microscopia confocal a laser, difração de raios-X, análise térmica, avaliação de suas propriedades tecnológicas, perfil de liberação, estudo farmacocinético, entre outros (Lin *et al.*, 1991; Wan *et al.*, 1992; Conte *et al.*, 1994; Giunchedi *et al.*, 1995; Genta *et al.*, 1997; Kristmundsóttir *et al.*, 1996; Rodriguez *et al.*, 1998; Tuncay *et al.*, 2000; Lamprecht *et al.*, 2000a; Lamprecht *et al.*, 2000b; Lamprecht *et al.*, 2000c; Liu *et al.*, 2002; Korteso *et al.*, 2002; Blanco, 2003; Columbano *et al.*, 2003; Oneda e Ré, 2003).

Apesar de uma produção mais complexa e um custo elevado, os sistemas multiparticulados oferecem inúmeras vantagens em relação aos sistemas unitários, tais como: distribuição uniforme e rápida numa grande área do trato gastrointestinal, minimizando assim o risco de dano local; apresenta uma menor variação em relação ao tempo de trânsito gástrico, com menor variação na biodisponibilidade entre indivíduos; diminui o risco de toxicidade, que pode se apresentar no rompimento de um sistema de liberação prolongada unitário (*dose dumping*); maior reprodutibilidade em doses repetidas; além de permitir um fracionamento de doses (Lin e Kao, 1991;

Kawashima *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1997; Walter e von Nieciecki, 2001; Kurkuri *et al.*, 2004).

Além das vantagens citadas, os sistemas microparticulados também têm sido estudados na obtenção de sistemas de liberação colônica de fármacos, utilizando como estratégia três diferentes tipos de mecanismos: a) o emprego de polímeros com solubilidade pH-dependente (Rodríguez *et al.* 1998; Lamprecht *et al.*, 2004); b) o emprego de polímeros com propriedades bioadesivas e de solubilidade tempo-dependente (Lamprecht *et al.*, 2000a; Nakase *et al.*, 2000) e c) ativação através de enzimas de origem bacteriana presente na microflora colônica – azopolímeros (Van den Mooter *et al.*, 1993; Watts e Illum, 1997).

Neste sentido, Lamprecht e colaboradores (2001) demonstraram a potencialidade, através de estudos *in vivo*, da utilização dos sistemas poliméricos micro e nanoparticulados no tratamento das doenças inflamatórias do intestino, observando as propriedades de bioadesão destas partículas aos tecidos inflamados, utilizando o modelo da colite induzida em ratos. Esta deposição dependente do tamanho da partícula nos tecidos inflamados deve ser considerada no desenvolvimento de novos sistemas de administração de fármacos para o tratamento das doenças inflamatórias do intestino grosso, já que a terapia convencional requer a administração diária de altas doses de antiinflamatórios e as estratégias desenvolvidas (pró-fármacos, grânulos e comprimidos de ação prolongada) têm sua eficiência reduzida devido à diarreia, um sintoma comum nestes tipos de doenças inflamatórias.

## **2. Secagem por aspersão**

A secagem por aspersão (*spray-drying*) tem sido amplamente empregada na indústria farmacêutica para a secagem de materiais, incluindo materiais termossensíveis, para melhorar a solubilidade de fármacos, ou para melhorar as características de fluxo de alguns excipientes, como da lactose (Broadhead *et al.*, 1992; Palmieri *et al.*, 1994).

O método tem sido utilizado com sucesso na preparação de sistemas microparticulados de liberação de substâncias ativas (Palmieri *et al.*, 1994; Lin e Kao, 1991; Kristmundsdóttir *et al.*, 1996; Palomo *et al.*, 1997; Cortesi *et al.*, 2003; Columbano *et al.*, 2003; Blanco *et al.*, 2003; Oneda e Ré, 2003), formação de complexos, granulação, obtenção de produtos secos a partir de extratos vegetais (Bassani, 1990; Teixeira, 1996; Senna *et al.*, 1997; Soares, 1997; De Souza *et al.*, 2000; De Souza *et al.*, 2001), lipossomas (Goldbach *et al.*, 1993a; Goldbach *et al.*, 1993b; Alves & Santana, 2004, Lo *et al.*, 2004), nanopartículas de lipídeo sólido (Freitas e Müller, 1998) e nanopartículas poliméricas (Müller *et al.*, 2000; Guterres *et al.*, 2001, Pohlmann *et al.*, 2002; Raffin *et al.*, 2003; Sham *et al.*, 2004).

A técnica consiste num processo de etapa única, que converte uma dispersão líquida em produto seco, pela aspensão desta numa câmara de secagem, onde entra em contato com o ar quente, permitindo assim uma secagem rápida (Conte *et al.*, 1994). O processo de secagem por aspensão consiste em quatro etapas essenciais: 1) aspensão da amostra; 2) contato líquido-vapor aquecido; 3) evaporação 4) separação sólido-gás/vapor (Broadhead *et al.*, 1992).

Os pós obtidos pela secagem por aspensão são geralmente de caráter esférico e poroso. A porosidade confere aos pós uma baixa densidade bruta, porém o seu caráter esférico permite que geralmente estes pós tenham fluxo livre. Modificando-se os parâmetros do processo de secagem, é possível alterar e controlar algumas propriedades dos pós, tais como: aparência, tamanho de partícula e distribuição granulométrica, porosidade, umidade, fluxo, estabilidade, dispersibilidade, friabilidade e manutenção da atividade, aroma e sabor (Broadhead *et al.*, 1992).

Desde os anos 70, a secagem por aspensão também tem sido potencialmente estudada na preparação de micropartículas, tanto de microesferas, quanto de microcápsulas. Primeiramente, a técnica foi utilizada somente para a separação de microcápsulas do veículo (Luzzi *et al.*, 1970) e, posteriormente, para a preparação propriamente dita. As principais vantagens da secagem por aspensão sobre outros processos de microencapsulação são: a rapidez e a preparação em etapa única, a

aplicação a fármacos termossensíveis e a maior facilidade de transposição de escala em relação aos outros métodos (Bodmeier & Chen, 1988; Wan *et al.*, 1992; Conte *et al.*; 1994).

Quando a secagem por aspersão é utilizada na preparação de sistemas multiparticulados de administração de fármacos, podem-se obter sistemas de estruturas diferentes se o fármaco estiver dissolvido ou disperso (emulsão ou suspensão) na solução polimérica a ser aspergida. Microcápsulas são obtidas pela aspersão de uma suspensão ou emulsão do fármaco na solução polimérica, enquanto que se obtêm microesferas (matrizes poliméricas) quando o fármaco e o polímero estão dissolvidos nesta solução (Wan *et al.*, 1992).

Takenaka e colaboradores (1980) desenvolveram uma preparação de microcápsulas de sulfametoxazol, como modelo de fármaco, e o acetofalato de celulose dissolvido numa solução de hidróxido de amônia a 5 %, utilizando a secagem por aspersão, obtendo partículas de diâmetro entre 3,6 a 22  $\mu\text{m}$ . Posteriormente, estas micropartículas foram utilizadas, juntamente com outros aditivos, na preparação de comprimidos por compressão direta. A liberação *in vitro* destes comprimidos, utilizando um simulador de pH do trânsito gastrintestinal, demonstrou uma eficácia no revestimento entérico, já que na faixa de pH de 3,5 a 5,0, a taxa de liberação apresentou um aumento brusco, representado por uma inflexão na curva de liberação.

Bodmeier e Chen (1988) estudaram a obtenção de microcápsulas de poli(ácido láctico) a partir de uma solução (progesterona) ou de uma suspensão do fármaco (teofilina) em diclorometano. Os estudos de liberação *in vitro* demonstraram uma liberação bifásica, caracterizada por uma fase rápida e um fase lenta, sendo que a taxa de liberação foi dependente da relação fármaco/polímero. Quanto maior a proporção de fármaco, maior a velocidade de liberação. A maior dificuldade encontrada pelos autores foi a formação de fibras poliméricas durante a secagem por aspersão, resultantes da ineficiência do processo para romper o filamento líquido, transformando-o em gotículas. A explicação para essa formação de fibras foi inferida à presença de fortes e numerosas ligações intermoleculares das cadeias poliméricas.



Estudando a preparação através da secagem por aspersão de microcápsulas de diclofenaco sódico com propriedades gastrorresistentes, Lin e Kao (1991) avaliaram a utilização de uma dispersão aquosa do poli(acrilato de etila-co-ácido metacrílico), utilizando o poligol 6000, como plastificante. Após a microencapsulação, foram adicionados excipientes à formulação e preparados comprimidos por compressão direta. Tanto as micropartículas preparadas pela secagem por aspersão, quanto os comprimidos obtidos pela adição de celulose microcristalina e amido pré-gelatinizado (1:1) apresentaram um perfil de liberação de acordo com os critérios estabelecidos para formas de liberação entérica.

Estudo realizado por Wan e colaboradores (1992) avaliou a utilização de diferentes polímeros (hipromelose, metilcelulose, carmelose sódica e acetosuccinato de hidpromelose) na preparação de micropartículas, utilizando a teofilina como fármaco modelo, tanto em solução, quanto em suspensão (imediatamente antes da secagem por aspersão). Os resultados encontrados demonstraram que as micropartículas preparadas a partir das suspensões apresentaram melhores propriedades de fluxo e menor taxa de liberação do fármaco que àquelas preparadas a partir da solução do fármaco. A taxa de liberação foi diretamente proporcional a hidrofilia do polímero, ou seja, sua afinidade pela água e sua capacidade de intumescer.

A influência dos parâmetros tecnológicos na preparação de microesferas de poli(ácido láctico) através da secagem por aspersão, contendo o diazepam como fármaco modelo, foi estudada por Conte e colaboradores (1994). Nesse trabalho, os autores avaliaram a influência da temperatura de entrada do ar, do fluxo de alimentação e da concentração da solução polimérica sobre as características das microesferas obtidas, tais como: rendimento, forma, tamanho e perfil de liberação *in vitro*. Os resultados demonstraram que os fatores que tiveram maior influência sobre os parâmetros avaliados foram o fluxo de alimentação e a temperatura de entrada, enquanto que a concentração do polímero afetou principalmente a forma das microesferas. Já a taxa de encapsulação do fármaco não foi afetada por nenhum dos fatores avaliados, encontrando-se na faixa de 70 a 85 %.

Palmieri e colaboradores (1994) avaliaram a possibilidade de obtenção de micropartículas (microcápsulas e microesferas) de liberação controlada, escolhendo o Eudragit RS<sup>®</sup> como polímero, e a sulfametazina sódica e a teofilina, como fármacos modelo. Neste estudo, os autores não conseguiram demonstrar a diminuição da taxa de liberação da teofilina utilizando a microencapsulação, embora uma redução na taxa de liberação tenha sido demonstrada pela compressão direta destas micropartículas na preparação de comprimidos de liberação controlada. Já para os comprimidos obtidos com micropartículas de sulfametazina, o fármaco modelo hidrossolúvel, a velocidade de liberação foi maior quando comparada à formulação de comprimidos de teofilina.

A influência de vários parâmetros tecnológicos na preparação de micropartículas de poli( $\epsilon$ -caprolactona), a partir de uma emulsão contendo um antígeno hidrofílico como modelo (albumina), foi estudada por Baras e colaboradores (2000). A escolha do polímero foi baseada na sua biocompatibilidade e sua biodegradabilidade, que não leva à formação de produtos que causam um abaixamento no pH como aquele gerado pela degradação do poli(ácido lático) e pelo copolímero do poli (ácido lático-co-ácido glicólico), que pode levar à perda da antigenicidade de muitas vacinas. Na avaliação dos parâmetros do processo, os autores demonstram a necessidade da presença de um estabilizante da emulsão (neste caso o álcool polivinílico) para a obtenção de uma boa taxa de encapsulação. Além disso, verificaram a influência da concentração do polímero e da razão entre as fases aquosa e orgânica no tamanho das micropartículas e na taxa de encapsulação, cuja justificativa foi baseada na viscosidade de emulsão inicial. Através da seleção dos parâmetros, eles obtiveram micropartículas com superfície lisa, com diâmetro entre 10 a 20  $\mu\text{m}$  e taxa de encapsulação de 95 %, sem modificações significativas nas características físico-químicas do antígeno modelo empregado no estudo, demonstrando a potencialidade da secagem por aspersão na preparação de micropartículas como carreadores de vacinas.

No ano seguinte, outro grupo de pesquisadores (Giunchedi *et al.*, 2001) avaliou a utilização da técnica da secagem por aspersão na preparação de microesferas contendo o mesmo modelo protéico (albumina). Neste caso, também foi utilizada uma emulsão A/O contendo o antígeno, dispersa numa solução orgânica contendo o polímero

(copolímero do ácido láctico-co-ácido glicólico). Os resultados obtidos pelo grupo apresentaram rendimentos entre 21 e 43 %, com taxas de encapsulação em torno de 80 %. Na avaliação de diferentes tensoativos empregados na preparação da emulsão inicial, foi demonstrada a ausência de influência destes em relação à distribuição de tamanho das partículas. Entretanto, o tipo de tensoativo influenciou significativamente o perfil de liberação *in vitro*, explicado pela provável diferença de incorporação da proteína na rede polimérica, visto que não foram encontradas diferenças significativas no tamanho de partícula.

Em outro estudo, Palmieri e colaboradores (2001) estudaram a preparação de microesferas através da secagem por aspersão contendo um fármaco de solubilidade intermediária, o paracetamol, utilizando como material polimérico o Eudragit RL<sup>®</sup> e Eudragit RS<sup>®</sup> e a etilcelulose. Os resultados do estudo de liberação *in vitro* foram similares àqueles obtidos para o fármaco livre. Porém, com a utilização destas microesferas na preparação de comprimidos através da compressão direta, os resultados de liberação apresentaram uma menor taxa de liberação do fármaco, explicada pela redução da porosidade das partículas pela compressão.

A microencapsulação da vitamina C (ácido ascórbico) empregando a secagem por aspersão foi estudada por Esposito e colaboradores (2002), utilizando o Eudragit RL<sup>®</sup>, Eudragit L100<sup>®</sup> ou uma mistura dos dois, como polímeros. Neste estudo, foi avaliada a influência do tipo de polímero e a concentração do ácido ascórbico na morfologia, distribuição de tamanho, rendimento e liberação *in vitro*. Os resultados demonstraram uma alta taxa de encapsulação para todas as formulações (98 – 100 %) e micropartículas esféricas e com superfície lisa. Porém, a presença do ácido ascórbico nas formulações apresentou uma influência significativa tanto no tamanho médio das partículas (aumento), quanto nas características de superfície. Na presença do ácido ascórbico, a superfície das partículas apresentava placas escuras. Os estudos de liberação *in vitro* demonstraram a potencialidade destas micropartículas de modificar a liberação do fármaco, porém não foi verificada a influência significativa do tipo de polímero nesta liberação. Os autores concluíram que os resultados indicam que esta

microencapsulação pode representar uma candidata para uma liberação sustentada da vitamina C após administração *in vivo*.

Blanco e colaboradores (2003) estudaram a preparação através da secagem por aspersão de micropartículas de tamanho reduzido, empregando como polímero a poli ( $\epsilon$ -caprolactona) e como fármaco a bupivacaína, um anestésico local utilizado no controle de dores regionais, principalmente em de pacientes que não respondem ao tratamento com fármacos opióides. Neste trabalho, as micropartículas foram desenvolvidas visando a utilização como implante subcutâneo. As micropartículas apresentaram um diâmetro entre 0,61 e 4,24  $\mu\text{m}$ , com taxa de encapsulação de  $91 \pm 3\%$ . A liberação (tampão fosfato pH 7,5) *in vitro* do fármaco a partir das micropartículas apresentou liberação rápida inicial (*burst effect*) seguida por uma liberação sustentada do fármaco por um período de 12 dias. Adicionalmente, os estudos farmacocinéticos realizados em ratos, após a implantação subcutânea das micropartículas redispersas em solução salina contendo polissorbato 80, demonstraram uma alteração significativa nos parâmetros farmacocinéticos, em relação àqueles obtidos após a administração intraperitoneal de uma solução do fármaco. Entre essas alterações, foi demonstrado o aumento no tempo de meia-vida de eliminação em mais de 125 vezes, assim como uma diminuição em mais de 50 % na concentração plasmática máxima. Além disso, a observação do tecido no local do implante, em função do tempo, através de microscopia eletrônica de varredura e análises histológicas, demonstrou a implantação segura destas micropartículas, pois foi possível observar a degradação das micropartículas, a ausência de respostas inflamatórias e imunológicas, assim como de linfócitos no local do implante (não-rejeição) e também a ausência de líquidos extravasculares, que caracterizariam uma resposta inflamatória aguda.

A possibilidade de emprego da secagem por aspersão na microencapsulação de enzimas foi relatada por Cortesi e colaboradores (2003). Neste estudo, foram preparadas micropartículas de Eudragit RL<sup>®</sup>, contendo a tripsina, uma proteinase digestiva, como enzima modelo, avaliando-se principalmente o efeito da temperatura de secagem e do solvente sobre as micropartículas obtidas e a atividade enzimática. Os

resultados demonstraram a influência significativa da temperatura de secagem sobre a atividade enzimática. Uma diminuição de 10 °C nesta temperatura (de 105 °C para 95 °C) aumentou em 100 % a atividade enzimática a partir das micropartículas. Na preparação das micropartículas empregando um solvente orgânico (emulsão), foi necessária a adição de gelatina para diminuir o contato da enzima com o solvente orgânico, para a manutenção de sua atividade enzimática. O sistema apresentou um bom potencial para a administração de enzimas.

Em uma aplicação diferenciada, Oneda e Ré (2003) estudaram o emprego da microencapsulação através da secagem por aspersão, na preparação de micropartículas como sistemas de liberação controlada de sais orgânicos de cálcio, para serem utilizadas como suplementos minerais. As formulações foram preparadas utilizando carmelose sódica, hipromelose e Eudragit NE 30D<sup>®</sup>, como polímeros e citrato e lactato de cálcio, como fontes de cálcio. A taxa de encapsulação para as formulações situou-se na faixa entre 84 e 91%. O tamanho e a morfologia das partículas foi influenciada pelo tipo de polímero e pela sua concentração inicial na formulação, explicado principalmente pela viscosidade das soluções obtidas. A liberação *in vitro* de ambos os sais a partir das micropartículas também demonstrou a influência do tipo de polímero. Neste caso, os melhores resultados foram obtidos para as formulações contendo carmelose sódica e hipromelose, pois o Eudragit NE 30D<sup>®</sup> apresentou uma liberação muito baixa de citrato de cálcio após 120 minutos, que não foi considerada adequada para prover uma boa disponibilidade de cálcio no meio gastrintestinal.

Ainda em 2003, Lee empregou a secagem por aspersão na secagem de nanopartículas preparadas em água, através da moagem à úmido de um ingrediente farmacêutico ativo (Active Pharmaceutical Ingredient – API) na presença de uma pequena quantidade de hipromelose. A concepção deste estudo teve como alvo a redução do tamanho de partícula, como forma de obter um aumento na velocidade de dissolução, pelo aumento da sua área superficial, de acordo com a equação de Noyes-Whitney, descrita como  $dC/dt = DA/hV (C_s - C)$ , onde D é o coeficiente de difusão, h é a espessura da camada de difusão na interface sólido líquido, A é a área superficial exposta ao meio de dissolução, V é o volume do meio, C<sub>s</sub> é a concentração da solução

saturada e  $C$  é a concentração do fármaco no tempo  $t$ . As nanopartículas foram preparadas através da mistura da substância ativa e da hipromelose em água. A mistura foi submetida a um moinho de bolas durante 5 dias, produzindo uma nanossuspensão, que foi convertida a um produto seco através da secagem por aspersão. As nanopartículas em suspensão apresentaram um tamanho de partícula em torno de 150 nm, após os 5 dias de moagem. Através de análises morfológicas por microscopia eletrônica de varredura foi verificada a aglomeração das partículas após o processo de secagem formando sistemas microparticulados. Esta agregação foi confirmada pela determinação do tamanho de partícula por espalhamento de luz, onde os produtos secos contendo preparados a partir das nanopartículas apresentam uma curva de distribuição de tamanho com dois picos, um na faixa micrométrica e outro na faixa nanométrica. Entretanto, a capacidade destes agregados desintegraram em nanopartículas, após a redispersão em água, foi demonstrada também utilizando a técnica de espalhamento de luz. O experimento foi realizado durante 25 horas e após este período a maior parte das partículas apresentou um tamanho nanométrico. Como não houve formação de tamanhos intermediários entre o tamanho das nanopartículas originais e dos agregados após a secagem, pôde-se observar que essa redução do tamanho em função do tempo não pode ser relacionada a um processo de erosão dos agregados, mas sim de desintegração destes nas nanopartículas primárias.

A preparação de microesferas formadas por misturas (blendas) poliméricas compostas por poli(ortoéster) e poli(ácido lático-co-ácido glicólico) foi estudada por Wang e colaboradores (2004), utilizando a secagem por aspersão. O principal objetivo do estudo foi diminuir o efeito de liberação inicial (*burst effect*) da fisostigmina, observado nos trabalhos anteriores do grupo em formulações preparadas somente com o poli(ácido lático-co-ácido glicólico). Através dos estudos de análise térmica (calorimetria diferencial exploratória), os autores verificaram que o encapsulamento do fármaco nas microesferas diminuía os valores da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ). Ainda, observaram que nas formulações preparadas com as misturas poliméricas era possível observar dois valores de  $T_g$ , demonstrando que ocorria uma separação de fases, associada ao limite de compatibilidade física entre os dois polímeros. Ainda, nas micropartículas contendo o fármaco, os valores de  $T_g$  foram menores, em relação às

formulações sem fármaco, para os dois polímeros, indicando que o fármaco encontra-se distribuído em ambos os polímeros. Pelas análises espectroscópicas no infravermelho não foram observadas interações químicas entre fármaco e polímero, sugerindo que as alterações no perfil térmico dos polímeros observadas na análise térmica podem ser devidas a interações físicas entre fármaco e polímero. As análises através de espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS) não detectaram átomos de nitrogênio na superfície das microesferas. Como os átomos de nitrogênio estão presentes somente no fármaco, o resultado revelou que este encontra-se bem encapsulado no interior das microesferas. Os valores da taxa de encapsulação estiverem entre 95 e 101 %. Utilizando a mesma técnica, os autores observaram que a superfície das microesferas apresentava um revestimento pelo poli(ortoéster). Os resultados da liberação *in vitro* da fisostigmina demonstraram que a liberação inicial do fármaco diminuiu com o aumento na proporção de poli(ortoéster) presente na formulação, devido a sua maior hidrofobia e sua presença na superfície das microesferas, como revestimento, conforme constatado nas análises por XPS.

No mesmo ano, Alves e Santana (2004) realizaram um estudo da influência das variáveis operacionais e da composição das formulações, na obtenção de partículas lipídicas secas, utilizando a secagem por aspersão. O processo de secagem empregando um menor fluxo (3 ml/min), uma menor concentração de lipídeos e realizado na presença de manitol, levou a obtenção de partículas com estruturas mais amorfas, conforme observado através das análises por difração de raios-X. Pelo emprego da mesma técnica, os autores também observaram que houve uma incorporação total do manitol nos pós, indicada pelo desaparecimento de seus picos característicos nos difratogramas. Entretanto, essa total incorporação está relacionada com a concentração de manitol na formulação, pois para concentrações maiores que 170 mM foi possível observar a presença de manitol não-incorporado, pela visualização de picos característicos deste açúcar nos difratogramas. Através de microscopias óptica e eletrônica de varredura foram observadas partículas lipídicas homogêneas, com diâmetro óptico entre 1 e 4  $\mu\text{m}$  e diâmetro aerodinâmico entre 1,25 e 1,77  $\mu\text{m}$ . Apesar de não ter sido incorporado nenhum fármaco modelo a esses sistemas, os autores sugeriram que estas partículas apresentam grande potencial para

aplicação na área farmacêutica, como veículos para encapsulação e veiculação de fármacos.

### **3. Nanopartículas poliméricas**

A partir da década de 70, quando foram desenvolvidas as metodologias para preparação de nanopartículas, o interesse dos pesquisadores por essas nanoestruturas tem aumentado exponencialmente, devido à possibilidade de emprego terapêutico em áreas médicas variadas. A composição quali-quantitativa das formulações e/ou a técnica empregada na sua preparação determinam a obtenção de nanoesferas ou nanocápsulas. De acordo com a literatura, nanoesferas são sistemas matriciais nos quais o fármaco está disperso pela partícula polimérica e/ou adsorvido a sua superfície; enquanto que nanocápsulas são sistemas vesiculares constituídos por um núcleo lipofílico rodeado por uma membrana polimérica, onde o fármaco encontra-se dissolvido na cavidade interna e/ou adsorvido no polímero. O termo nanopartículas muitas vezes é associado somente a nanoesferas, mas num conceito mais amplo, esse termo, nanopartículas, corresponde a nanoesferas e nanocápsulas (Couvreur *et al.*, 1995, Schaffazick *et al.*, 2003a).

As nanopartículas têm sido desenvolvidas visando inúmeras aplicações terapêuticas, sendo planejadas para a vetorização, liberação controlada e aumento da biodisponibilidade oral e ocular de fármacos. As vias intravenosa e intra-arterial são as mais utilizadas para os estudos experimentais de vetorização, principalmente para antibióticos e fármacos antineoplásicos. A liberação controlada sistêmica pode ser obtida após administração subcutânea, intramuscular ou oral de nanopartículas (Allemann *et al.*, 1993, Guterres *et al.*, 2001, Schaffazick *et al.*, 2003a, Ravi Kumar *et al.*, 2004).

Diversos métodos têm sido propostos para preparar nanopartículas. Estes podem ser classificados em duas categorias principais, levando-se em consideração se a formação das nanopartículas requer uma reação de polimerização (polimerização *in*



*situ*) ou se estas são formadas diretamente, utilizando-se uma macromolécula natural ou polímero sintético (Couvreur *et al.*, 1995; Couvreur *et al.*, 2002; Schaffazick *et al.*, 2003a; Ravi Kumar *et al.*, 2004).

Entre esses métodos de preparação, destaca-se a técnica de precipitação de polímero pré-formado seguida pela evaporação do solvente (nanoprecipitação) proposta por Fessi *et al.* (1988), considerado um método simples, baseado na precipitação de polímeros, evitando a presença de monômeros residuais na formulação obtida. Baseia-se na precipitação de um polímero em solução após a adição de uma fase não-solvente do polímero. Esse método permite a obtenção de nanoesferas sem prévia emulsificação. A escolha do sistema polímero/solvente/não-solvente é extremamente importante, já que este governa a produção das nanopartículas, na medida que o solvente e o não-solvente do polímero devem ser mutuamente miscíveis. Este método leva à obtenção de nanoesferas com diâmetros entre 100 e 200 nm e foi aplicado com sucesso a vários materiais poliméricos como o poli(ácido lático), poli(ácido lático-co-ácido glicólico), poli( $\epsilon$ -caprolactona), etilcelulose, poli(cianoacrilatos de alquila) e poliestireno.

Todos os métodos descritos para a obtenção de nanoesferas também podem ser utilizados para a formação de colóides vesiculares, ou seja, nanocápsulas, mediante a incorporação de uma fase oleosa à formulação (mistura de triacilgliceróis de cadeia média). As nanocápsulas foram desenvolvidas com o objetivo de melhorar a eficiência de incorporação de fármacos lipofílicos. Neste caso, de acordo com a literatura, os fármacos encontram-se geralmente dissolvidos na fase interna oleosa ou adsorvidos no polímero (Couvreur *et al.*, 2002).

Pohlmann e colaboradores (2004) aplicaram duas metodologias para determinar a forma de associação da indometacina a nanocápsulas preparadas com poli( $\epsilon$ -caprolactona), a diluição com etanol e a hidrólise alcalina. A partir dos resultados da hidrólise alcalina, associados a resultados obtidos com outras técnicas como a determinação de diâmetro de partículas, a ressonância magnética nuclear e a determinação do ponto de fusão, os autores puderam concluir que a adsorção é a forma

de associação da indometacina em nanocápsulas de poli( $\epsilon$ -caprolactona), contendo Miglyol 810<sup>®</sup>, como fase oleosa.

Entretanto, a estabilidade físico-química tem sido um dos principais problemas tecnológicos a serem suplantados no desenvolvimento de sistemas coloidais poliméricos. Dentre as limitações pode-se citar a tendência a agregação das partículas, a estabilidade química do polímero, do fármaco e outras matérias-primas utilizadas, assim como a perda da substância ativa incorporada para a fase contínua (Magenheim e Benita, 1991; Schaffazick *et al.*, 2003a). Várias alternativas têm sido estudadas para contornar este obstáculo, entre elas, a otimização dos componentes da formulação (Chasteigner *et al.*, 1996a) e os processos de secagem, como a secagem por aspersão (Müller *et al.*, 2000; Pohlmann *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2004) e a liofilização (Roy *et al.*, 1997; Schaffazick *et al.*, 2003b).

Assim, os métodos de secagem das suspensões de nanopartículas são empregados com dois principais objetivos: a obtenção de uma formulação mais estável (Roy *et al.*, 1997; Sommerfeld *et al.*, 1997; Schaffazick *et al.*, 2003a) e a obtenção de formas farmacêuticas sólidas (Müller *et al.*, 2000; Pohlmann *et al.*, 2002; Raffin *et al.*, 2003), que possuem uma administração mais conveniente, dosagem mais precisa, maior estabilidade físico-química e microbiológica, entre outras (Lachman *et al.*, 1986).

Kreuter e Hartmann (1983) apresentaram o primeiro relato do emprego da liofilização para a secagem de nanopartículas de poli(cianoacrilato de butila). A partir disso, a liofilização tem sido amplamente utilizada (Chasteigner *et al.*, 1996b; Saez *et al.*, 2000; Schaffazick *et al.*, 2003a; Schaffazick *et al.*, 2003b) e estendida a outras classes de vetores coloidais, como as nanopartículas de lipídeo sólido (Schwartz e Mehnert, 1997; Freitas e Müller, 1998).

Müller e colaboradores (2000) relataram a primeira aplicação da secagem por aspersão na secagem de suspensões de nanocápsulas para a obtenção de uma forma sólida. No estudo, o diclofenaco foi o fármaco modelo, utilizando-se o dióxido de silício coloidal (3 % p/v), como adjuvante, para evitar a adesão dos pós às paredes do

equipamento. Os autores demonstraram que a técnica pode ser uma alternativa para a secagem de suspensões de nanocápsulas, para a obtenção de uma forma sólida. Este processo também já tinha sido empregado com sucesso na secagem de outros sistemas coloidais, como de nanopartículas de lipídeo sólido (Freitas e Müller, 1998).

Posteriormente, Weiss (1999) estudou a aplicação da secagem por aspersão na obtenção de produtos secos a partir de suspensões de nanocápsulas e nanoesferas de indometacina, utilizando o Miglyol 810<sup>®</sup> como fase oleosa. Neste estudo, foi demonstrada a viabilidade da secagem tanto de suspensões contendo nanocápsulas, quanto nanoesferas, embora tenha se observado uma redução do tamanho de partícula, no caso das nanoesferas, após o processo de secagem, que foi explicada pelo rearranjo destas após a etapa da secagem (Pohlmann *et al.*, 2002). Em estudo paralelo, foi demonstrada a influência do tipo de óleo na preparação das nanocápsulas, onde se comprovou que o benzoato de benzila dissolve os polímeros utilizados no estudo [poli(ácido láctico) e poli( $\epsilon$ -caprolactona)], explicando o fato de não ter sido possível a observação das nanoestruturas adsorvidas na superfície do dióxido de silício após o processo de secagem por aspersão (Guterres *et al.*, 2001).

Conforme já comentado, um dos principais objetivos na secagem dos sistemas poliméricos nanoparticulados é de se obter uma forma sólida de administração. Neste sentido, Schmidt e Bodmeier (1999) avaliaram a obtenção de formas sólidas (grânulos, comprimidos e pellets), utilizando, como modelo de nanopartículas, dispersões poliméricas aquosas com diferentes propriedades físico-químicas (Eudragit RL 30D<sup>®</sup>, Eudragit L 30D<sup>®</sup>, Eudragit NE 30D<sup>®</sup> ou Aquacoat<sup>®</sup>) e avaliando a compatibilidade destas nanopartículas com excipientes comumente utilizados na obtenção de comprimidos, bem como a redispersibilidade dessas partículas após o contato destas formas sólidas com um meio aquoso. Na tecnologia clássica de granulação por via úmida, os excipientes e a substância ativa podem ser granulados com uma solução de aglutinante. Neste caso, o aglutinante poderia ser dissolvido diretamente na suspensão de partículas poliméricas ou a suspensão poderia ser combinada com uma solução aquosa do aglutinante, seguida da granulação. Em virtude da incompatibilidade potencial encontrada entre as suspensões de nanopartículas poliméricas, devido a

interações eletrostáticas, a granulação foi realizada utilizando materiais de carga comumente utilizados e as suspensões coloidais, sem a adição de aglutinantes. Os *pellets* foram preparados pela granulação do material de carga com a dispersão da solução de nanopartículas, seguida de extrusão e esferonização. Em relação a redispersibilidade das nanopartículas após o contato com o meio aquoso, somente a formulação preparada com o polímero catiônico (Eudragit RL 30D<sup>®</sup>) e o material de carga hidrossolúvel (lactose) apresentou uma completa redispersão, enquanto que as formulações preparadas com material de carga insolúvel em água, apresentaram uma redispersão entre 75 e 93%.

A preparação de *pellets* a partir de nanopartículas de lipídeo sólido para administração oral de fármacos foi estudada por Pinto e Müller (1999). A suspensão coloidal contendo prednisolona, como fármaco modelo, foi utilizada na etapa de preparação dos *pellets*, além de outros adjuvantes, como a celulose microcristalina e a lactose. A inspeção visual dos *pellets* obtidos demonstrou uma superfície porosa, com uma estreita faixa granulométrica (90 % entre 1,00 e 1,25 mm). Quando em contato com a água, o tempo máximo para desintegração dos *pellets* foi de 5 minutos, liberando as nanopartículas, cujas propriedades não foram alteradas pela incorporação na forma sólida, demonstrando uma liberação quase completa após 2 horas, entre 80,5 e 96,0 %. Foi demonstrada ainda, a influência da força iônica, do pH e, em menor proporção, da presença de outros materiais, na recuperação das nanopartículas a partir dos *pellets* no estudo de liberação.

Murakami e colaboradores (2000) realizaram um estudo da utilização de nanopartículas de poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) na preparação de mini-comprimidos matriciais de ação prolongada, por compressão direta, investigando a possibilidade de sua aplicação como uma forma farmacêutica implantável, utilizando a teofilina como fármaco modelo. Os comprimidos matriciais contendo 20 % de teofilina e 80% de nanopartículas de PLGA foram preparados alterando-se o tipo de polímero, a proporção da mistura de nanopartículas preparadas com polímeros de diferentes pesos moleculares e também, o peso dos comprimidos. A liberação do fármaco a partir dos comprimidos, em todos os casos, apresentou um perfil bifásico:

um estágio inicial, dependente das propriedades de inchamento do polímero e um segundo estágio, caracterizado pela erosão dos comprimidos. A velocidade de liberação do fármaco foi dependente principalmente da área superficial dos comprimidos matriciais, ou seja, quanto maior a área superficial do comprimido, maior a taxa de liberação do fármaco. Além da área superficial, a escolha do tipo de polímero e a proporção da mistura de polímeros com pesos moleculares diferentes influenciaram no controle de liberação do fármaco a partir dos comprimidos matriciais, demonstrando a possível utilização deste tipo de formulação na preparação de formas farmacêuticas implantáveis.

Além das aplicações já comentadas, a nanoprecipitação, assim como outros métodos de preparação de nanopartículas, tem sido estudada na preparação de pseudolatex como material de revestimento. De Labouret e colaboradores (1995) relataram a preparação de nanoesferas de Eudragit S100<sup>®</sup> e Eudragit E100<sup>®</sup>, através da nanoprecipitação, com uma concentração de polímero entre 20 e 30 %, avaliando a possível aplicação destes pseudolátexes como materiais de revestimento. Neste estudo foram realizadas a preparação e a caracterização das dispersões coloidais, que apresentaram tamanhos de partícula entre 40 e 130 nm, e viscosidades entre 4 e 24 mPa.s. Em relação à estabilidade das suspensões coloidais, ambas apresentaram-se estáveis a 4 °C e 35 °C, durante 6 meses de armazenamento. A formulação preparada com Eudragit S100<sup>®</sup> permaneceu estável durante 2 anos, quando armazenada à temperatura ambiente. Os autores sugerem, pelas características encontradas para as dispersões coloidais em estudo, que estas poderiam ser utilizadas em processos de revestimento.

Na seqüência, Thioune e colaboradores (1997) estudaram a preparação de pseudolatex, também através da nanoprecipitação, utilizando o ftalato de hipromelose como polímero. Neste estudo, foram avaliadas a natureza do solvente utilizado no processo de nanoprecipitação, a viscosidade intrínseca da dispersão obtida e também a constante de interação, uma vez que uma das maiores dificuldades encontradas no desenvolvimento destes sistemas é o aumento na concentração final do polímero presente na dispersão coloidal, resultando muitas vezes na precipitação do polímero.

Assim, uma concentração final de polímero de 17 % foi possível pela escolha do solvente orgânico (acetona:água 71,5:28,5 v/v) utilizado na preparação das nanoesferas, que apresentou uma maior viscosidade e menor constante de interação em relação à solução orgânica composta unicamente pela acetona, devido a uma organização das cadeias poliméricas de forma a gerar um volume hidrodinâmico maior e às interações mais fracas entre as cadeias poliméricas, respectivamente.

Em 2002, Vaithiyalingam e colaboradores prepararam e caracterizaram pseudolatex aquosos de acetobutirato de celulose, visando a sua utilização em sistemas de liberação controlada de fármacos. A dispersão foi preparada através da técnica da emulsificação do polímero, seguida da redução do tamanho das partículas para uma faixa de 216 a 401 nm, após cinco ciclos de passagem através de um microfluidizador. Após a preparação e caracterização, o material foi aplicado a grânulos de cloridrato de verapamil, utilizando leite fluidizado. Experimentos em célula de difusão demonstraram que os coeficientes de permeabilidade do cloridrato de verapamil através do filme formado pelo pseudolatex desenvolvido no estudo foram menores quando comparados àqueles obtidos pelo filme formado pela solução orgânica, convencionalmente utilizada no revestimento de sistemas de liberação controlada. Além disso, os autores demonstraram o revestimento uniforme dos grânulos, pela análise da rugosidade da sua superfície e também a estabilidade das dispersões durante 6 meses de armazenamento. A partir destes resultados, os autores sugerem a aplicação destas dispersões aquosas no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos.

Muller (2003) aplicou o método de secagem por aspersão de nanopartículas poliméricas utilizando nanocápsulas obtidas tanto pelo método de nanoprecipitação, quanto pelo método de emulsificação-difusão. A otimização do processo de secagem foi realizada pela estudo de diferentes adjuvantes de secagem, sendo que o dióxido de silício coloidal foi o que apresentou os melhores resultados. Também neste estudo foi realizada a otimização da concentração de tensoativos na preparação de suspensões estáveis. Paralelamente, foi estudada a transposição de escala na preparação destas suspensões coloidais e posterior secagem. O emprego destes produtos secos contendo

nanocápsulas na preparação de comprimidos através da granulação por via úmida foi inviabilizado devido à presença da grande quantidade de tensoativos necessária para a estabilização da suspensão coloidal. Entretanto, os granulados, que apresentaram boas características de fluxo em relação aos produtos secos, foram utilizados como produtos intermediários na preparação de cápsulas de gelatina dura. Além disso, a secagem das suspensões promoveu uma melhora na estabilidade química das suspensões de nanocápsulas contendo diclofenaco (Müller *et al.*, 2004), embora em ambos os casos tenha sido observado o aparecimento de picos de degradação do diclofenaco. Entretanto, a redução do teor de diclofenaco foi dependente do tipo e da concentração do sistema tensoativo utilizado na preparação das formulações. A presença de Epikuron 170<sup>®</sup> tanto nas suspensões quanto nos produtos secos previnem a degradação do diclofenaco. Os produtos de degradação isolados foram o álcool 2-(2',6'-diclorofenil)aminobenzílico e o *N*-(2',6'-diclorofenil)antranilaldeído, já previamente relatados na literatura como produtos de degradação do diclofenaco.

O desenvolvimento de carreadores micrométricos para a liberação de nanopartículas no pulmão foi estudado por Sham e colaboradores (2004). As nanopartículas de gelatina e poli(cianoacrilato de butila) foram incorporadas em carreadores matriciais compostos por lactose, através da técnica de secagem por aspersão. A observação morfológica através de microscopia confocal a laser demonstrou que as nanopartículas estão dispersas na matriz do carreador micrométrico, de acordo com as características do polímero. As nanopartículas de poli(cianoacrilato de butila) apresentaram-se na forma de aglomerados dentro da matriz de lactose, provavelmente devido a sua natureza mais adesiva. Os estudos de dispersão dos pós no ar demonstraram que a maior parte das partículas encontraram-se dentro das faixa de tamanho apropriado para inalação (menor que 5 µm). A redispersão dos pós em água destilada demonstrou um aumento significativo no tamanho das nanopartículas de gelatina (mas ainda na escala nanométrica), resultado de uma possível mudança na conformação da gelatina devido ao processo térmico da secagem por aspersão. Essa alteração não foi demonstrada para as nanopartículas de poli(cianoacrilato de butila). O trabalho apresenta uma estratégia para o

desenvolvimento de sistemas nanoparticulados para o tratamento de doenças pulmonares ou sistêmicas. Cabe ressaltar que neste trabalho não houve associação de nenhum tipo de fármaco às nanopartículas poliméricas.

#### 4. Diclofenaco

O diclofenaco sódico (Figura 1) é um potente antiinflamatório não-esteróide amplamente utilizado na terapêutica, possuindo também atividade analgésica e antipirética. É o primeiro de uma série de derivados do ácido fenilacético, desenvolvidos como fármacos antiinflamatórios. Está disponível no mercado internacional desde 1973, na forma de sal sódico (diclofenaco sódico), potássico (diclofenaco potássico) ou dietilamônio (diclofenaco dietilamônio) e é encontrado em preparações orais, parenterais, retais e tópicas (Insel, 1990; El-Sayed *et al.*, 1988; Oberle *et al.*, 1994).

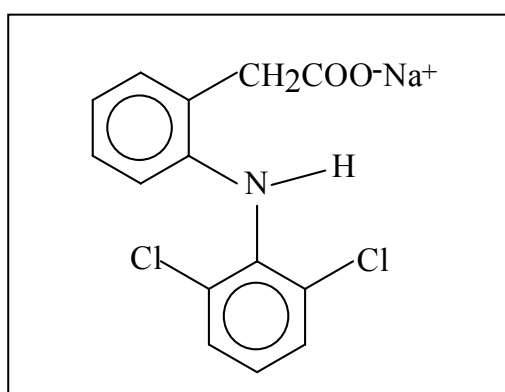


Figura 1 – Sal sódico do ácido 2-[2-[(2',6'-diclorofenil)amino}fenil]acético, diclofenaco sódico (MM = 318,13 g/mol).

Na clínica médica, é principalmente indicado no tratamento da artrite reumatóide, osteoartrite e espondilite anquilosante (Lin e Kao, 1991). Sua potente atividade farmacológica está relacionada à inibição da atividade da ciclooxigenase, enzima envolvida no processo de síntese de prostaglandinas (Conforti *et al.*, 1993).



Quanto à farmacocinética, o diclofenaco sódico apresenta uma rápida absorção após a administração oral, intramuscular ou retal, atingindo um pico máximo de concentração plasmática ( $C_{\text{máx/oral}} = 1100 \text{ ng/ml}$ ; dose de 50 mg) entre 10 e 30 minutos após a administração (John, 1979), sendo a quantidade absorvida de diclofenaco após administração oral não afetada pela presença de alimento no trato gastrintestinal. Na faixa de concentração utilizada na terapêutica, o diclofenaco tem uma alta taxa de ligação às proteínas plasmáticas (99,7 %), principalmente à albumina (John *et al.*, 1979). O tempo de meia-vida do diclofenaco em humanos situa-se entre 1 e 3 horas (Willis *et al.*, 1981; Faigle *et al.*, 1988; Raz *et al.*, 1988), apresentando um volume de distribuição (Vd) de  $0,17 \pm 0,11 \text{ l/kg}$  e *clearance* (Cl) de  $4,2 \pm 0,9 \text{ ml/min/kg}$  (Gilman *et al.*, 1996). A eliminação do diclofenaco está baseada majoritariamente na biotransformação, cuja rota principal é a hidroxilação em várias posições do anéis aromáticos (Stierlin *et al.*, 1979). Em humanos, a excreção urinária é a principal rota de eliminação do diclofenaco e dos seus metabólitos (John *et al.*, 1979). O pKa do diclofenaco na sua forma de ácido livre é de 3,80 (O'Connor *et al.*, 2001).

Estudos realizados em cães demonstram rápida absorção do diclofenaco após a sua administração oral, assim como em ratos, macacos e humanos. Em relação ao seu metabolismo, diferentemente do que ocorre em humanos, a principal rota de eliminação está baseada na conjugação glicurônica do fármaco não-metabolizado e, em menor proporção, na conjugação taurínica, exclusivamente observada nesta espécie. Assim, em cães, a principal rota de eliminação do diclofenaco e seus metabólitos é a excreção biliar, similarmente ao que ocorre em ratos. Como consequência desta excreção biliar de conjugados de fármaco não-metabolizado em cães e ratos, pode ocorrer, nestas espécies, uma hidrólise enzimática no duodeno, regenerando o fármaco livre, não-metabolizado, que por sua vez, pode ser reabsorvido para a circulação sistêmica. Este ciclo entero-hepático, em cães e ratos, leva a obtenção de níveis mais elevados de fármaco no *steady-state* na administração crônica e provavelmente, contribui para um aumento na toxicidade gastrintestinal e sistêmica do diclofenaco, observado nestas espécies (John, 1979).

A inflamação constitui um fenômeno de defesa do organismo podendo levar a uma série de condições patológicas, sendo tratada com agentes que possuem um índice de sucesso de moderado a bom, em virtude da sua toxicidade e incidência de efeitos adversos. Embora os antiinflamatórios não-esteróides constituam uma das classes de fármacos mais prescritas no mundo, seu uso como antiinflamatório, antipirético e analgésico continua sendo limitado pela incidência de seus efeitos adversos principalmente sobre o trato gastrointestinal, como irritação, ulceração, dano à mucosa e perfuração (Osnes *et al.*, 1979; Rainsford e Willis, 1982; Fara e Myrback, 1990; Kourounakis *et al.*, 2000).

É bem conhecido que as lesões gastrintestinais produzidas em animais de laboratório, pela administração oral de antiinflamatórios não-esteróides, estão relacionadas com dois mecanismos de ação diferentes: uma ação local, pelo contato direto do fármaco com a mucosa; e outra ação sistêmica, que aparece após a absorção do fármaco (Cioli *et al.*, 1979). A toxicidade gastrintestinal sistêmica (dose-dependente) dos antiinflamatórios não-esteróides pode ser explicada por fenômenos envolvidos na inibição da síntese das prostaglandinas citoprotetoras (inibição da ciclooxigenase-1 - COX-1), como também por mecanismos prostaglandina-independentes (Rainsford *et al.*, 1989). O efeito lesivo dos antiinflamatórios não-esteróides sobre a mucosa gastrintestinal, derivado do mecanismo de contato direto do fármaco, pode ser diminuído pela utilização de vias alternativas de administração, como a via intravenosa, ou pelo desenvolvimento de formas farmacêuticas de ação modificada, desde que a atividade terapêutica seja mantida (Cioli *et al.*, 1979).

Em face disso, várias estratégias têm sido descritas na literatura para redução da toxicidade gastrintestinal de antiinflamatórios não-esteróides, buscando assim aumentar a sua eficácia terapêutica. Entre estas estratégias, podem-se citar a incorporação em lipossomas (Soehngen *et al.*, 1988), a complexação com ciclodextrinas (Oteroespinar *et al.*, 1991; Lin *et al.*, 1994), a redução do tamanho de partícula (Liversidge *et al.*, 1995), a micro e nanoencapsulação (Ammoury *et al.*, 1993; Weiß *et al.*, 1993; Giunchedi *et al.*, 1995; Guterres *et al.*, 1995; Müller *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2001), as modificações moleculares (Kourounakis *et al.*, 2000) e o

desenvolvimento de formas farmacêuticas de ação modificada (Cerdeira *et al.*, 1998; González-Rodríguez *et al.*, 2003), entre outras.

O diclofenaco tem sido alvo de vários estudos nos últimos anos, buscando a redução de seus efeitos tóxicos sobre o trato gastrintestinal e a manutenção da concentração plasmática, dentro da janela terapêutica, por um período mais prolongado, utilizando-se as mais diversas estratégias, conforme comentado anteriormente. Em 1991, Lin e Kao estudaram a preparação de microcápsulas gastrorresistentes de diclofenaco sódico, através da secagem por aspersão, utilizando o Eudragit L 30<sup>®</sup> (dispersão aquosa), como polímero, e buscando um sistema multiparticulado que pudesse eliminar ou reduzir os efeitos adversos gastrintestinais. Tanto as microcápsulas, quanto os comprimidos obtidos, apresentaram perfis de liberação de acordo com os critérios estabelecidos para formas de liberação entérica.

A utilização de um sistema de liberação transdérmica para o diclofenaco (ácido livre), utilizando dispersões poliméricas de Eudragit RL-100<sup>®</sup> e povidona, foi avaliada por Vyas e colaboradores (1991). Neste estudo, foi demonstrada a possibilidade de preparação de um sistema transdérmico contendo 3,4 % de diclofenaco, que demonstrou uma melhor atividade antiinflamatória e também melhores perfis plasmáticos do fármaco ( $ASC_{\text{transdérmico}} = 43,02 \pm 1,10 \mu\text{g.h/ml}$ ;  $ASC_{\text{comprimido}} = 4,68 \pm 0,5 \mu\text{g.h/ml}$ ), com uma ação mais prolongada e mais controlada, em comparação com administração de uma forma sólida oral.

No ano seguinte, Hasan e colaboradores (1992) desenvolveram uma formulação de microcápsulas gastrorresistentes de diclofenaco sódio, utilizando o método de separação de fases poliméricas e a etilcelulose, como polímero. Neste sentido, o objetivo principal do estudo era a obtenção de um sistema gastrorresistente e ao mesmo tempo, de ação prolongada. Pelo estudo comparativo entre o perfil de liberação *in vitro* e à avaliação *in vivo* das microcápsulas obtidas e de cápsulas de ação prolongada comercialmente disponíveis, chegaram à conclusão de que as microcápsulas de etilcelulose, na razão polímero/fármaco de 2:1 apresentam, tanto *in*

*vitro*, quanto *in vivo*, propriedades de ação prolongada comparáveis à formulação comercial testada.

Na área de sistemas coloidais de administração de fármacos, Guterres e colaboradores (1995) avaliaram a incorporação do diclofenaco (ácido livre) em nanocápsulas de poli(ácido láctico), como estratégia para a melhorar a tolerância gastrintestinal do fármaco após administração oral e intravenosa. Os autores demonstraram uma significativa capacidade de redução na toxicidade sobre a mucosa gastrintestinal quando o fármaco está associado às nanocápsulas, quando comparada a uma solução aquosa do sal do fármaco, apresentando concentrações plasmáticas similares. Porém, esse efeito protetor foi evidenciado somente no caso da administração oral, demonstrando que sua ação deriva da diminuição do efeito lesivo pelo contato direto do fármaco com a mucosa.

Torres e colaboradores (1995) estudaram a utilização a microencapsulação de complexos de diclofenaco sódico e resina trocadoras de íons pelo método de emulsificação não-aquosa utilizando o ftalato de hipromelose, para a obtenção de uma forma de liberação entérica e prolongada. As diferentes formulações de microcápsulas preparadas apresentaram rendimentos entre 53 e 97 %, com taxas de encapsulação de 12,32 a 43,73 % e diâmetro médio entre 680 e 890  $\mu\text{m}$ , dependendo do tipo de tensoativo empregado e do tipo de resina utilizada. A avaliação dos perfis de liberação *in vitro* permitiu concluir que o revestimento polimérico de resinas de troca iônica pode prolongar significativamente a liberação de complexos iônicos e evitar os efeitos indesejáveis sobre a mucosa gástrica.

Em 1996, Arica e colaboradores realizaram estudos de liberação *in vitro* de microesferas de diclofenaco sódico preparadas com carmelose, como material de suporte e revestidas com Eudragit RS-100<sup>®</sup>. Os autores observaram que o aumento na concentração de carmelose resultava num aumento na taxa de encapsulação, no rendimento do processo e no tamanho de partícula, e uma diminuição na velocidade de liberação do fármaco. Em contrapartida, demonstraram que uma redução significativa

da taxa de liberação do fármaco era obtida com a menor concentração de Eudragit RS-100<sup>®</sup> na solução de revestimento.

Um estudo sobre a utilização de matrizes poliméricas na obtenção de formas de ação prolongada para o diclofenaco sódico foi proposto por Nokhodchi e colaboradores (1997), avaliando a liberação *in vitro* do fármaco de matrizes contendo materiais hidrofóbicos (etilcelulose e palmitoestearato de glicerol atomizado – Precirol<sup>®</sup>) e matrizes hidrofílicas (hipromelose). Os sistemas matriciais são bastante atrativos do ponto de vista de seu desenvolvimento e da transposição industrial. Seu princípio baseia-se na formação de uma camada gelatinosa em torno da matriz, quando o polímero se hidrata na presença de água, sendo que o mecanismo de controle da liberação pode ser de dois tipos: fármacos hidrossolúveis são liberados por difusão pela camada gelatinosa e pela erosão da matriz; enquanto que fármacos pouco solúveis em água têm sua liberação governada unicamente pela erosão. Neste estudo, os autores encontraram uma relação linear entre o tempo necessário para liberação de 50 % do fármaco e a relação hipromelose/diclofenaco sódico na matriz. Assim, torna-se possível prever a velocidade de liberação do fármaco, de acordo com as diferentes porcentagens de hiprimelose na matriz.

Wang e colaboradores (1997) estudaram a obtenção de um sistema multiparticulado de ação prolongada para o diclofenaco sódico, pela preparação de *pellets* revestidos com etilcelulose e avaliação das características de liberação *in vitro*. A combinação da etilcelulose com um plastificante (óleo de soja parcialmente hidrogenado - Myvacet 9-40<sup>®</sup>) e um lubrificante (talco) produziu um revestimento estável, permitindo a obtenção de uma liberação controlada do fármaco. O perfil de liberação *in vitro* da formulação desenvolvida foi comparável à formulação comercial de referência, baseada numa matriz hidrofílica contendo diclofenaco sódico.

Há muitos casos em que uma suspensão oral pode ser uma forma farmacêutica favorável, devido a sua facilidade de administração e ajuste da dose, particularmente no caso de pacientes pediátricos e geriátricos. Neste sentido, Ichikawa e colaboradores (1997) realizaram um estudo para a preparação de suspensões orais de microcápsulas

para ação prolongada contendo diclofenaco sódico. As microcápsulas foram preparadas pelo método de Wurster, cujo material de revestimento foi constituído pela dispersão aquosa de Eudragit RS 30D<sup>®</sup>. Assim, os requisitos para a obtenção das microcápsulas, viabilizando sua utilização na preparação de uma suspensão oral, foram atingidos, obtendo-se partículas com um diâmetros médios inferiores a 100 µm, uma concentração significativa do diclofenaco nas micropartículas (em torno de 30 %) e o controle da liberação do fármaco pelo ajuste da espessura do revestimento polimérico.

Ainda no mesmo ano, Dangprasirt e Ritthidej (1997) estudaram a obtenção de comprimidos de ação prolongada pela compressão direta de uma dispersão sólida de diclofenaco sódico, etilcelulose e quitosana, obtida através da secagem por aspersão, em estudo anterior (Dangprasirt e Ritthidej, 1995). Foi possível avaliar a influência de fatores como a força de compressão, a quantidade de material de carga, a concentração de desintegrante e lubrificante e assim, estabelecer a formulação que apresenta a menor velocidade de liberação do fármaco, sendo demonstrado que o perfil de liberação do fármaco não foi influenciado pela compressão das dispersões sólidas, seguindo uma cinética de ordem zero.

Gohel e Amin (1998) empregaram um delineamento fatorial 3<sup>3</sup>, baseado no método da superfície de resposta, para avaliar o efeito das variáveis independentes (velocidade de agitação, concentração de cloreto de cálcio e porcentagem de parafina líquida no meio de dispersão) na obtenção de microesferas de ação prolongada contendo diclofenaco sódico, obtidas pelo método da ligação química cruzada. Após a análise estatística, foi observado que as microesferas devem ser preparadas utilizando uma velocidade de agitação relativamente baixa, altas concentrações de cloreto de cálcio e uma alta porcentagem de parafina líquida. O modelo estatístico foi validado e pode-se identificar as formulações que apresentaram uma menor liberação nos tempos 1, 6 e 8, em horas.

A avaliação *in vitro* e *in vivo* de grânulos de liberação prolongada contendo diclofenaco sódico foi realizada por Hosny e colaboradores (1998), empregando o Eudragit L100<sup>®</sup> como polímero controlador de liberação, dependente do pH. O estudo

foi realizado comparando-se a formulação multiparticulada a uma formulação comercialmente disponível de comprimidos de diclofenaco sódico com revestimento entérico. Nos ensaios de liberação *in vitro*, ambas as formulações apresentaram-se de acordo com os requisitos previstos pela Farmacopéia Americana para formas farmacêuticas com revestimento entérico. Em relação aos estudos *in vivo*, a formulação multiparticulada apresentou uma biodisponibilidade de 197,54 % em relação aos comprimidos gastrorresistentes. Ainda, os comprimidos apresentaram uma menor área sob a curva ( $ASC_{0-8h} = 13,44 \pm 15,02 \mu\text{g.h/ml}$ ) em comparação com os grânulos ( $ASC_{0-8h} = 26,55 \pm 5,19 \mu\text{g.h/ml}$ ), além de uma maior variabilidade nas concentrações plasmáticas máximas.

Dangprasirt e Pongwai (1998) desenvolveram dispersões sólidas de etilcelulose e quitosana contendo diclofenaco sódico, utilizando a liofilização, seguindo-se da preparação de cápsulas a partir dos pós obtidos. A combinação dos dois polímeros, etilcelulose e quitosana, permitiu a obtenção de dispersões sólidas com perfis de dissolução com as características de liberação prolongada pretendida. As dispersões sólidas liofilizadas puderam ser convertidas em cápsulas, utilizando-se a lactose como adjuvante, sem que o perfil de liberação fosse alterado. Tanto as dispersões, quanto as cápsulas apresentaram uma cinética de liberação de primeira ordem.

Os efeitos do tratamento térmico sobre a liberação de diclofenaco sódico a partir de comprimidos matriciais de Eudragit NE 40D<sup>®</sup> foram avaliados por Billa e colaboradores (1998). Neste estudo, foram preparados comprimidos matriciais, pelo método da granulação por via úmida, avaliando-se os efeitos do tratamento térmico tanto dos grânulos, quanto dos comprimidos, sobre o perfil de liberação do fármaco e a dureza dos comprimidos. Foi possível demonstrar a influência do tratamento térmico sobre o perfil de liberação do fármaco, já que a exposição dos grânulos ao calor (60 °C, 5 horas) antes da compressão, levou a uma diminuição na velocidade de liberação do fármaco, possibilitando a redução do tratamento térmico dos comprimidos de 96 para 24 horas. O efeito deste tratamento pode ser explicado pela melhor coalescência entre as partículas de Eudragit NE 40D<sup>®</sup> na formação de uma rede polimérica, resultando numa matriz de menor porosidade. Este fenômeno pode ser comparado à

formação de filme durante o revestimento de formas farmacêuticas utilizando dispersões aquosas, cujo tratamento térmico posterior evita as modificações físicas e alteração das propriedades de liberação do fármaco durante o armazenamento.

Müller e colaboradores (2000) descreveram a utilização da secagem por aspersão na obtenção de produtos secos a partir de nanocápsulas poliméricas contendo diclofenaco, buscando a obtenção de uma forma sólida e assim, tentando contornando o inconveniente da instabilidade físico-química das suspensões coloidais. O método demonstrou-se eficiente, observando-se na superfície dos pós a presença de estruturas nanométricas de tamanho similar às suspensões de origem (200 nm). Na continuidade do trabalho, Guterres e colaboradores (2001) demonstraram a manutenção dos efeitos protetores sobre a mucosa gástrica dos produtos secos contendo nanocápsulas de diclofenaco, em relação à suspensão original (Guterres *et al.*, 1995). No mesmo estudo, foi demonstrada a completa absorção do diclofenaco a partir dos produtos secos, embora um perfil plasmático diferenciado tenha sido observado, comparado àquele obtido pela administração de uma solução aquosa do diclofenaco sódico. A administração do pós por via oral apresentou um pico de concentração máxima inferior ao obtido com a solução aquosa, bem como um tempo de meia-vida mais longo.

A preparação de microesferas biodegradáveis contendo diclofenaco sódico e utilizando um polímero natural (albumina), através de uma técnica de emulsificação-polimerização, foi estudada por Tunçay e colaboradores (2000). O objetivo do estudo foi desenvolver sistemas para administração intra-articular, como alternativa para evitar os efeitos tóxicos do diclofenaco sobre a mucosa gastrintestinal. A avaliação da eficácia terapêutica do fármaco associado às microesferas foi realizada em coelhos, em modelo de indução de artrite no joelho. A incorporação do fármaco nas microesferas de polímero natural demonstrou a possibilidade de se obter bons resultados através da preparação destas microesferas, após a observação de uma maior eficácia no tratamento da artrite 30 dias após a administração da formulação, demonstrando a capacidade do sistema de promover uma liberação controlada do fármaco.



Kourounakis e colaboradores (2000) estudaram a redução da toxicidade gastrointestinal do diclofenaco através de uma modificação molecular, dando origem a um composto com atividades antiinflamatória e antioxidante (Figura 2). Os autores se embasaram em relatos da literatura que apontam o estresse oxidativo como um componente patogênico importante no surgimento de ulcerações gastrointestinais. Os compostos sintetizados são derivados amídicos do diclofenaco ácido com a cisteamina. Os resultados demonstraram uma proteção significativa da mucosa gastrointestinal após a administração dos novos compostos, em comparação com o diclofenaco. Pôde-se concluir, então, que a combinação de duas propriedades, a atividade antiinflamatória e antioxidante, com uma simultânea redução da característica ácida dos componentes, pode levar ao desenvolvimento de novos fármacos potencialmente aplicáveis na terapêutica.

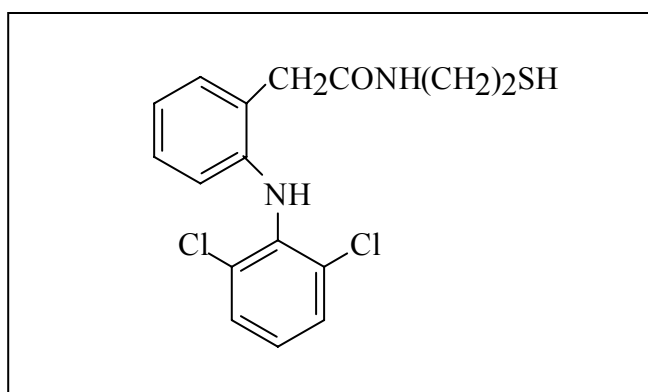


Figura 2 – Derivado amídico do diclofenaco com a cisteamina (Kourounakis e colaboradores, 2000).

Outro estudo para a obtenção de um sistema de ação prolongada para o diclofenaco sódico, realizado por Azechi e colaboradores (2000), avaliou a possibilidade da utilização de supositórios contendo polímeros hidrossolúveis para reduzir a velocidade de liberação do fármaco. Estudando a utilização de polímero carbóxi-vinílico (Carbopol<sup>®</sup>), hietelose e álcool polivinílico na preparação de supositórios com uma base de triglicerídeos, verificaram que a maior redução na taxa de liberação do diclofenaco era quando o polímero carbóxi-vinílico era utilizado. Ainda, demonstraram que as proporções de diclofenaco e do polímero influenciaram

na velocidade de liberação. Quanto maior a quantidade de polímero na preparação, menor a velocidade de liberação do fármaco, o que foi explicado pelo aumento da viscosidade do supositório. O estudo *in vivo*, avaliando-se a farmacocinética destas formulações em ratos, demonstrou que os supositórios preparados com o polímero hidrossolúvel apresentaram um menor pico máximo de concentração plasmática (2,80 µg/ml) e um maior tempo de retenção médio (6,07 h), quando comparados aos resultados obtidos para o supositório preparado sem o polímero (6,1 µg/ml; 3,46 h), embora as áreas sob a curva não tenham demonstrado diferença significativa entre as formulações (18,6 e 17,7 µg.h/ml, respectivamente).

Em 2001, Rao e colaboradores estudaram a obtenção de comprimidos matriciais de diclofenaco sódico para a obtenção de uma forma farmacêutica de ação prolongada. Com este objetivo, avaliaram a utilização da hipromelose e da carmelose sódica como polímeros reguladores da velocidade de liberação, na obtenção de comprimidos através da granulação por via úmida. Os estudos *in vitro* apontaram que a relação de fármaco: hipromelose:carmelose sódica de 1:2:1 apresentava o perfil de liberação compatível com o objetivo do estudo, com uma cinética próxima à de ordem zero, e sendo esta formulação escolhida para os estudos de biodisponibilidade. Assim, o estudo *in vivo* foi realizado em comparação com a formulação líder no mercado (Japão), e com outra formulação que apresentou uma cinética *in vitro* semelhante àquela verificada para a formulação desenvolvida no estudo. Os resultados demonstraram que os comprimidos matriciais desenvolvidos apresentaram uma maior área sob a curva (0-t e 0-∞) e um maior pico de concentração plasmática máxima, em relação a marca líder no mercado, e similar, quando comparados à formulação comercial com semelhante perfil de liberação *in vitro*. A explicação para o aumento nestes parâmetros farmacocinéticos foi dada pela alta viscosidade inferida pela combinação dos dois polímeros utilizados, assim como a possível mucoadesão dos comprimidos ao trato gastrointestinal, devido às propriedades mucoadesivas da hipromelose.

A redução na toxicidade gastrointestinal, associada à obtenção de uma forma de liberação prolongada, utilizando um pró-fármaco polimérico, foi avaliada por

Chandrasekar e colaboradores (2001). Neste estudo, os autores sintetizaram um derivado polimérico do diclofenaco sódico (Figura 3), ligando-o covalentemente ao poli(metacrilato de hidróxi-etila) (poli-HEMA), um polímero biocompatível, através de uma ligação do tipo éster, cuja ligação é clivada preferencialmente em meio alcalino, ou seja, no trato gastrintestinal inferior. Os estudos *in vitro* demonstraram uma liberação prolongada do fármaco, em tampão fosfato pH 7,2, durante 24 horas, atingindo um total de 94,28 % de fármaco liberado, com um  $t_{50}$  de 4 horas. Através dos estudos farmacocinéticos realizados em ratos, os autores observaram uma diminuição no pico máximo de concentração plasmática (105,50 ng/ml) e um aumento no  $T_{máx}$  (4 h), quando comparados aos resultados para o fármaco livre (181,67 ng/ml; 2 h), embora a área sob a curva não tenha apresentado diferença estatisticamente significativa entre o derivado polimérico e o fármaco livre (605,50 e 564,61 ng.h/ml). A avaliação da toxicidade gastrintestinal do derivado polimérico apresentou um aumento na tolerância, após a administração oral, quando comparada aos resultados obtidos para o fármaco livre.

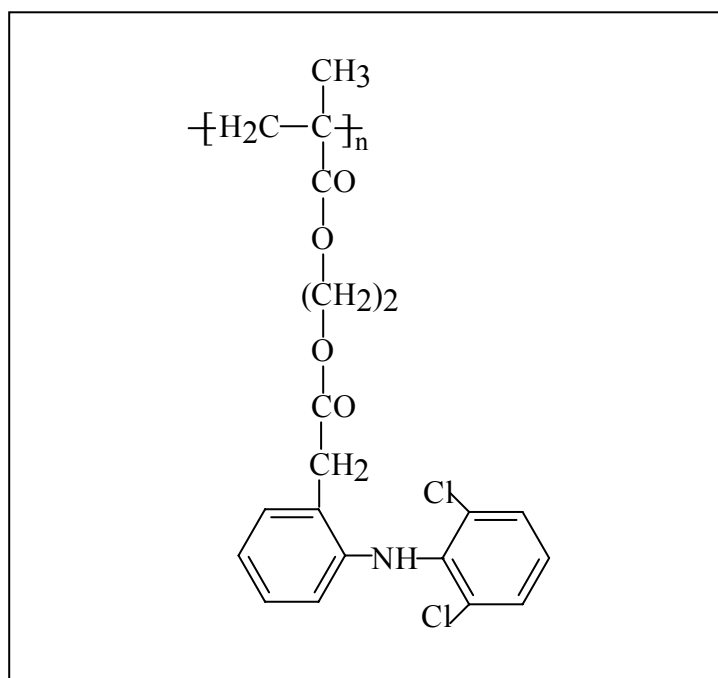


Figura 3 – Pró-fármaco polimérico, derivado do diclofenaco (Chandrasekar e colaboradores, 2001).

Em 2002, Al-Omran e colaboradores publicaram um estudo baseado no emprego da microencapsulação para mascarar o gosto desagradável do diclofenaco e manter uma liberação adequada do fármaco em pH 7,4. As micropartículas foram preparadas através da técnica de coacervação simples, pela adição de um não-solvente, e utilizando a etilcelulose como polímero. Foi avaliada a utilização direta do diclofenaco de sódio na preparação e também a preparação prévia de um núcleo, formado pelo fármaco, lactose e celulose microcristalina. Os resultados demonstraram que a preparação do núcleo facilitou o processo de coacervação, obtendo-se micropartículas com tamanho médio menor e evitando a aglomeração das microcápsulas. A liberação *in vitro* do fármaco demonstrou a influência do tipo e concentração do plastificante empregado, da forma do núcleo empregada e do tamanho médio do núcleo inicial, porém todas as formulações apresentaram uma liberação adequada em tampão 7,4 ( $t_{50}$  entre 15 e 45 minutos). A avaliação do mascaramento do sabor foi realizado em um grupo de 10 voluntários e os resultados (sabor, grau, sensação após o teste) foram definidos numa escala de 1-5. Os resultados demonstraram que o paladar foi significativamente melhorado através da microencapsulação.

Buscando sistemas de liberação colônica para o diclofenaco sódico, Orienti e colaboradores (2002) estudaram a influência de diferentes sais de quitosana na liberação do diclofenaco sódico, baseados na possibilidade de minimizar a liberação no trato gastrintestinal superior e aumentar a hidrólise do polímero (polissacarídeo) pela presença das  $\beta$ -glicosidases, presentes exclusivamente no cólon. Os sais foram preparados pela dissolução do polímero em água e adição de diferentes ácidos (aspártico, glutâmico, clorídrico, cítrico e láctico) em diferentes concentrações molares, seguida da secagem por aspersão. A confirmação da formação dos sais foi realizada através da espectrometria no infravermelho. Em seguida, foram preparadas misturas físicas dos sais de quitosana e o diclofenaco sódico. A liberação do fármaco foi menor nas misturas de fármaco e polímero em relação ao fármaco puro, em todos os pH avaliados (2,0;5,5;7,4;7,0) e as interações com as  $\beta$ -glicosidases no pH 7,0 aumentaram a liberação do fármaco devido à catálise enzimática na hidrólise da quitosana. Entre os diferentes sais analisados, os derivados do aspartato e glutamato

apresentaram a menor liberação no pH ácido e a maior liberação no pH alcalino, em função da sua menor e maior hidrofília nestes pH, respectivamente. Além disso, na presença das  $\beta$ -glicosidasas, o aumento na liberação do fármaco foi mais pronunciado, em função das características de solubilidade, favorecendo as interações polímero-enzima. Assim, os autores sugerem que os sais de quitosana podem ser efetivos como material de suporte na preparação de sistemas de liberação colônica de fármacos.

Basan e colaboradores (2002) desenvolveram sistemas monolíticos sensíveis às mudanças de pH (discos de 10 mm de diâmetro), preparados através da ligação cruzada/copolimerização de monômeros de metacrilato de 2-hidróxi-etila (HEMA) e monômeros ionizáveis (ácido acrílico ou metacrilato de dimetilaminoetila), utilizando etilenoglicoldimetacrilato como agente de ligação cruzada. A reação de polimerização foi realizada em presença do diclofenaco de sódio. A partir dos estudos de inchamento do polímero, realizados em meio gástrico e intestinal simulado, os autores pré-selecionaram a formulação contendo ácido acrílico, pois esta apresentou um aumento no percentual de inchamento, em função do aumento no valor de pH, que lhe proporciona uma possibilidade de liberação retardada. Os estudos de liberação *in vitro* demonstraram a influência do tipo de monômero ionizável, conforme já verificado no estudo do inchamento do polímero, da espessura dos discos e da quantidade de fármaco presente, que altera as forças de difusão e a porosidade da matriz. A liberação do fármaco a partir do sistema desenvolvido contendo 20 % (v/v) de ácido acrílico demonstrou um comportamento similar àquele obtido para duas formulações disponíveis comercialmente (Voltaren SR<sup>®</sup> e Voltaren Retard<sup>®</sup>).

Ainda em 2002, Sajeev e colaboradores desenvolveram sistemas de liberação controlada de diclofenaco sódico a partir de microcápsulas compostas pelo fármaco e etilcelulose, através da técnica de coacervação, com posterior utilização destas na preparação de comprimidos não-desintegrantes. As micropartículas preparadas apresentaram diâmetro em torno de 50  $\mu$ m e características esféricas, sendo que o teor de fármaco variou conforme a composição inicial da formulação (proporção fármaco:etilcelulose). Os perfis de liberação, em água, do fármaco a partir das microcápsulas apresentaram uma capacidade de prolongar a liberação do fármaco, de

acordo com a composição da formulação, ou seja, o aumento da proporção de etilcelulose levava a uma diminuição na velocidade de liberação. Ainda, esta velocidade de liberação do fármaco foi significativamente reduzida após a preparação dos comprimidos, sendo que a liberação a partir dos comprimidos preparados com as microcápsulas que continham a maior proporção de etilcelulose apresentou um teor de 90% de liberação após quase 12 horas de experimento, em relação a liberação da mesma proporção após 20 minutos de experimento a partir das microcápsulas antes desta conversão. A avaliação dos perfis de liberação demonstrou que a liberação do fármaco a partir dos comprimidos apresentava uma cinética de liberação de ordem zero, sendo que, segundo os autores, o mecanismo de liberação mais provável do fármaco a partir destes sistemas é a difusão do fármaco devido ao intumescimento da matriz composta pela etilcelulose.

Em 2003, Schaffazick e colaboradores avaliaram a utilização da liofilização na secagem de nanocápsulas e nanoesferas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) e Eudragit S90<sup>®</sup>, para a obtenção de produtos secos, bem como o efeito protetor destes liofilizados sobre a mucosa gastrointestinal. Foi demonstrado no estudo a potencialidade de emprego da liofilização de sistemas coloidais poliméricos, empregando o Aerosil 200<sup>®</sup> (3,0 % m/v) como adjuvante de secagem. Em relação ao estudo da toxicidade gastrointestinal, observou-se que os liofilizados contendo nanocápsulas de diclofenaco exerceram um efeito protetor significativo sobre a mucosa gastrointestinal dos ratos, em comparação aos efeitos apresentados pela administração da solução aquosa do fármaco. Um efeito protetor similar já havia sido relatado para a suspensão de nanocápsulas e nanoesferas de diclofenaco, bem como para os respectivos produtos secos (Guterres *et al.*, 1995; Guterres *et al.*, 2001), conforme mencionado anteriormente.

O desenvolvimento de comprimidos matriciais compostos por um núcleo formado por uma dispersão sólida de diclofenaco e poligol 4000, revestido com uma mistura do polímero Eudragit RS 100<sup>®</sup> e agentes formadores de canais (cloreto de sódio ou Emdex<sup>®</sup> - mistura de dextrose, maltose e outros sacarídeos) foi estudado por González-Rodríguez, em 2003. O desenvolvimento destes comprimidos baseou-se na busca de um sistema de liberação modificada do fármaco, visando principalmente

sistemas de liberação colônica. O diclofenaco foi selecionado como modelo por ser bem absorvido no cólon, pela necessidade de se evitar sua liberação em nível gástrico e ainda, pela capacidade de fármacos antiinflamatórios não-esteróides exercerem uma ação preventina contra o câncer de cólon (aumento da apoptose celular). Os comprimidos foram preparados por compressão direta, adicionando-se primeiramente 50 % da mistura polímero-agente formador de canal, seguido da adição do núcleo, o restante da mistura de revestimento e compressão. Os resultados de liberação demonstraram que o cloreto de sódio é mais efetivo que o Emdex<sup>®</sup> como agente formador de canais, permitindo a obtenção de adequados valores de tempo de latência, na obtenção de sistemas de liberação colônica. Ainda, o aumento na proporção de cloreto de sódio presente na mistura de revestimento, diminui o tempo de latência e aumenta a velocidade de liberação do fármaco, explicado pelo aumento do número de poros formados na matriz, devido a hidrofília do cloreto de sódio. Através do ajuste dos parâmetros da formulação foi possível a obtenção de um tempo de latência adequado, seguido por uma liberação controlada do fármaco, de acordo com uma cinética de liberação de ordem zero.

Em 2004, Saravanan e colaboradores estudaram a preparação de micropartículas magnéticas de gelatina, utilizando o método de emulsificação e ligação química cruzada e o diclofenaco de sódio, como fármaco modelo. As micropartículas foram obtidas com bom rendimento (84 %), boa resposta magnética, diâmetro menor que 5  $\mu\text{m}$  (entre 0,4 e 5  $\mu\text{m}$ ) e encapsulação de 74,9 %. O pó obtido apresentou característica de fluxo livre e a observação morfológica através de microscopia eletrônica de varredura mostrou partículas esféricas e compactas. Na seqüência da caracterização, os autores empregaram estudos de difração de raios-X e calorimetria diferencial exploratória para estudar o estado físico do fármaco nas micropartículas. Da combinação dessas técnicas, verificaram que o diclofenaco sódico encontrava-se na forma amorfa. A liberação *in vitro* do fármaco em pH 7,4 foi lenta, atingindo 100 % após 21 dias, seguindo uma cinética de acordo com o modelo de Higuchi (difusão controlada). Para confirmar o mecanismo de liberação, os autores aplicaram a equação de Krosmeier-Peppas, encontrando um mecanismo de difusão não-Fickiano (transporte anômalo). Além disso, a aplicação de ultrassom, antes do início do

experimento de liberação apresentou apenas uma pequena influência sobre a quantidade de fármaco liberada, explicada pela maior difusão do meio ou migração do fármaco durante a aplicação das ondas de ultrassom. Em experimento *in vivo*, após a injeção das micropartículas em coelhos e aplicação de um campo magnético no local de ação, embora os autores tenham detectado a presença das microesferas e do fármaco no local esperado, a maior parte da dose foi encontrada no fígado, pulmões e baço, sugerindo uma alta taxa de captura (fagocitose) pelo sistema reticuloendotelial (SRE).

No mesmo ano, Kurkuri e colaboradores (2004) prepararam e caracterizaram microesferas pH sensíveis compostas por uma rede seqüencial interpenetrante (álcool polivinílico e ácido poliacrílico) para promover a liberação do diclofenaco sódico no intestino. O método utilizado na preparação das microesferas foi a emulsificação, seguida de ligação química cruzada, avaliando-se três diferentes composições de ácido poliacrílico, três diferentes quantidades de agente de ligação cruzada (glutaraldeído) e três concentrações de diclofenaco. A taxa de encapsulação variou entre 51 e 91 %, melhorando com o aumento na quantidade do fármaco e ácido poliacrílico adicionados à formulação. Por outro lado, o aumento na quantidade de agente de ligação cruzada diminui a taxa de encapsulação. Este resultado pode ser explicado pelo enrijecimento das micropartículas e conseqüentemente, diminuição do volume livre dentro da matriz polimérica. Estudos combinados de difração de raios-X e calorimetria diferencial exploratória demonstraram que o fármaco encontra-se molecularmente disperso nas microesferas, sem presença de estruturas cristalinas. Através de microscopia eletrônica de varredura, foram observadas microesferas esféricas, não-porosas e apresentando restos de polímero na sua superfície, devido a preparação simultânea das partículas e formação das redes). O tamanho das micropartículas variou entre 160 e 304  $\mu\text{m}$ . O estudo de inchamento das microesferas demonstrou que este ocorre em maior proporção em pH 7,4 comparado ao pH 1,2, assim como é influenciado pela quantidade de agente de ligação cruzada. Quanto maior a quantidade adicionada, menor o grau de inchamento. Os resultados da liberação *in vitro* corroboraram com aqueles obtidos nos estudos de inchamento. A liberação foi diretamente proporcional à quantidade de agente de ligação cruzada e maior em pH 7,4, atribuída à presença de



grupos COOH, responsáveis pelo maior inchamento em valores mais altos de pH.

## 5. Dexametasona

A dexametasona é um glicocorticóide com emprego clínico revelante devido às suas propriedades antiinflamatórias e imunossupressoras (Figura 4). Estas atividades antiinflamatórias e imunossupressoras dos glicocorticóides estão intimamente relacionadas, já que derivam da sua capacidade de inibir funções específicas de leucócito, entre elas a inibição de enzimas lipolíticas (fosfolipase A<sub>2</sub>) e proteolíticas e a liberação de substâncias quimiotáticas, assim como de mediadores do aumento da permeabilidade capilar, da vasodilatação e da contração de vários músculos lisos não-vasculares. Entretanto, a utilização da dexametasona em terapias prolongadas é restringida pelo seu grande número de efeitos adversos, tais como os distúrbios hidroeletrólíticos, hipertensão, hiperglicemia, úlceras pépticas, glicosúria, suscetibilidade aumentada à infecção, osteoporose e catarata (Schimmer, 1996)

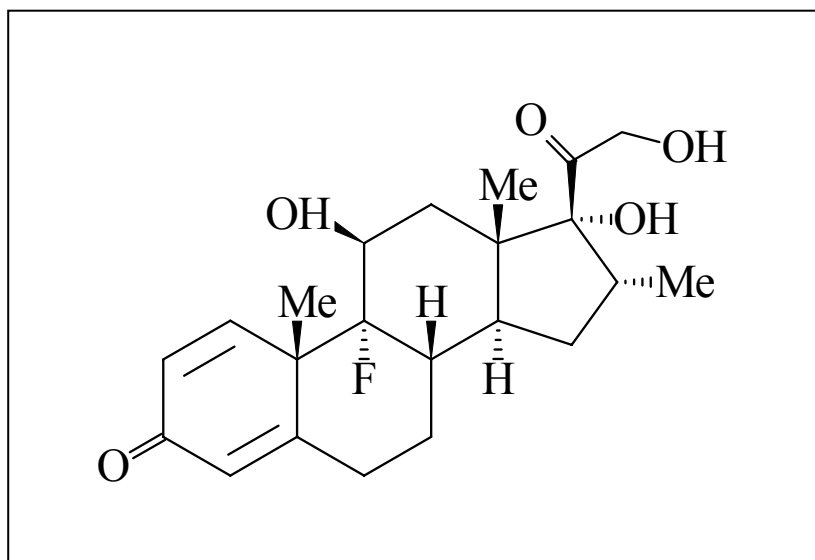


Figura 4 - Dexametasona (MM = 392,47 g/mol).

A dexametasona pode ser caracterizada com um pó cristalino branco ou quase branco, e inodoro; praticamente insolúvel em água; facilmente solúvel em etanol, acetona, dioxano e metanol; levemente solúvel em clorofórmio; muito levemente solúvel em éter. Este pó deve ser armazenado em recipientes bem fechados e protegidos da luz (Martindale, 1996). A sua solubilidade em água é de 1 mg/ml, com um coeficiente de partição de 1,33, determinado em um sistema octanol/tampão fosfato pH 7,4, a 37 °C (Einmahl *et al.*, 1999).

No Brasil, segundo o DEF 2001/02, a dexametasona é comercializada na forma de comprimidos, elixir, solução oftálmica, solução e suspensão injetável, solução nasal ou creme. É importante ressaltar que a dexametasona pode ser encontrada nestas formulações na sua forma livre, de éster acetato ou fosfato de sódio, de acordo com as suas características de solubilidade.

Em relação à farmacocinética, a dexametasona apresenta uma biodisponibilidade oral em torno de 80 %, com uma taxa de ligação às proteínas plasmáticas de 68 %. O tempo de meia-vida plasmática em humanos situa-se entre 3 e 4 horas, apresentando um volume de distribuição (Vd) de  $0,82 \pm 0,22$  l/kg. A eliminação dos glicocorticóides está baseada principalmente nas reações de conjugação com ácido ou sulfato glicurônico, formando ésteres de sulfato ou glicorunídicos, que são excretados através da urina. Tanto a excreção biliar, quanto a fecal, não possuem importância quantitativa no homem (Gilman, 1996).

Na literatura, vários estudos podem ser encontrados empregando estratégias para aumentar a eficácia da dexametasona, focando a redução dos seus efeitos adversos, a obtenção de sistemas de liberação prolongada ou de sistemas de liberação colônica.

Buscando um sistema de liberação colônica, Tozer e colaboradores (1991) avaliaram o potencial de utilização de um pró-farmaco da dexametasona, a dexametasona- $\beta$ -D-glicosilada. Esta liberação sítio-específica foi baseada na ocorrência de grandes quantidades de glicosidases bacterianas no cólon, em comparação com o intestino delgado, permitindo o desenvolvimento de sistemas para tratamento de doenças do cólon. Através de estudos de hidrólise *in vitro*, utilizando

segmentos de tecidos do trato gastrointestinal de cobaias e seus respectivos conteúdos, demonstraram que 20 a 30 % da dose de pró-fármaco chega intacta ao cólon. Entretanto, os autores esperam um maior aporte de pró-fármaco ao cólon e ceco, em humanos, pela menor atividade de  $\beta$ -glicosidases no intestino delgado de humanos, em relação às cobaias (mais de 100 vezes menor). Estudos farmacocinéticos comparando a administração oral do pró-fármaco e a administração intravenosa da dexametasona demonstraram uma vantagem específica da administração oral do pró-fármaco em torno de 9,2 nos tecidos do ceco. Frente à hipótese de um maior aporte do pró-fármaco ao ceco, em humanos, os autores também esperam uma maior seletividade nesta espécie, possibilitando uma redução na dose usual e uma menor exposição sistêmica ao agente antiinflamatório.

Em 1993, Dilova e Shishkova prepararam microesferas de albumina contendo dexametasona, visando a obtenção de um sistema de liberação sustentada. As micropartículas foram preparadas pelo método de desnaturação térmica, variando o tempo de agitação a 100 °C (30, 60, 120 e 180 min). Os resultados encontrados nos estudos de liberação *in vitro* demonstraram que a menor velocidade de liberação do fármaco a partir das microesferas estava associada com os maiores períodos de exposição à alta temperatura, na etapa de preparação destas micropartículas. Essas formulações apresentaram um perfil de liberação de acordo com o modelo de Higuchi, apresentando uma rápida liberação inicial durante as 6 primeiras horas, possivelmente relacionada ao fármaco superficialmente adsorvido, seguida de uma liberação mais lenta, associada ao fármaco incorporado na matriz da macromolécula. Adicionalmente, estudos farmacocinéticos em carneiros reiteraram esse potencial de controlar a liberação da dexametasona, demonstrando um tempo de meia-vida de absorção de 34,6 h após a administração intramuscular das microesferas em suspensão.

No mesmo ano, McLeod e colaboradores (1993) relataram a síntese de ésteres de dextrana de glicocorticóides (dexametasona e metilprednisolona), utilizando moléculas espaçadoras, como o ácido succínico e glutárico. Essa abordagem já havia sido estudada para a administração cólon-específica de antiinflamatórios não-esteróides, pelo acoplamento direto da dextrana aos grupamentos ácidos carboxílicos destes

fármacos, sem a necessidade de utilização de moléculas espaçadoras. Os conjugados (pró-fármacos) apresentaram um tempo de meia-vida, em pH 6,8, a 37 °C, entre 82 e 103 h. No estudo de hidrólise em conteúdo gastrointestinal de ratos, demonstraram que menos de 3 % do conjugado é liberado como fármaco e hemiéster nos conteúdos das porções superiores do trato, enquanto que 14% é liberado nos conteúdos do intestino grosso. Estes resultados demonstram que a estrutura da dextrana protege as ligações ésteres das ações de hidrólise de esterases presentes nas porções do intestino delgado, indicando a potencialidade destes conjugados na liberação cólon-específica de glicocorticóides.

Leopold e Friend (1995) estudaram a utilização do poli(ácido aspártico) na preparação de conjugados (pró-fármacos) para a obtenção de um sistema seletivo de liberação de dexametasona até o cólon, para o tratamento de doenças inflamatórias do intestino. Os conjugados apresentaram um tempo de meia-vida, em pH 4,5 e 6,5, a 37 °C, de 114 e 2,8 dias, respectivamente, demonstrando que a hidrólise química não desempenha um papel importante na atividade hidrolítica. Em relação à atividade enzimática, foram encontradas as maiores taxas de atividade no intestino grosso, sendo que os conteúdos do cólon e ceco apresentaram uma atividade significativamente superior ( $p < 0,01$ ) que os conteúdos gástricos e do intestino delgado. Os resultados demonstram que as ligações ésteres dos conjugados parecem estar protegidas frente às enzimas digestivas, devido à estrutura do polímero presente no conjugado. A hipótese de clivagem das ligações ésteres do conjugado pela microflora bacteriana é ainda fortalecida pela baixa atividade enzimática encontrada nos conteúdos do ceco e cólon de ratos livres de germes (*germ-free*). Os resultados encontrados nos experimentos levam os autores a apontar o polímero como uma alternativa na obtenção de sistemas de liberação colônica.

Em outra forma de abordagem, Ghassabian e colaboradores (1996) estudaram a preparação e a liberação *in vitro* de microesferas magnéticas de albumina, utilizando a dexametasona (na forma de fosfato sódico), como fármaco modelo. Neste estudo, a dexametasona foi selecionada pelas suas aplicações no tratamento de linfomas, assim como pelas suas atividades antiinflamatórias e imunossupressoras. A maior parte das

microesferas obtidas (95,3%) apresentaram um tamanho de partícula menor que 5  $\mu\text{m}$  e através de um estudo *in vitro* os autores demonstraram a capacidade de manter as microesferas (65 %) em um determinado local, através da aplicação de um campo magnético. Em relação a liberação *in vitro* da dexametasona a partir destas formulações, realizadas em solução salina, os autores demonstraram uma liberação de cerca de 30 % da concentração teórica do fármaco nos primeiros 200 minutos do experimento, seguida por uma fase com concentração constante (platô). Os autores explicam o resultado pela liberação muito lenta do fármaco incorporado às microesferas, pela possibilidade de degradação do fármaco durante o experimento ou ainda pela presença do fármaco em concentração menor nas microesferas àquela teoricamente calculada. Entretanto, não foi realizado nenhum tipo de experimento tentando justificar alguma destas hipóteses. Os autores concluem que o sistema de micropartículas magnéticas de albumina, contendo dexametasona, pode ser uma opção no tratamento de tumores linfocíticos.

A combinação da cintilografia com um estudo farmacocinético foi realizada por Kenyon e colaboradores (1997), e avaliou a utilização de comprimidos compostos por goma guar, no desenvolvimento de sistemas de liberação colônica contendo dexametasona. Neste estudo, não são fornecidos detalhes das formulações testadas (comprimidos), sabendo-se, porém, que uma formulação é de liberação imediata e as outras três formulações são de liberação controlada, contendo variações no tamanho de partícula da goma guar e na composição dos outros excipientes. Os resultados apresentados demonstram uma boa correlação entre os dados obtidos pela cintilografia, através do estudo do tempo de passagem e de desintegração do comprimidos ao longo do trato gastrointestinal, com os dados farmacocinéticos. Todas as formulações compostas por goma guar apresentam um retardamento na desintegração (tempo para início e para a desintegração completa), em relação ao comprimido de liberação imediata. Essa desintegração mais rápida dos comprimidos de liberação imediata é acompanhada pelos mais altos níveis séricos de dexametasona durante as 2 primeiras horas do estudo farmacocinético ( $t_{\text{max}} = 1,8 \text{ h}$ ), enquanto que o fármaco é absorvido mais lentamente a partir das formulações de liberação controlada ( $t_{\text{max}}$  entre 6 e 12

horas). Em relação à quantidade de fármaco que chega até o cólon, a proporção em relação a dose administrada varia entre 72 e 82%, dependendo da formulação. Entretanto, todas as formulações de liberação controlada apresentaram uma área sob a curva menor, em relação a formulação de liberação imediata. Como os dados da cintigrafia demonstram a desintegração total dos comprimidos, os autores relacionam essa redução na área sob a curva à menor capacidade de absorção do intestino grosso em relação ao intestino delgado, a incompleta dissolução do fármaco pelo menor volume de água presente nas regiões distais do cólon, ou ainda, a metabolização (degradação) do fármaco pela microflora intestinal. Diante desses resultados, os autores afirmam que um estudo clínico em pacientes com doenças inflamatórias do intestino faz-se necessário para determinar como essa redução na ASC poderá estar relacionada à adequada eficácia terapêutica.

Nakase e colaboradores (2000) estudaram o desenvolvimento de microesferas de poli(ácido-lático) através do método de evaporação do solvente em busca de uma vetorização de fármacos, no caso a dexametasona, para macrófagos e células M, justificada por estudos anteriores que apontam o seu envolvimento nas doenças inflamatórias do intestino. Após a preparação, foram separadas as micropartículas com tamanhos menores que 4  $\mu\text{m}$ , que apresentam uma taxa máxima de fagocitose pelos macrófagos. Os resultados farmacocinéticos associados aos resultados farmacológicos demonstraram que a vetorização para os macrófagos e células M representa uma nova alternativa terapêutica no modelo de colite. As observações microscópicas mostram o maior acúmulo das micropartículas no cólon inflamado, em relação ao cólon normal, que pode ser explicado pela maior presença dos macrófagos e pelo revestimento das microesferas por imunoglobulinas ou outras proteínas que desencadeiam o processo de reconhecido pelo sistema fagocitário. Os resultados farmacocinéticos demonstram que o fármaco associado às microesferas (dexametasona) não apresenta passagem para a corrente circulatória (24h), indicando a possibilidade de uma redução nos efeitos adversos sistêmicos. Os resultados dos ensaios bioquímicos (atividade de mieloperoxidase, produção de óxido nítrico e presença de citocinas pró-inflamatórias) e histológicos demonstram que a formulação de microesferas contendo dexametasona

é mais potente na redução e reparo das lesões de colite induzida em comparação com a administração da dexametasona livre ou mistura de dexametasona e microesferas vazias.

O desenvolvimento de microesferas do poli(ácido lático-co-ácido glicólico) para a liberação contínua de dexametasona por um período superior a 1 mês, visando suprimir as reações inflamatórias agudas e crônicas desencadeadas pelo implante de biossensores, como os sensores de glicose, foi estudada por Hickey e colaboradores (2002). As microesferas foram preparadas através de um método simples de preparação de uma emulsão O/A, seguida da evaporação do solvente, obtendo-se micropartículas com diâmetro médio entre 11 - 12  $\mu\text{m}$  e taxa de encapsulação de 3 - 4%. Através dos estudos de liberação *in vitro*, em pH 7,4, foi verificado o aparecimento de um pico secundário no cromatograma, cujo aumento estava linearmente correlacionado com a diminuição do pico de dexametasona. Testes foram realizados para verificar a possibilidade de degradação da dexametasona relacionada a diminuição do pH do meio ou a uma possível degradação microbiológica. Nenhuma das hipóteses foi confirmada. Na continuidade, os autores verificaram uma liberação trifásica do fármaco a partir das microesferas, constituída por uma etapa inicial rápida, um retardamento na liberação e uma fase de liberação contínua. A fase de retardamento, verificada no período compreendido entre o segundo dia e a segunda semana, poderia limitar a disponibilidade do fármaco durante as 2 primeiras semanas pós-implante, consideradas cruciais no tratamento da reação inflamatória. Entretanto, foi demonstrado que as microesferas submetidas a um processo de pré-degradação (agitação durante 1 ou 2 semanas na solução de álcool polivinílico) apresentavam uma liberação bifásica, sem a fase de retardamento da liberação. Assim, um sistema de liberação contínua/sustentada do fármaco foi obtido pela mistura de microesferas padronizadas e pré-degradadas, que pela adição de poligol 8000, apresentou uma liberação contínua pelo período desejado (superior a um mês).

Em 2003, Cypes e colaboradores estudaram o desenvolvimento de nanocompósitos de poli(etileno-co-acetato de vinila), contendo organossilicatos, organizados em camadas nanométricas. O estudo foi realizado com a incorporação da

dexametasona aos nanocompósitos e avaliação do perfil de liberação *in vitro*, buscando um sistema de liberação controlada para utilização no tratamento de reações inflamatórias provocadas por sistemas de implante. A velocidade de liberação da dexametasona a partir dos sistemas foi retardada, de acordo com as características do organossilicato e da sua proporção em relação ao polímero. Os grânulos com maior proporção de organossilicato apresentaram uma menor velocidade de liberação do fármaco. O conjunto dos resultados obtidos no trabalho demonstrou a possibilidade de controle da difusão do fármaco a partir dos nanocompósitos, de acordo com a combinação dos organossilicatos empregados (tipo e proporção).

Ainda em 2003, Beck e colaboradores estudaram a incorporação da dexametasona em nanopartículas de poli(ácido lático) e poli( $\epsilon$ -caprolactona), utilizando-a na sua forma livre ou de éster acetato. Os melhores resultados foram obtidos para as formulações preparadas a partir do fármaco na forma livre (taxa de encapsulação em torno de 80 %), embora todas as formulações tenham apresentado um declínio na eficiência de incorporação durante o estudo de estabilidade (3 meses, à temperatura ambiente). A caracterização *in vivo*, através da utilização da metodologia da inibição do edema em pata de rato, demonstrou uma melhora na atividade farmacológica da dexametasona associada às nanoesferas, evidenciada pela redução significativa na formação do edema, em relação ao produto comercial (Decadron<sup>®</sup>). Por outro lado, um segundo modelo utilizado na caracterização *in vivo*, a inibição da formação de tecido granulomatoso, demonstrou apenas uma tendência a uma melhora farmacológica, sem apresentar uma diferença estatisticamente significativa em relação à atividade farmacológica do produto comercial.



**CAPÍTULO 1:** Micropartículas nanorrevestidas contendo diclofenaco: Desenho experimental e avaliação da tolerância gastrointestinal

---

---



## 1.1. INTRODUÇÃO

A microencapsulação tem sido amplamente estudada nas mais diversas áreas do conhecimento (engenharia química e alimentícia, química industrial, cosmética e farmacêutica, entre outras). Dentre as técnicas utilizadas para a obtenção das micropartículas pode-se destacar a secagem por aspersão, cujas vantagens estão baseadas na preparação rápida, com baixo custo e em etapa única, fácil transposição de escala comparada a outros métodos de microencapsulação e possibilidade de emprego para substâncias termolábeis (Wan *et al.*, 1992; Conte *et al.*, 1994).

O processo de secagem por aspersão consiste em quatro etapas essenciais: 1) aspersão da amostra; 2) contato líquido-vapor aquecido; 3) evaporação 4) separação sólido-gás/vapor (Broadhead *et al.*, 1992). Assim, alguns fatores podem alterar as características do produto final, dentre eles a natureza do material a ser aspergido; velocidade de alimentação do material e a temperatura de secagem (Conte *et al.*, 1994; He *et al.*, 1999; Billon *et al.*, 2000). Aliado a isso, o avanço das diversas áreas farmacêuticas tem levado ao desenvolvimento de fármacos e medicamentos cada vez mais potentes e específicos e a utilização de doses menores de fármacos, que deve ser acompanhada da melhor compreensão dos processos e fatores de influência, para que todas as áreas, dentre elas a tecnologia de partículas, possam acompanhar esses avanços terapêuticos (Muzzio *et al.*, 2002). Neste contexto, este capítulo descreve o desenvolvimento da técnica de revestimento de micropartículas orgânico-inorgânicas, contendo, como fármaco modelo, o diclofenaco, e, como polímero formador das nanopartículas, o Eudragit S100<sup>®</sup>, com solubilidade pH-dependente.

Além disso, o presente trabalho é composto pelo estudo da influência dos parâmetros tecnológicos (fluxo de alimentação e temperatura de secagem) sobre as características das micropartículas, como forma de se obter uma otimização inicial do seu processo de obtenção. Após a caracterização e seleção das formulações, foi

avaliado o perfil de liberação *in vitro* e a potencialidade das formulações testadas em proteger a mucosa gastrintestinal frente aos efeitos tóxicos do diclofenaco.

**PUBLICAÇÃO 1:** Diclofenac-Loaded Nanoparticle-Coated  
Microparticles: Experimental Design and Gastrointestinal Tolerance  
Evaluation

Submetido ao Journal of Controlled Release

---

---



## Diclofenac-loaded Nanoparticle-coated Inorganic-Microparticles: Experimental Design and Gastrointestinal Tolerance Evaluation

R. C. R. Beck<sup>a</sup>, A. R. Pohlmann<sup>a,b</sup>, E. V. Benvenuti<sup>c</sup>, M. I. Ré<sup>d</sup>, T. Dalla Costa<sup>a</sup>, S. S. Guterres<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga, 1752, Porto Alegre, 90610-000, RS, Brazil. Telephone: 55 51 33165411, Fax: 55 51 33165437 (e-mail: nanoc@farmacia.ufrgs.br)

<sup>b</sup> Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CP 15003, Porto Alegre, 91501-970, RS, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Química Inorgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CP 15003, Porto Alegre, 91501-970, RS, Brazil

<sup>d</sup> Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S.A., Divisão de Química, CP 0141, 01064-970, São Paulo, SP, Brazil

## **Abstract**

Our previous work reported the preparation of organic-inorganic microparticles by encapsulating a drug in an inorganic core (silicon dioxide) and using polymeric colloidal systems as coating material. In this paper, we evaluated the influences of the spray-drying parameters (inlet temperature and feeding spray rate) and the type of nanoparticles (nanocapsules or nanospheres) on the characteristics of nanoparticle-coated diclofenac-loaded microparticles by using a factorial design  $3^2$ . Additionally, it was evaluated the gastrointestinal tolerance following oral administration in rats. Both factors (inlet temperature and feeding spray rate) influence the physicochemical characteristics of the nanoparticle-coated microparticles. Formulations were selected considering the best yields (60 % and 63 %, respectively), the best encapsulation efficiencies (around 100 %) and the lowest water contents (below 2.30 %). These microparticles presented surfaces completely coated by nanostructures and a decrease in the surface areas and pore volumes in relation to the uncoated core. In vitro drug release demonstrated the influence of the nanoparticle-coating on the dissolution profiles of diclofenac, according to the type of the nanoparticles. Finally, nanocapsule-coated microparticles presented a protective effect on the gastrointestinal mucosa against the toxic effects of diclofenac, suggesting this strategy is promising to develop new oral drug delivery systems.



## Introduction

Drug delivery systems are widely proposed to increase the efficacy and/or decrease the toxicity of drugs [1, 2]. Since the 1980 decade different approaches were developed considering micro- and nanoparticles as drug carriers [1, 3-5]. Microparticles can be prepared by several physical and chemical methods including solvent evaporation, spray-drying and *in situ* polymerization [1]. The spray-drying technique has been successfully employed in the preparation of microparticulate delivery systems [6-11]. This method exhibits advantages such as a rapid and one-step process, it is applicable to heat-sensitive materials and presents an easy industrial transposition [12]. Previous works reported the influence of spray-drying parameters on the microparticle characteristics [7, 13, 14]. Despite the several advantages of spray-drying technique, the control of the parameters such as inlet temperature or feeding spray rate during the process is important to avoid high moisture content or low yields of powders.

Concerning the nanoparticulated systems, in the past 15 years, polymeric nanocapsules and nanospheres were extensively studied as drug carriers (anticancers, peptides, antiinflammatories, antibiotics) [2, 5, 15-19]. According to the literature, the model for nanospheres is a matricial polymeric structure, in which drugs would be entrapped or molecularly dispersed, while the nanocapsule is a lipophilic core surrounded by a polymeric layer, in which drugs would be dissolved in the oil or dispersed within the particle [3, 20]. Additionally, the drug can be adsorbed at the interface particle/water [21].

The main disadvantages of these aqueous colloidal systems are the physico-chemical instability due to the polymer hydrolysis, the drug leakage and/or particle agglomeration and sedimentation [20]. Aiming to overcome these disadvantages, our group has developed a spray-drying technique [22, 23] and a freeze-drying process [24] to dry nanocapsule and nanosphere suspensions using silicon dioxide as drying adjuvant. The nanosphere or the

nanocapsule suspensions give differently, homogeneous and reproducible nanoparticle-coated microparticles after drying as observed by SEM [25]. In this case, drugs were encapsulated in polymeric nanoparticles [25-28]. The potential use of these systems as controlled delivery systems were demonstrated by the decrease of gastrointestinal toxicity of non-steroidal antiinflammatory drugs [28, 29].

On the other hand, hybrid organic-inorganic microparticles were also prepared by encapsulating the drug in the inorganic core (silicon dioxide) and using unloaded-polymeric colloidal systems as coating material [30]. Different formulations were prepared in order to study the influence of the diclofenac in its salt or acid forms (hydrophilic and hydrophobic models), as well as the methods employed (evaporation under reduced pressure and spray-drying) on the powder characteristics. The potential application of polymeric colloidal suspensions as nanoparticle coating of microparticles were evaluated in terms of process yields, encapsulation efficiencies, and *in vitro* drug release. When the diclofenac (sodium salt) was employed as hydrophilic model, the powders prepared in two steps (core previously prepared) showed satisfactory gastroresistance. In a similar way, the use of diclofenac (acid form) as hydrophobic model also conducted to powders presenting good gastroresistance if the triacetin is added in nanocapsule-coated formulations.

In order to optimize the process, this work reports the use of factorial designs to evaluate the influences of the spray-drying parameters (inlet temperature and feeding spray rate) and the nanoparticle type (nanocapsule or nanosphere suspension) on the characteristics of the nanoparticle-coated diclofenac-loaded inorganic microparticles. Nanoparticle-coated microparticles were characterized by process yields, encapsulation efficiencies, water contents, and microparticle sizes. Selected formulations were also characterized by morphologic analyses, *in vitro* drug release and gastrointestinal tolerance following oral administration in rats.

## Materials and methods

### Materials

Diclofenac (sodium salt) was obtained from Sigma (St. Louis, EUA); Eudragit S100<sup>®</sup> (EUD) was supplied from Almapal (São Paulo, Brazil). Caprylic/capric triglyceride mixture was delivered from Brasquim (Porto Alegre, Brazil); sorbitan monostearate (Span 60<sup>®</sup>) and polysorbate 80 (Tween 80<sup>®</sup>) were supplied by Delaware (Porto Alegre, Brazil). Colloidal silicon dioxide (Aerosil 200<sup>®</sup>) was acquired from Degussa (São Paulo, Brazil). All others chemicals and solvents presented pharmaceutical grade and were used as received.

### Preparation of Free Acid Form of Diclofenac

An aqueous solution (400 mL) of sodium diclofenac (3.0 g, 9.43 mmol) was acidified with 5 M HCl (5 mL) and the precipitate (free acid form of diclofenac) was filtered and recrystallized from ethanol/water 1:1 (v/v). Colorless crystals were obtained with 90 % of yield and characterized by infrared analysis (FT-IR 8300, Shimadzu, Tokyo, Japan).

IR ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3322 (NH), 2940 (br, OH), 1694 (CO), 1587 (C=C), 1507 and 1453 (aromatic rings), 1160 (C-O).

### Preparation and Characterization of Colloidal Suspensions

Nanocapsules (NC) and nanospheres (NS) were prepared by the nanoprecipitation method as described by Fessi and co-workers [31]. For NC preparation, the organic solution was consisted of the capric/caprylic mixture (3.3 mL), Span 60<sup>®</sup> (0.1532 g), the polymer (EUD) (1.0 g) and acetone (267.0 mL). This organic phase was added under moderate magnetic stirring to an aqueous solution (533.0 mL) containing Tween 80<sup>®</sup> (0.1532 g). The magnetic

stirring was maintained for 10 min. Thus, the acetone was eliminated and the aqueous phase concentrated by evaporation under reduced pressure to a final volume of 100 mL (10 mg.mL<sup>-1</sup> of polymer). The NS suspensions were prepared as described for NC, omitting the capric/caprilic triglyceride.

The colloidal suspensions were characterized by pH measurements (Micronal, B-474, São Paulo, Brazil) and by particle size determination using photon correlation spectroscopy (PCS) after dilution of samples (500 times) with water (Milli-Q<sup>®</sup>). The scattered light was observed at an angle of 90° (Brookhaven Instruments, goniometer BI-200M/2.0 version, Holtsville, USA; BI9863 detection system; Laser He-Ne source 35 mW, 127 model,  $\lambda = 632.8$  nm, Spectra Physics, Mountain View, USA).

#### Preparation of Microparticles

To obtain the core of the microparticles (uncoated core), 50 mL of a diclofenac (free acid) acetone solution (5.00 mg.mL<sup>-1</sup> or 0.34 mmol.L<sup>-1</sup>) were added of Aerosil 200<sup>®</sup> (1.5 g). The acetone was removed under reduced pressure to obtain a solid product. This powder (the core) was maintained in a dessiccator at room temperature for 48 h. At the coating step, this powder (1.5 g) was carefully milled in a mortar for 10 min, and dispersed into 50 mL of NS or NC aqueous suspension under magnetic stirring at room temperature. The mixture was fed into a mini-spray-dryer Büchi 190<sup>®</sup> (Flawil, Switzerland) with a two-component nozzle and co-current flow (Air flow rate: 500 NL/h; Atomizing air pressure: 2 bar). The inlet air temperature and feeding spray rate, considered as independent variables, were varied according to preliminary experiments (130, 150 and 170 °C; 3.0, 4.5 and 6.0 mL.min<sup>-1</sup>, respectively). The powders were designed MP-NS or MP-NC, according to the type of the nanoparticle suspension employed (nanosphere or nanocapsule, respectively).

A physical mixture (PM) consisted of Aerosil 200<sup>®</sup> (1.27 g) and sodium diclofenac (0.72 mmol) was prepared as control.

### Experimental Design

Tables 1 and 2 show the evaluated factors and levels in the factorial design 3<sup>2</sup>. The effects of inlet temperature and feeding spray rate on production yields, water content, encapsulation efficiency and particle size were analyzed.

### Determination of Yield and Encapsulation Efficiency

The yields of the formulations were calculated by the sum of the weights of all components, discounting the content of water from the suspensions. The powders (core and nanoparticle-coated microparticles) were dispersed in phosphate buffer pH 7.4 for 60 min, at room temperature, followed by the centrifugation of the dispersions. Then, the supernatants were appropriately diluted with mobile phase and filtered through a hydrophilic membrane (GVWP, 0.22  $\mu\text{m}$ , Millipore). The samples were analyzed by HPLC. The chromatographic system consisted of a Lichrospher<sup>®</sup> column RP 18 (250 x 4 mm, Merck, Darmstadt, Germany) and a Perkin Elmer instrument (200 Series, Shelton, EUA). The mobile phase consisted of acetonitrile/pH 5.0 phosphate buffer (60:40 % v/v) with a flow rate of 1.2 mL.min<sup>-1</sup>. The volume injected was 20  $\mu\text{L}$ . Diclofenac was detected at 280 nm. The encapsulation efficiency of each formulation was calculated by the correlation of the theoretical and the experimental diclofenac concentrations and expressed as percentages (%). The HPLC method was validated according to the following characteristics: linearity, range, precision, accuracy and specificity [32, 33]. This method is linear ( $r^2 = 1$ ) in the range of 3 to 15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , accurate ( $100.04 \pm 6.40\%$  –  $101.56 \pm 3.25\%$ ) and precise (DPR: 1.25 – 1.57 %

and 1.47 and 1.91 %, for repeatability and intermediate precision, respectively). The specificity was tested in the presence of the microparticle adjuvants and under different pH media, demonstrating that these factors did not alter the diclofenac assay.

#### Determination of Water Content

The water content was determined by the Karl-Fisher coulometric method (Mettler DL 37, Greifensee, Switzerland). Experiments were carried out in triplicate.

#### Morphological Characterization

##### *Scanning Electron Microscopy*

The uncoated core and the nanoparticle-coated microparticles were examined under scanning electron microscopy (SEM) (Jeol Scanning Microscope, JSM-5800, Tokyo, Japan) at different magnifications between 1,000x and 90,000x. Samples were analyzed after they had been gold sputtered (Jeol Jee 4B SVG-IN, Tokyo, Japan). These analyses were carried out in the Centro de Microscopia (UFRGS, Porto Alegre, Brazil).

##### *Surface Area and Pore Size Distribution*

The nitrogen adsorption-desorption isotherms of previous degassed organic-inorganic solids under vacuum at 40 °C were determined at liquid nitrogen boiling point in a home-made volumetric apparatus, using nitrogen as probe. The specific surface areas of powders were determined by the BET multipoint technique [34] and the pore size distribution was obtained using BJH method [35].

### *In Vitro* Drug Release

The *in vitro* drug release experiments were carried out using a flow-through cell technique. The apparatus consisted by recycling flow-through cells (Desaga, Wiesloch, Germany) connected to a peristaltic pump (Desaga, Wiesloch, Germany). The flow rate was 1 mL.min<sup>-1</sup>. Release experiments were carried out at 37 ± 0.5 °C, using dissolution media at pH 5.0 or pH 7.4 (phosphate buffer). An exact amount of each powder (equivalent to 6.80 x 10<sup>-3</sup> mmol of diclofenac) was placed in each cell. Samples were collected at predetermined time intervals, diluted (if necessary), and filtered through a hydrophilic membrane (GVWP, 0.22 µm, Millipore) for HPLC analyses. Experiments were carried out in triplicate.

The dissolution profiles of diclofenac from microparticles were analyzed by: a) ANOVA-based method (point to point comparison), and b) Model-dependent methods (mathematical models are showed in Table 3, MicroMath Scientist<sup>®</sup> software, Salt Lake City, USA).

### Gastrointestinal Tolerance

Experiments were carried out on male *Wistar* rats, weighing between 250 and 350 g (Biotério Central, UFRGS, Porto Alegre, Brazil). The animals were divided into groups of ten. The groups were kept in separate cages and the rats were allowed to eat and drink *ad libitum*. The diclofenac-loaded formulations and sodium diclofenac aqueous solution were given at a dose of 20 mg.kg<sup>-1</sup> by the intragastric route. The formulations were administered daily for 3 consecutive days. Twenty-four hours after the third administration the rats were decapitated following laparotomy. In order to quantify gastrointestinal lesions the stomach was opened along the greater curvature and the intestine (duodenum, jejunum and ileum) was slit open opposite the attached mesenteric tissue. The organs were washed with normal saline (0.9 % NaCl) to remove luminal contents and the mucosal surfaces were examined. Lesions were

scored for each organ according to an arbitrary scale as previously reported [36]. The mean organ lesional index was calculated for each organ in all animals of the same group and then dividing the total lesional score sum by the number of animals in each group.

### Statistical Analysis

The factorial design statistical analysis was carried out through a two-way analysis of variance. One-way analysis of variance was employed in the comparison of the experimental data obtained from the drug release studies. Post-hoc multiple comparisons were done by Tukey's test or *t* test (particle size) for significance at *p*-values less than 0.05. Statistical comparisons of the gastrointestinal lesional indexes in rats were conducted using the Kruskal-Wallis analysis of variance by rank.

## Results and Discussion

### Polymeric Colloidal Suspensions

Eudragit S100<sup>®</sup> was chosen as polymer because its gastric resistance enables it to be employed in modified release systems [37]. Nanosphere and nanocapsules aqueous suspensions prepared with Eudragit S100<sup>®</sup> were used as an organic nanostructured coating for drug-loaded inorganic microparticles. These polymeric suspensions were prepared by nanoprecipitation of polymer using capric/caprilic triglyceride mixture, as oil, in the case of nanocapsules (NC), and omitting it in the case of nanospheres (NS). The polymeric colloidal suspensions, NC and NS, presented acid pH values ( $3.61 \pm 0.05$  and  $3.60 \pm 0.01$ , respectively) and particle sizes of  $119 \pm 1$  nm and  $67 \pm 9$  nm, respectively.



Experimental design: effects of spray-drying factors on nanoparticle-coated microparticles characteristics

The core composed of diclofenac (acid) and silicon dioxide was obtained with 100 % of yield by an evaporation process, presenting an encapsulation efficiency of  $91.03 \pm 3.57$  %. The morphological analyses of the powder of the core showed irregular shaped microparticles, presenting a surface similar to the raw silicon dioxide [30].

#### *NS-coated microparticles*

The NS-coated microparticles (MP-NS) presented yields between 48 and 60 % (Table 4). The inlet temperature did not affect this parameter ( $p > 0.05$ ). On the other hand, these yields were significantly ( $p < 0.05$ ) influenced by the feeding spray rate. The highest feeding spray rate ( $6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) led to the lowest yields (MP-NS-7, MP-NS-8 and MP-NS-9). Similar results were obtained by Billon *et al.* [13] in the evaluation of the effects of the spray-drying parameters on the preparation of microparticles of sodium carboxymethylcellulose, used as polymer, which process yields were considerably increased by reducing feeding spray rate.

Concerning the encapsulation efficiencies, the values were in the range between  $88.93 \pm 3.17$  and  $104.29 \pm 2.53$  % (Table 4). These results are influenced by both parameters (feeding spray rate and inlet temperature) and by their interactions. The highest feeding spray rate ( $6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) gave the highest encapsulation efficiencies (MP-NS-7, MP-NS-8, MP-NS-9). At  $4.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  and  $6.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , the increasing of the inlet temperature caused a decrease in the encapsulation efficiency.

The particle sizes ( $d_{4,3}$ ) ranged from  $12 \mu\text{m}$  to  $22 \mu\text{m}$  (Table 4). At  $3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  and  $6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , the particle sizes raised with the increase in the inlet temperature from  $12.21 \mu\text{m}$  to  $18.20 \mu\text{m}$  and from  $12.83 \mu\text{m}$  to  $21.98 \mu\text{m}$ , respectively. Furthermore, all powders presented a water

content below 2.30 % (1.76 – 2.28 %), showing that the level values applied of temperature and feeding spray rate were able to dry the formulations.

#### *NC-coated microparticles*

The NC-coated microparticles (MP-NC) presented yields between 34 % and 63 % (Table 5). In a general rule, the yields for MP-NC series were lower than those for MP-NS series (Table 4). These results can be explained by the stronger adhesion of MP-NC powders than MP-NS powders in the drying chamber. The exception was the formulation MP-NC-3, which presented 63 % of yield (Table 5). The yields were significantly influenced ( $p < 0.05$ ) by the inlet temperature and the feeding spray rate. At 130 °C, 150 °C and 170 °C, the highest yields were obtained using the lowest feeding spray rate (3 mL.min<sup>-1</sup>) (MP-NC-1 MP-NC-2, MP-NC-3, respectively).

The encapsulation efficiencies ranged between  $105.15 \pm 3.44$  % and  $160.55 \pm 6.80$  % (Table 5). Only the formulation MP-NC-3 presented an acceptable drug recovery ( $105.15 \pm 3.44$  %). All other recoveries showed an anomalous high drug concentration in the powders after the drying process (Table 5). These values ( $114.82 \pm 3.86$  % to  $160.55 \pm 6.80$  %) could be explained by the segregation of powders due to the adhesion of part of the samples on the drying chamber. Indeed, the highest recoveries were correlated with the lowest yields (MP-NC-4, MP-NC-5, MP-NC-7, and MP-NC-8).

The inlet temperature has significantly influenced the particle sizes, which varied from 12.89  $\mu\text{m}$  to 61.67  $\mu\text{m}$  (Table 5). As a general form, the increase in the inlet temperature decreased the microparticle sizes (MP-NC-3, MP-NC-6, and MP-NC-9). Besides, all powders presented a water content below 1.50 % (1.05 – 1.48 %).

## Scanning electron microscopy

SEM analyses were conducted in order to verify the effectiveness of nanoparticle-coating.

The formulations (MP-NS series and MP-NC series) were compared with the core and with the physical mixture of raw materials (PM).

The uncoated core and the PM presented rugged surfaces with the presence of some cavities (Figure 1). In comparison, the MP-NS surfaces (Figure 2) of all formulations presented nanostructures with 60-70 nm of diameter, while for the MP-NC series only the MP-NC-3 (Figure 2) surfaces showed homogeneous coating by the presence of nanostructures about 170 – 200 nm. In general, the NC-coated microparticles presented irregularly coated particles as depicted in the Figure 3 for MP-NC-1. These results corroborate with the previous hypothesis of the segregation of powders during the spray-drying process, which was raised to explain the anomalous high drug recoveries (> 110 %) measured for formulations in the MP-NC series, excepting for MP-NC-3.

## Selection of formulations

The best formulation in each series was selected from the factorial design analysis for the subsequence experiments. In this case, the MP-NS-5 and MP-NC-3 were chosen considering the best yields (presenting the lowest standard errors), the best encapsulation efficiencies (around 100 %), and the lowest water contents (below 2 %). Furthermore, the MP-NS-5 and the MP-NC-3 formulations showed the microparticle surfaces completely and homogeneously

coated by the nanostructures (SEM). For MP-NS series, it was also considered the lowest practicable inlet temperature correlated with the highest feeding spray rate.

#### Surface area and pore size distribution

The surface area and pore size distribution were determined for MP-NS-5 and MP-NC-3, as well as for the uncoated core and commercial colloidal silicon dioxide (Table 6). The uncoated core presented a reduction in its surface area ( $163 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) in relation to the commercial colloidal silicon dioxide ( $214 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ). The pores of Aerosil 200<sup>®</sup> are resultant from the agglomeration of its primary particles [38]. In this way, the presence of the drug in these pores can explain the decrease in the surface area of the uncoated core. After coating the core using the polymeric colloidal suspensions (nanospheres or nanocapsules), it was observed an additional decreases in the surface areas and pore volumes for the formulations MP-NS-5 ( $131 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $0.15 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ ) and MP-NC-3 ( $61 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $0.04 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ ). These reductions in the surface areas and pore volumes could be explained by a supplementary reduction in the nitrogen accessibility to the pores in comparison to the uncoated core.

The pore size distributions of commercial silicon dioxide (Aerosil 200<sup>®</sup>), uncoated core and the nanoparticle-coated microparticles (MP-NS-5 and MP-NC-3) are showed in the Figure 4. For the MP-NC-3 powder, it could be observed a decrease in the mesoporous region (pore between 2 nm and 50 nm), while for the MP-NS-5, no significant variation was detected. These results could be related to the more lipophilic nature of nanocapsules than the nature of nanospheres, due to the presence of an oil core in the former.

#### *In Vitro* Drug Release

The diclofenac [ $pK_a$  3.8 at 25 °C (39)] is soluble in aqueous solutions presenting pH values higher than 6, due to the ionization of its acid function. In this way, its solubility improves with the increase of pH values.

The drug release profiles were determined *in vitro* using phosphate buffer at pH 5.0 and 7.4 (Figures 5 and 6, respectively). At pH 5.0, the uncoated core presented a diclofenac release of 17 % after 60 min, and 53% after 360 min, while from the physical mixture (PM), the drug released was 51 % after 60 min, and 101 % after 360 min. The nanoparticle-coated microparticles (MP-NS-5 and MP-NC-3) presented similar values ( $p < 0.05$ ) after 60 min (20 % and 18 %). However, after 360 min MP-NS-5 presented a drug release of 56 % and MP-NC-3 showed a value of 71 %. This difference is in agreement with our previous results, from which we can suggest that the drug is more superficially associated (around 80 %) with the particles in the case of NC-coated microparticles than in the case of uncoated core (30).

The mathematical models (Table 3) of release profiles were applied and the selection of the best model considered the correlation coefficient ( $r$ ), the model selection criteria (MSC) and the graphic adjustment.

At pH 5.0, the best fitting was the biexponential equation for the uncoated core ( $r = 0.9995$ , MSC = 6.4559), PM ( $r = 0.9992$ , MSC = 5.9779) and MP-NS-5 ( $r = 0.9997$ , MSC = 6.9108).

In these cases, the burst release observed rate constants were  $k = 0.0078 \text{ min}^{-1}$ ,  $k = 0.0337 \text{ min}^{-1}$ , and  $k = 0.0104 \text{ min}^{-1}$ , respectively. Otherwise, the slow release rate constants for the same formulations (uncoated core, PM and MP-NS-5) were  $k' = 0.0001 \text{ min}^{-1}$ ,  $k' = 0.0080 \text{ min}^{-1}$ , and  $k' = 0.0012 \text{ min}^{-1}$ , respectively. Comparing the  $k$  values determined for the uncoated core and for the MP-NS-5, which are 3 to 4 times lower than that calculated for the PM, we can suggest that an amount of drug is internalized in the microparticles of both the uncoated core and MP-NS-5. This hypothesis is reinforced by the observation of  $A$  parameters from the profiles of the uncoated core (39 %) and of the MP-NS-5 (35 %), which correspond

to the free and/or adsorbed drug percentages in the formulations. The percentage of small crystals in the PM formulation corresponds to 32 % in the mixture. Regarding the observed rate constants of the sustained phase, the drug was released from MP-NS-5 slower than from PM, but in a similar way to the uncoated core. However, the MP-NS-5 presented lower standard deviation values than the uncoated core.

On the other hand, the best fitting was the monoexponential equation for the MP-NC-3 ( $r = 0.9997$ ;  $MSC = 5.8505$ ). The release rate constant for this formulation was  $0.0035 \text{ min}^{-1}$ .

Considering the graphical adjustment, it was observed a lag time for the drug release. Thus, the Weibull model was applied to these data, furnishing a correlation coefficient of 0.9998 and a MSC of 7.2593. The calculated lag time was  $t_0 = 3.25 \text{ min}$  and the time at which 62.3 % of drug was dissolved ( $T_d$ ) was 267.60 min, describing a S-shaped release profile ( $\beta = 1.0405$ ).

At pH 7.4, the polymer is dissolved [37], promoting the prompt release of the drug from coated formulations by dissolution of the drug and/or erosion of the polymer. The drug release reached 100 % after 65 min for PM, after 80 min for MP-NS-5, and 120 min for uncoated core. On the other hand, the MP-NC-3 formulation reached 84 % of drug release after 120 min. After this time, the quantification limit (HPLC) of drug was achieved.

At pH 7.4, the best fitting was the monoexponential equation for all the formulations (uncoated core:  $r = 0.9984$ ,  $MSC = 5.1493$ ; PM:  $r = 0.9983$ ,  $MSC = 4.5028$ ; MP-NS-5:  $r = 0.9979$ ,  $MSC = 3.9371$ ; and MP-NC-3:  $r = 0.9904$ ,  $MSC = 3.1248$ ). The release constants were  $k = 0.0380 \text{ min}^{-1}$ ,  $k = 0.0497 \text{ min}^{-1}$ ,  $k = 0.0343 \text{ min}^{-1}$ , and  $k = 0.0283 \text{ min}^{-1}$ , respectively.

Comparing the observed rate constants it can be observed that the diclofenac is slower released from the uncoated core (1.31 times), MP-NS-5 (1.45 times) and MP-NC-3 (1.75 times) than from the PM. These results showed that NC-containing formulation presents a

more lipophilic nature than the other formulations. This chemical nature affected the diclofenac release from MP-NC-3.

### Gastrointestinal Tolerance

Diclofenac was chosen as model of drug because its hydrophobic characteristics, as well as gastrointestinal side-effects (irritation, ulceration and mucosal damage) [40]. These characteristics allow to design an *in vivo* experiment to evaluate the effectiveness of the polymeric nanoparticle-coating used to prepare the microparticles MP-NS-5 and MP-NC-3 (Figure 7).

All the formulations (sodium diclofenac solution, uncoated core, PM, MP-NS-5 and MP-NC-3) presented low lesional indexes for the stomach (less than 1), which did not differ significantly among the groups ( $p < 0.05$ ). These results correlate well with those reported for non-steroidal antiinflammatory drugs using the same animal model [28, 29, 36, 41].

Concerning the duodenum, few pointed ulcerations were observed and the lesional indexes were:  $3.61 \pm 2.09$  for diclofenac sodium solution,  $0.50 \pm 0.71$  for uncoated core,  $4.00 \pm 2.98$  for PM,  $6.00 \pm 4.99$  for MP-NS-5 and  $1.00 \pm 3.33$  for MP-NC-3. The uncoated core and the MP-NC-3 presented significant protective effect in duodenum when compared with the other formulations ( $p < 0.05$ ).

Lesional indexes in the jejunum were:  $49.67 \pm 33.48$  for diclofenac sodium solution,  $41.10 \pm 25.06$  for uncoated core,  $29.50 \pm 18.04$  for PM,  $40.50 \pm 28.97$  for MP-NS-5, and  $6.20 \pm 9.28$  for MP-NC-3. An important protective effect ( $p < 0.05$ ) against mucosal toxicity of diclofenac was observed for MP-NC-3. This result correlates well with that reported in our previous work for spray-dried diclofenac-loaded nanocapsules [29], in which silicon dioxide was used as drying adjuvant and the drug was nanoencapsulated. On the other hand, the uncoated core presented a different behavior in the jejunum when compared with the previous reported

formulations [29], in which silicon dioxide and diclofenac (acid or salt, with or without polysorbate 80) were used. The lack of the protective effect observed for the uncoated core could be related to the higher ratio of drug/silicon dioxide employed in the present work (0.5:3.0 % w/w) than the ratio used in the previous work (0.1:3:00 % w/w).

The highest lesional indexes were observed in the ileum:  $106.11 \pm 30.69$  for diclofenac sodium solution,  $90.80 \pm 47.49$  for uncoated core,  $79.90 \pm 36.32$  for PM,  $64.10 \pm 38.99$  for MP-NS-5,  $17.00 \pm 21.41$  for MP-NC-3. As well as observed for jejunum, only the MP-NC-3 formulation presented a significant ( $p < 0.05$ ) protective effect of the gut wall.

The total lesional indexes calculated by the sum of the partial lesional indexes were:  $156.11 \pm 48.54$  for diclofenac sodium solution,  $132.40 \pm 45.71$  for uncoated core,  $109.10 \pm 35.85$  for PM,  $110.80 \pm 35.31$  for MP-NS-5, and  $24.20 \pm 12.68$  for MP-NC-3. These values showed the significant effectiveness of MP-NC-3 to protect the gut wall from ulceration.

## **Conclusion**

The control of processing variables (inlet temperature and feeding spray rate) allowed to obtain nanosphere or nanocapsule-coated microparticles with satisfactory yields, particle sizes, encapsulation efficiencies and low water contents. The overall results from physico-chemical characterization demonstrated the morphological effectiveness of nanoparticle-coating process.

The *in vitro* drug release experiments showed the influence of the nanosphere or nanocapsule-coating on the dissolution profiles of diclofenac from microparticles.

Following oral administration in rats, for the diclofenac-loaded nanosphere-coated microparticles, even though the coating has been suggested by the physico-chemical characterization, the *in vivo* evaluation showed the failure of this system to protect the gut



wall against ulceration. On the other hand, the diclofenac-loaded nanocapsule-coated microparticles demonstrated a significant protective effect of the gastrointestinal mucosa against ulceration. The results showed the potential applicability of the NC-coated microparticles as drug delivery system.

### **Acknowledgments**

RCRB thanks CAPES for his research grant. The authors thank the financial support of FAPERGS, CNPq and Rede de Nanobiotecnologia/CNPq/MCT-Brazil.

## References

- [1] S. Benita, *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications*, Marcel Dekker, New York, USA, 1996.
- [2] P. Couvreur, C. Dubernet, and F. Puisieux, Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41(1) (1995) 2-13.
- [3] S. R. Schaffazick, L. L. de Freitas, A. R. Pohlmann, S. S. Guterres, Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos, *Quím. Nova* 26(5) (2003) 726-737.
- [4] L. Brannon-Peppas. Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery *Int. J. Pharm.* 116 (1995) 1-9.
- [5] P. Couvreur, G. Barratt, E. Fattal, P. Legrand, P., C. Vauthier. Nanocapsule Technology: A Review, *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst.* 19 (2002) 99-134.
- [6] R. Bodmeier, H. Chen, H., Preparation of biodegradable poly( $\pm$ )lactide microparticles using a spray-drying technique, *J. Pharm. Pharmacol.* 40 (1988) 754-757.
- [7] U. Conte, B. Conti, B., P. Giunchedi, L. Maggi, Spray dried polylactide microsphere preparation: influence of the technological parameters, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 20(3) (1994) 235-258.
- [8] G. F. Palmieri, P. Wehrle, A. Stamm, Evaluation of spray-drying as a method to prepare microparticles for controlled drug release, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 20(18) (1994) 2859-2879.
- [9] G. F. Palmieri, G. Bonacucina, P. Di Martino, S. Martelli, Spray-drying as a method for microparticulate controlled release systems preparation: advantages and limits. I. Water-soluble drugs, *Drug Dev. Ind. Pharm* 27(3) (2001) 195-204.
- [10] G. F. Palmieri, G. Bonacucina, P. Di Martino, S. Martelli, Gastro-resistant microspheres containing ketoprofen, *J. Microencapsulation*, 19(1) (2002) 111-119.

- [11] Y. C. Huang, C. H. Chiang, C. H., M. K. Yeh, Optimizing formulation factors in preparing chitosan microparticles by spray-drying methods, *J. Microencapsulation* 20(2) (2003) 247-260.
- [12] L. S. C. Wan, P. W. S. Heng, C. G. H. Chia, Spray drying as a process for microencapsulation and the effect of different coating polymers, *Drug Dev. Ind. Pharm* 18(9) (1992) 997-1011.
- [13] A. Billon, B. Bataille, G. Cassanas, M. Jacob, Development of spray-dried acetaminophen microparticles using experimental designs, *Int. J. Pharm.* 203 (2000) 159-168.
- [14] P. He, S. S. Davis, L. Illum, Chitosan microspheres prepared by spray drying, *Int. J. Pharm.* 187 (1999) 53-65.
- [15] M. N. V. Ravi Kumar, M. Sameti, M., C. Kneuer, A. Lamprecht, C.-M. Lehr. Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery and Gene Delivery, *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology* 9 (2004) 1-19.
- [16] L. Mu, and S. S. Feng, A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS, *J. Controlled Release* 86 (2003) 33-48.
- [17] M. H. El-Shabouri, Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin-A, *Int. J. Pharm.* 249 (2002) 101-108.
- [18] H. Lbtoutounne, J-F. Chaulet, C. Ploton, F. Falson, and F. Pirot, Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanocapsule encapsulated forma and as a digluconate, *J. Controlled Release* 82 (2002) 319-334.
- [19] S. Miyazaki, A. Takahashi, and W. Kubo, Poly n-butylcyanoacrylate (PNBCA) nanocapsules as a carrier for NSAIDs: in vitro release and in vivo skin penetration, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 6(2) (2003) 240-245.

- [20] B. Magenheimer, S. Benita, Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach, *S.T.P. Pharma Sci.* 1(4) (1991) 221-241.
- [21] A. R. Pohlmann, L. U. Soares, L. Cruz, N. Pesce da Silveira, S. S. Guterres. Alkaline Hydrolysis as a Tool to Determine the Association Form of Indomethacin in Nanocapsules Prepared with Poly( $\epsilon$ -Caprolactone). *Current Drug Delivery* 1 (2004) 103-111.
- [22] S. S. Guterres, A. R. Pohlmann, T. Dalla-Costa, V. L. Bassani, and C. R. Muller, *French Patent 0015084* (2000).
- [23] S. S. Guterres, A. R. Pohlmann, T. Dalla-Costa, V. L. Bassani, and C. R. Muller *Br INPI 9906081-7* (1999).
- [24] S. R. Schaffazick, A. R. Pohlmann, T. Dalla-Costa, S. S. Guterres. Freeze-Drying Polymeric Colloidal Suspensions: Nanocapsules, Nanospheres And Nanodispersion. A Comparative Study, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56 (2003) 501-505.
- [25] A. R. Pohlmann, V. Weiss, O. Mertins, N. Pesce da Silveira, S. S. Guterres, S. S., Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models, *Eur. J. Pharm. Sci.* 16 (2002) 305-312.
- [26] C. R. Müller, V. L. Bassani, A. R. Pohlmann, C. B. Michalowski, P. R. Petrovick, S. S. Guterres, Preparation and characterization of spray-dried polymeric nanocapsules, *Drug Dev. Ind. Pharm* 26(3) (2000) 343-347.
- [27] C. R. Müller, S. R. Schaffazick, A. R. Pohlmann, L. De Lucca Freitas, N. Pesce da Silveira, T. Dalla Costa, T., S. S. Guterres, Spray-dried diclofenac-loaded poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanocapsules and nanospheres. preparation and physicochemical characterization, *Pharmazie* 56(11) 864-867.
- [28] R. P. Raffin, E. S. Obach, G. Mezzalana, A. R. Pohlmann, S. S. Guterres, Nanocápsulas poliméricas secas contendo indometacina: estudo de formulação e de tolerância gastrointestinal em ratos, *Acta Farm. Bonaerense* 22(2) (2003) 163-172.

- [29] S. S. Guterres, C. R. Müller, A. R. Pohlmann, T. Dalla Costa, Gastro-intestinal tolerance following oral administration of spray-dried diclofenac-loaded nanocapsules and nanospheres, *S.T.P. Pharma Sci.* 11(3) (2001) 229-233.
- [30] R. C. R. Beck, A. R. Pohlmann, S. S. Guterres. Nanoparticle-coated microparticles: preparation and characterisation, *J. Microencapsulation* 21 (2004) 499-512.
- [31] H. Fessi, F. Puisieux, J.-Ph Devissaguet, Procédé de préparation des systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules, *European Patent*, 0, 274, 961, 1988.
- [32] Validation of Analytical Procedures: Methodology, ICH-Harmonised Tripartite Guideline, IFPMA, Geneva, Switzerland, 1996, pp. 1-8.
- [33] The United States Pharmacopoeia. 27 Ed., The United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, USA, 2003.
- [34] S. Brunauer, P. H. Emmet, and E. Teller, Adsorption of gases in multimolecular layers, *J. Am. Chem. Soc.* 60 (1938) 309-319.
- [35] E. P. Barret, L. G. Joyner, and P. P. Halenda, The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms, *J. Am. Chem. Soc.* 73 (1951) 373-380.
- [36] N. Ammoury, M. Dubrasquet, H. Fessi, J.-Ph. Devissaguet, F. Puisieux, S. Benita, Indomethacin-loaded poly (d,l-lactide) nanocapsules: protection from gastrointestinal ulcerations and anti-inflammatory activity evaluation in rats, *Clinical Materials* 13 (1993) 121-130.
- [37] A. Lamprecht, H. Yamamoto, H. Takeuchi, Y. Kawashima. Design of pH-sensitive microspheres for the colonic delivery of the immunosuppressive drug tacrolimus, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58 (2004) 37-43.

- [38] A. H. Kibbe. Handbook of pharmaceutical excipients, Pharmaceutical Press, London, England, 2000.
- [39] A. Chiarini, A. Tartarini, A., A. Fini, pH-solubility relationship and partition coefficients for some anti-inflammatory arylaliphatic acids, Arch. Pharm. 317 (1984) 268-273.
- [40] J. W. Fara, R. E. Myrback, Formulation and dosage form design in drug-induced irritation of the gastrointestinal tract, Pharm. Res. 7(1990) 616-620.
- [41] S. S. Guterres, H. Fessi, G. Barrat, F. Puisieux, J.-Ph. Devissaguet, Poly(d,l-lactide) nanocapsules containing non-steroidal anti-inflammatory drugs: gastrointestinal tolerance following intravenous and oral administration, Pharm. Res. 12 (1995) 1-3.

## Figure Captions

Figure 1. SEM micrographs (width: 1.39  $\mu\text{m}$ ) of (A) uncoated core and (B) physical mixture of raw materials.

Figure 2. SEM micrographs (width: 1.39  $\mu\text{m}$ ) of (A) nanosphere-coated microparticle (MP-NS-5) and (B) nanocapsule-coated microparticle (MP-NC-3).

Figure 3. SEM micrographs of NC-coated microparticles at different magnifications: (A) particles from the sample of MP-NC-1 (width = 18.90  $\mu\text{m}$ ); (A1) and (A2) particles in detail from A (width = 2.93  $\mu\text{m}$ ).

Figure 4. Pore size distribution of Aerosil 200<sup>®</sup>, uncoated-core, NS-coated microparticles (MP-NS-5) and NC-coated microparticles (MP-NC-3) obtained by BJH method.

Figure 5. Diclofenac release profiles at phosphate buffer pH 5.0 from the uncoated core, physical mixture (PM), NS-coated microparticles (MP-NS-5), and NC-coated microparticles (MP-NC-3).

Figure 6. Diclofenac release profiles at phosphate buffer pH 7.4 from the uncoated core, physical mixture (PM), NS-coated microparticles (MP-NS-5), and NC-coated microparticles (MP-NC-3).

Figure 7. Mean organ lesional indexes following three consecutive daily doses of 20  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  of diclofenac sodium solution (DicONa solution), uncoated core, physical mixture (PM), NS-coated microparticles (MP-NS-5), and NC-coated microparticles (MP-NC-3).

Table 1. Matrix of experiments of the  $3^2$  factorial design.

Formulation	Factors	
	Inlet air temperature (°C) (A)	Spray rate feed (mL.min <sup>-1</sup> ) (B)
1: a <sub>0</sub> b <sub>0</sub>	0	0
2: a <sub>1</sub> b <sub>0</sub>	1	0
3: a <sub>2</sub> b <sub>0</sub>	2	0
4: a <sub>0</sub> b <sub>1</sub>	0	1
5: a <sub>1</sub> b <sub>1</sub>	1	1
6: a <sub>2</sub> b <sub>1</sub>	2	1
7: a <sub>0</sub> b <sub>2</sub>	0	2
8: a <sub>1</sub> b <sub>2</sub>	1	2
9: a <sub>2</sub> b <sub>2</sub>	2	2



Table 2. Factors and levels available in the factorial design.

Factors	Levels
A: Inlet air temperature (°C)	(0) 130
	(1) 150
	(2) 170
B: Spray rate feed (mL.min <sup>-1</sup> )	(0) 3.0
	(1) 4.5
	(2) 6.0

Table 3. Categories of employed methods to compare the dissolution profiles.

Approach	Method	Equation <sup>a,b,c</sup>
ANOVA-based method	Multiple univariate ANOVA	----
Model-dependent	Zero-order	% diss = $kt$
	First-order	% diss = $100(1-e^{-kt})$
	Biexponential	% diss = $100[1-(A.e^{-k.t} + B.e^{-k'.t})]$
	Weibull	% diss = $100 [1-e^{-(t/T_d)^\beta}]$

<sup>a</sup> % diss: percentage dissolved at time t.

<sup>b</sup> k and k': dissolution rate constants.

<sup>c</sup> T<sub>d</sub>: time at which 63.2% of the material is dissolved; β: shape parameter.

Table 4. Yields, encapsulation efficiencies, particle sizes and water content for the NS-nanocoated microparticles (MP-NS).

Formulation	Yield (% $\pm$ SD)	Encapsulation efficiency (% $\pm$ SD)	Particle size ( $\mu\text{m}$ ) $d_{4.3}$ ( $d_{0.1} - d_{0.9}$ )	Water content (% $\pm$ SD)
MP-NS-1	53 $\pm$ 3 <sup>a,b,c</sup>	89.01 $\pm$ 3.21 <sup>a</sup>	12.21 (1.56 – 33.67)	1.87 $\pm$ 0.08
MP-NS-2	52 $\pm$ 4 <sup>a,b,c</sup>	101.50 $\pm$ 7.02 <sup>c</sup>	16.44 (1.49 – 46.77)	2.09 $\pm$ 0.10
MP-NS-3	58 $\pm$ 5 <sup>b,c</sup>	91.21 $\pm$ 2.08 <sup>a,b</sup>	18.20 (1.58 – 52.25)	2.04 $\pm$ 0.11
MP-NS-4	57 $\pm$ 5 <sup>b,c</sup>	99.37 $\pm$ 5.42 <sup>c</sup>	15.87 (1.49 – 45.46)	2.02 $\pm$ 0.01
MP-NS-5	60 $\pm$ 2 <sup>c</sup>	98.64 $\pm$ 2.31 <sup>b,c</sup>	14.73 (1.54 – 41.97)	1.85 $\pm$ 0.13
MP-NS-6	55 $\pm$ 3 <sup>b,c</sup>	88.93 $\pm$ 3.17 <sup>a</sup>	15.41 (1.40 – 43.14)	2.18 $\pm$ 0.19
MP-NS-7	48 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	102.16 $\pm$ 2.41 <sup>c</sup>	12.83 (1.40 – 36.88)	2.16 $\pm$ 0.01
MP-NS-8	49 $\pm$ 6 <sup>a,b</sup>	104.29 $\pm$ 2.53 <sup>c</sup>	15.44 (1.38 – 45.63)	2.12 $\pm$ 0.14
MP-NS-9	50 $\pm$ 4 <sup>a,b</sup>	99.72 $\pm$ 3.44 <sup>c</sup>	21.98 (1.61 – 60.74)	2.15 $\pm$ 0.09

Means, in column, with the same letter are not significantly different (ANOVA, Tukey test).

Table 5. Yields, encapsulation efficiencies, particle sizes and water content for the NC-nanocoated microparticles (MP-NC).

Formulation	Yield (% ± SD)	Encapsulation efficiency (% ± SD)	Particle size (µm) d <sub>4.3</sub> (d <sub>0.1</sub> – d <sub>0.9</sub> )	Water content (% ± SD)
MP-NC-1	54 ± 11 <sup>b</sup>	119.69 ± 16.43 <sup>a,b</sup>	23.44 (1.49 – 60.47) <sup>b</sup>	1.48 ± 0.20
MP-NC-2	44 ± 8 <sup>a</sup>	142.05 ± 30.27 <sup>b,c</sup>	49.35 (5.20 – 113.20) <sup>b</sup>	1.05 ± 0.03
MP-NC-3	63 ± 7 <sup>b</sup>	105.15 ± 3.44 <sup>a</sup>	12.89 (1.18 – 34.63) <sup>a</sup>	1.11 ± 0.03
MP-NC-4	34 ± 6 <sup>a</sup>	160.55 ± 6.80 <sup>c</sup>	53.56 (8.85 – 115.40) <sup>b</sup>	1.10 ± 0.02
MP-NC-5	34 ± 6 <sup>a</sup>	142.98 ± 21.05 <sup>b,c</sup>	53.88 (5.36 – 120.10) <sup>b</sup>	1.08 ± 0.02
MP-NC-6	47 ± 5 <sup>a</sup>	114.82 ± 3.86 <sup>a,b</sup>	17.30 (1.24 – 46.08) <sup>a</sup>	1.11 ± 0.10
MP-NC-7	34 ± 8 <sup>a</sup>	136.23 ± 11.29 <sup>b,c</sup>	61.67 (9.20 – 129.80) <sup>b</sup>	1.15 ± 0.08
MP-NC-8	34 ± 2 <sup>a</sup>	150.58 ± 2.34 <sup>c</sup>	50.66 (6.08 – 112.30) <sup>b</sup>	1.06 ± 0.05
MP-NC-9	37 ± 8 <sup>a</sup>	126.27 ± 4.78 <sup>a,b</sup>	27.62 (1.77 – 69.44) <sup>b</sup>	1.06 ± 4.96

Means, in line, with the same letter are not significantly different (ANOVA, Tukey test).

Table 6. Superficial area and pore volume of commercial silicon dioxide (Aerosil 200<sup>®</sup>), uncoated-core, and selected nanoparticle-coated microparticles (MP-NS-5 and MP-NC-3).

Formulation	Superficial area (m <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup> )	Pore volume (cm <sup>3</sup> .g <sup>-1</sup> )
Aerosil 200 <sup>®</sup>	214	0.31
Uncoated core	163	0.25
MP-NS-5	131	0.15
MP-NC-3	61	0.04

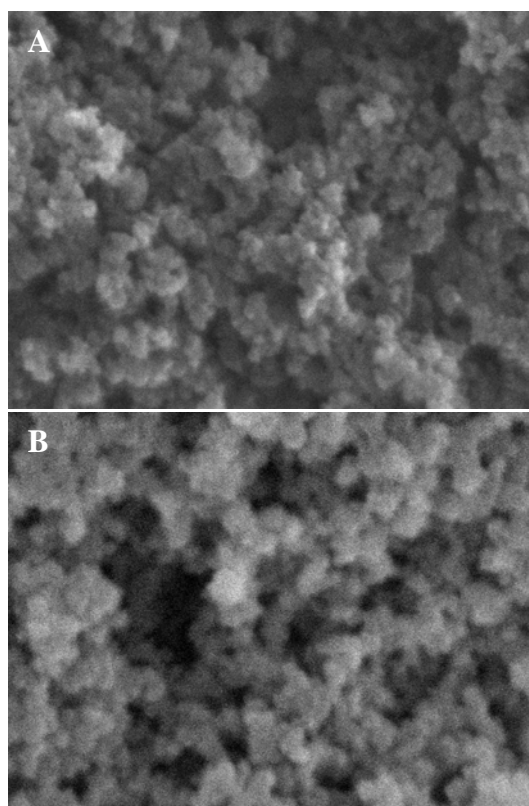


Figure 1. SEM micrographs (width: 1.39  $\mu\text{m}$ ) of (A) uncoated core and (B) physical mixture of raw materials.

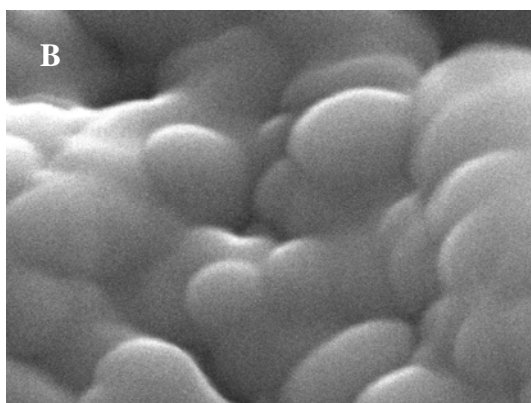
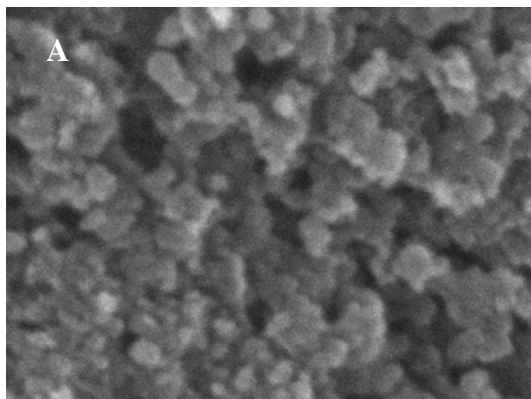


Figure 2. SEM micrographs (width: 1.39  $\mu\text{m}$ ) of (A) nanosphere-coated microparticle (MP-NS-5) and (B) nanocapsule-coated microparticle (MP-NC-3).

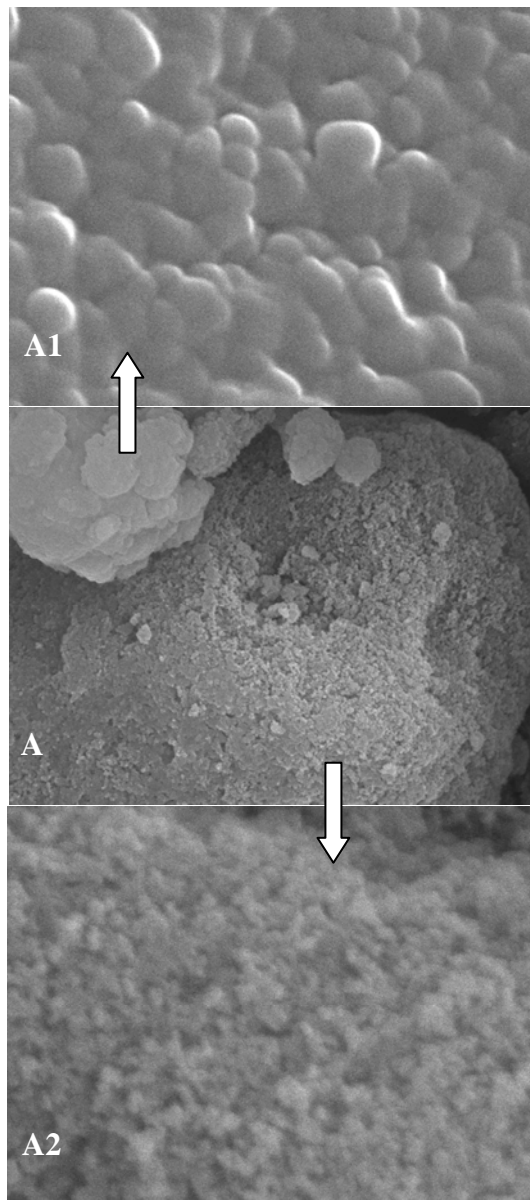


Figure 3. SEM micrographs of NC-coated microparticles at different magnifications: (A) particles from the sample of MP-NC-1 (width = 18.90  $\mu\text{m}$ ); (A1) and (A2) particles in detail from A (width = 2.93  $\mu\text{m}$ ).



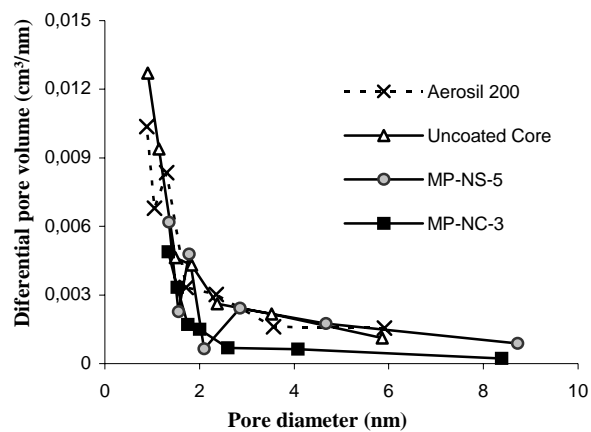


Figure 4. Pore size distribution of Aerosil 200<sup>®</sup>, uncoated-core, NS-coated microparticles (MP-NS-5) and NC-coated microparticles (MP-NC-3) obtained by BJH method.

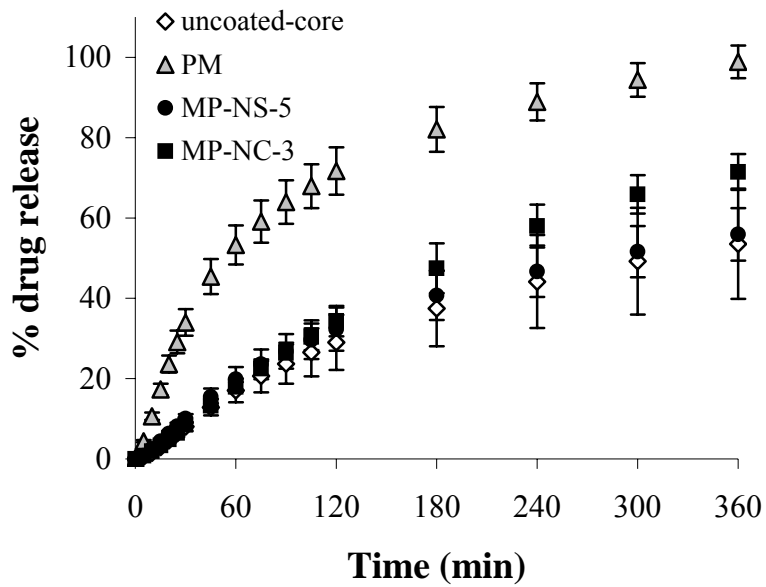


Figure 5. Diclofenac release profiles at phosphate buffer pH 5.0 from the uncoated core, physical mixture (PM), NS-coated microparticles (MP-NS-5), and NC-coated microparticles (MP-NC-3).

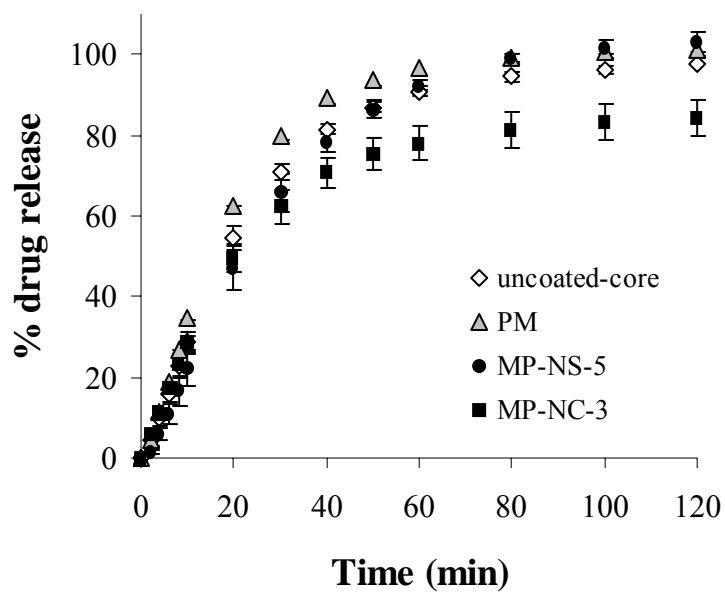


Figure 6. Diclofenac release profiles at phosphate buffer pH 7.4 from the uncoated core, physical mixture (PM), NS-coated microparticles (MP-NS-5), and NC-coated microparticles (MP-NC-3).

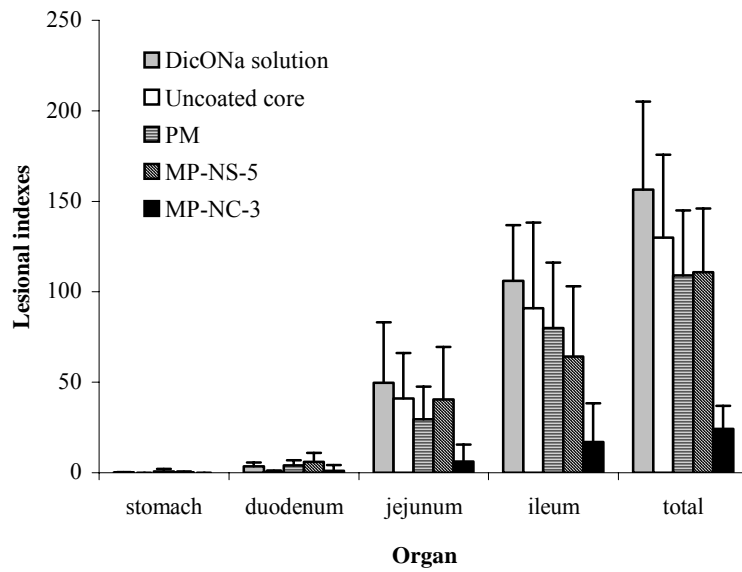


Figure 7. Mean organ lesional indexes following three consecutive daily doses of  $20 \text{ mg.kg}^{-1}$  of diclofenac sodium solution (DicONa solution), uncoated core, physical mixture (PM), NS-coated microparticles (MP-NS-5), and NC-coated microparticles (MP-NC-3).

## **CAPÍTULO 2: Micropartículas nanorrevestidas: Preparação e caracterização**

---

---



## **2.1. INTRODUÇÃO**

No capítulo anterior, foi demonstrada a capacidade de preparação de micropartículas a partir de nanopartículas poliméricas, utilizando o diclofenaco como fármaco modelo e a sua potencialidade na obtenção de sistemas de liberação modificada, assim como na proteção frente à toxicidade gastrointestinal do fármaco.

Na continuidade dos estudos, neste capítulo foi avaliada a possibilidade de utilização desta técnica na preparação das micropartículas nanorrevestidas contendo fármacos hidrofílico ou lipofílico. Para tanto, o diclofenaco foi empregado na sua forma ácida (diclofenaco ácido) ou na sua forma de sal sódico (diclofenaco sódico), como fármacos modelos. A escolha destes modelos foi baseada na estratégia de utilização de substâncias com diferentes características de solubilidade, porém apresentando a mesma estrutura química (esqueleto) fundamental.

Ainda, foi avaliado o emprego da triacetina, um plastificante utilizado no revestimento de formas farmacêuticas sólidas (Kibbe, 2000), sobre as características das micropartículas obtidas.





**PUBLICAÇÃO 2:** Nanoparticle coated microparticles: preparation and characterisation

Publicado no Journal of Microencapsulation

---



## Nanoparticle-coated microparticles: preparation and characterization

R. C. R. BECK†, A. R. POHLMANN‡ and S. S. GUTERRES†\*

†Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia; ‡Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 1752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

(Received 11 July 2003; accepted 10 March 2004)

The objective of the present work was to design and prepare new nanoparticle-coated drug-loaded inorganic microparticles by spray-drying using diclofenac as drug model. Previous works presented the process to dry drug-loaded polymeric nanoparticles using silicon dioxide as adjuvant, otherwise in the present proposition the drug is associated with the silicon dioxide and unloaded polymeric nanocapsule or nanosphere suspensions were used as organic coating. Eudragit S100® was chosen because of its gastric resistance. The potential application of polymeric colloidal suspensions as nanocoating for microparticles were evaluated in terms of process yields, encapsulation efficiencies, morphologic analyses and *in vitro* drug release profiles in buffered media (pH 1.2; 5.0 and 7.4). The results showed the technological feasibility of preparing controlled nanoparticle-coated drug-loaded inorganic microparticles. When the diclofenac was employed as a hydrophilic model, in this salt form, the powders prepared in two steps (core previously prepared) showed an adequate gastroresistance by the use of Eudragit S100®. The use of diclofenac as a hydrophobic model (acid form) conducted to powders presenting good gastroresistance when the nanocapsules and triacetin were employed.

**Keywords:** Microparticles, spray-drying, diclofenac, scanning electron microscopy, nanoparticles, coating, gastroresistance.

### Introduction

Microparticles are generally composed by polymeric materials and could be prepared by several physical and chemical methods reported in the literature (Benita 1996). Among these reported methods, the spray-drying technique has been successfully employed in the preparation of microparticulate delivery systems (Bodmeier and Chen, 1988, Conte *et al.* 1994, Palmieri *et al.* 1994, 2001, 2002, Huang *et al.* 2003). This method exhibits advantages such as a rapid and one step process, it is applicable to heat-sensitive materials and presents an easy industrial transposition (Wan *et al.* 1992). Despite the more complex and onerous production of the multiple-unit drug delivery systems, they present several advantages in relation to the single-unit systems. The former present advantages over the latter, including ready distribution on a large surface area, more constant plasma levels, higher accuracy in reproducibility dose-by-dose, less decrease in bioavailability

\* To whom correspondence should be addressed. e-mail: nanoc@farmacia.ufrgs.br

and minor risk of toxicity due to the dose dumping (Lin and Kao 1991, Kawashima *et al.* 1993).

Nanoparticles are polymeric colloidal systems that have been widely studied with the purpose of drug targeting and controlled delivery systems (Ammoury *et al.* 1993, Guterres *et al.* 1995a, b, Skiba *et al.* 1995). However, these aqueous colloidal suspensions presented some disadvantages during storage, such as microbiological contamination, polymer hydrolysis and physico-chemical instability due to the particle agglomeration and sedimentation (Magenheim and Benita 1991). So, the previous work reported the use of spray-drying technique to obtain oral solid forms containing diclofenac-loaded nanoparticles, using colloidal silicon dioxide (Aerosil 200®) as drying adjuvant (Müller *et al.* 2000). The scanning electron microscopy analysis of spray-dried powders showed spherical microparticles, which presented nanoparticles on their surface. The powders obtained from the nanocapsule suspensions showed nanostructures, adsorbed on the microparticles, with similar particle sizes (~200 nm) than those determined in the suspensions before dehydration process. On the other hand, the micro-powders prepared from the nanosphere suspensions presented nanostructures with particle sizes ~90 nm (Müller *et al.* 2001, Pohlmann *et al.* 2002). After oral administration in rats, the diclofenac-loaded nanocapsule spray-dried powders dispersed in water were valuable for reducing the gastrointestinal irritant effect of the drug (Guterres *et al.* 2001). In parallel, a pharmacokinetic study in rats was conducted, showing a complete oral absorption of the diclofenac from spray-dried powders dispersed in water. The diclofenac profiles were different when sodium salt solution or nanocapsule spray-dried powders were administered. For the nanocapsule spray-dried powder, it was observed a lower peak concentration and a prolonged elimination half-life (Guterres *et al.* 2001).

Moreover, these studies showed the different behaviour of polymeric nanocapsules and nanospheres in the preparation of these organic-inorganic microparticles (Guterres *et al.* 2001, Müller *et al.* 2001, Pohlmann *et al.* 2002). The previous results allowed the knowledge for the design of homogeneous nanocoating surfaces. The morphologic control of the micro-powder coating is determined by the use of polymeric spheres or vesicular nanoparticles. The nanosphere suspension (polymeric matrix) or the nanocapsule suspension (vesicular nanostructure) lead to microparticles presenting different and homogeneous nanocoating after the drying process.

Regarding the chemical nature of some non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) molecules (indomethacin, diclofenac, ibuprofen and others) and silicon dioxide, the drugs in their hydrophobic form present a carboxylic acid moiety that can interact with hydroxylic groups on the surface of silicon dioxide (Watanabe *et al.* 2001) by hydrogen bonds and the corresponding hydrophilic forms present a carboxylate group, which can interact with the silicon dioxide surface by ion-dipole forces. The use of diclofenac, acid or salt forms (figure 1) as molecular models to investigate the potential application of those nanoparticle coated microparticles is appropriate due to the possibility of minimizing the influence of the structural differences of the drug models, in relation to other approaches that use hydrophilic and hydrophobic models which present different skeletons.

In this way, the objective of the present work was to design and prepare new nanoparticle-coated drug-loaded inorganic microparticles by spray-drying using diclofenac as drug model. Polymeric nanocapsule or nanosphere suspensions were

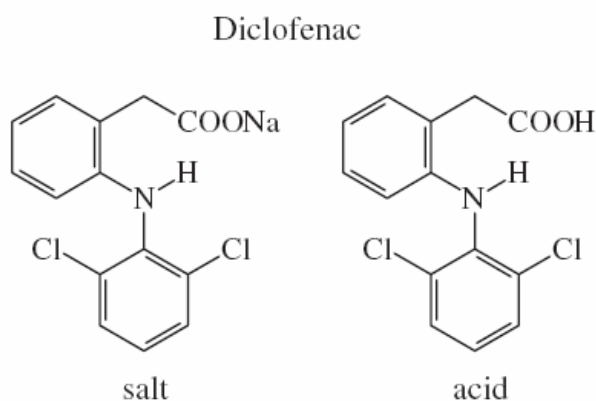


Figure 1. Chemical structure of diclofenac (salt and acid forms).

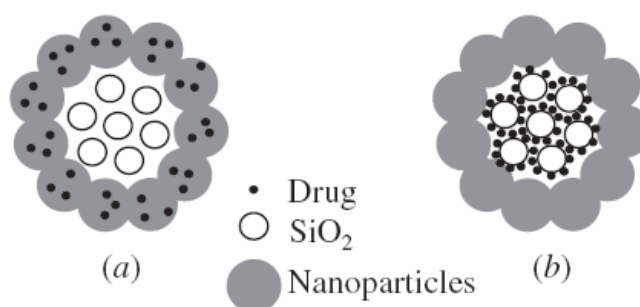


Figure 2. Schematic model of microparticles; (a) the drug is associated with polymeric nanoparticles and (b) the drug is associated with inorganic core (Aerosil 200<sup>®</sup>).

used as organic coating of diclofenac-loaded silicon dioxide core. Figure 2 illustrates: (a) the previous approach in which the drug was associated with polymeric nanoparticles and (b) the present proposition in which the drug is associated with the silicon dioxide. Eudragit S100<sup>®</sup> was chosen because of its gastric resistance, which enables this polymer to be employed when gastric protection is required (Kibbe 2000). The potential application of polymeric colloidal suspensions as nanoparticle coating for microparticles were evaluated in terms of process yields, encapsulation efficiencies, morphologic analyses and *in vitro* drug release profiles in buffered media (pH 1.2; 5.0 and 7.4).

## Materials and methods

### Materials

Diclofenac (sodium salt) was obtained from Sigma (St. Louis, USA); Eudragit S100<sup>®</sup> (EUD) and poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL, Mw = 60 000) were supplied from Almapal (São Paulo, Brazil) and from Aldrich (Strasbourg, France), respectively. Caprylic/capric triglyceride (Miglyol 810<sup>®</sup>) was delivered from Huls (Puteaux, France); sorbitan monostearate (Span 60<sup>®</sup>) and polysorbate 80 (Tween 80<sup>®</sup>) were supplied by Delaware (Porto Alegre, Brazil). The phospholipid mixture (Epikuron 170<sup>®</sup>) was obtained from Lucas Meyer (Hamburg, Germany). Colloidal silicon dioxide (Aerosil 200<sup>®</sup>) was acquired from Degussa (São Paulo, Brazil). All other chemicals and solvents used were pharmaceutical grade and used as received.

### Methods

*Preparation of free acid form of diclofenac.* An aqueous solution (400 ml) of sodium diclofenac (3.0 g, 9.43 mmol) was acidified with 5 M HCl (5 ml) and the precipitate (free acid form of diclofenac) was filtered and recrystallized from ethanol/water 1:1 (v/v). Colourless crystals were obtained with 90% of yield and characterized by infrared analysis (FT-IR 8300, Shimadzu, Tokyo, Japan). IR ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3322 (NH), 2940 (br, OH), 1694 (CO), 1587 (C=C), 1507 and 1453 (Ar), 1160 (C-O).

*Preparation and characterization of nanoparticle suspensions.* Nanocapsules (NC) and nanospheres (NS) from Eudragit S100<sup>®</sup> (EUD) or poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) were prepared as described by Fessi *et al.* (1988). For NC preparation, the lipophilic solution consisted of Miglyol 810<sup>®</sup> (3.3 ml), Span 60<sup>®</sup> or Epikuron 170<sup>®</sup> (0.1532 g), the polymer (PCL or EUD) (1.0 g) and acetone (267.0 ml). The organic phase was added under moderate magnetic stirring to an aqueous solution (533.0 ml) containing Tween 80<sup>®</sup> (0.1532 g). The magnetic stirring was maintained during 10 min. Thus, the acetone was eliminated and the aqueous phase concentrated by evaporation under reduced pressure, then the final volume was adjusted to 100 ml, corresponding to a polymer concentration of  $10 \text{ mg ml}^{-1}$ . The NS suspensions were prepared as described above for NC, omitting the Miglyol 810<sup>®</sup>. The PCL nanocapsule suspension was prepared as described above replacing the Span 60<sup>®</sup> by the Epikuron 170<sup>®</sup> (0.1532 g) due to the agglomeration and precipitation of the particles when the former surfactant was employed at  $1.532 \text{ mg ml}^{-1}$  in the formulation. The colloidal suspensions were characterized by pH measurements (Micronal, B-474, São Paulo, Brazil) and by particle size determination by photon correlation spectroscopy (PCS) after dilution of 500-times with water (Milli-Q<sup>®</sup>), observing the scattered light at an angle of  $90^\circ$  (goniometer BI-200M/2.0 version, Brookhaven Instruments, Holtsville, USA; BI9863 detection system; Laser He-Ne source 35 mW, 127 model,  $\lambda = 632.8 \text{ nm}$ , Spectra Physics, Mountain View, USA).

### Preparation of the microparticles

#### Hydrophilic drug-loaded microparticles.

- *Preparation of the nanoparticle coated microparticles in one step.* Sodium diclofenac (0.230 g, 0.723 mmol) and silicon dioxide (1.270 g) were added into the polymeric aqueous colloidal suspension (NC or NS) (50 ml) under magnetic stirring at room temperature. The mixture was fed into a mini-spray-dryer Büchi 190<sup>®</sup> (Flawil, Switzerland), operating in the conditions described in table 1.
- *Preparation of the nanoparticle coated microparticles in two steps.* To obtain the core of the microparticles, 50 ml of sodium diclofenac aqueous solution ( $5.43 \text{ mg ml}^{-1}$  or 17 mM) were added of the Aerosil 200<sup>®</sup> (1.500 g). The mixture was fed into a mini-spray-dryer Büchi 190<sup>®</sup> (Flawil, Switzerland), using the operational conditions described in table 1, to give a powder (the core). At the coating step, the core material (1.5 g) was rapidly dispersed into 50 ml of the nanoparticle aqueous suspension (NC or NS) under magnetic stirring at room temperature. This mixture was spray-dried as described in table 1.

Table 1. Operational conditions to prepare nanocoating microparticles using a Mini Spray-Dryer Büchi 190<sup>®</sup> equipment.

Parameter	Condition
Feed rate	3.0 mL min <sup>-1</sup>
Air flow rate	500 NL h <sup>-1</sup>
Atomizing air pressure	200 kPa
Inlet temperature	170 ± 4 °C
Outlet temperature	110 ± 4 °C
Nozzle diameter	0.7 mm

*Hydrophobic drug-loaded microparticles.* To obtain the core of the microparticles, 50 ml of diclofenac (free acid) acetone solution (5.00 mg ml<sup>-1</sup> or 17 mM) were added of the Aerosil 200<sup>®</sup> (1.5 g). The acetone was removed under reduced pressure to obtain a solid product. This powder (the core) was maintained in a desiccator at room temperature during 48 h. At the coating step, the core material (1.5 g) was carefully milled by a mortar and pestle and dispersed into 50 ml of the nanoparticle aqueous suspension under magnetic stirring at room temperature. The mixture was fed into a mini-spray-dryer Büchi 190<sup>®</sup> (Flawil, Switzerland), using the operational conditions described in table 1.

These formulations were also prepared using triacetin. The triacetin (20% (w/w) in relation to the polymer) was added into the nanoparticle suspensions (NC or NS), followed by the addition of the core under magnetic stirring. After 10 min, each mixture was spray-dried.

*Determination of yield and encapsulation efficiency.* The yields of the formulations were calculated by the sum of the weights of all components, discounting the content of water in the suspension. The powders (cores and nanoparticle coated microparticles) were dispersed in acetonitrile or buffer pH 7.4 (hydrophobic or hydrophilic microparticles, respectively) during 60 min at room temperature, the dispersions were filtered through a hydrophilic membrane (GVWP, 0.22 µm, Millipore) and analysed by HPLC. The chromatographic system consisted of a Nova Pak<sup>®</sup> RP 18–Waters column and a Perkin Elmer instrument (200 Series, Shelton, EUA). The mobile phase consisted of acetonitrile/pH 5.0 phosphate buffer (50:50% v/v) with a flow rate of 1 ml min<sup>-1</sup>. The volume injected was 20 µL. Diclofenac was detected at 280 nm. The encapsulation efficiency of each formulation was calculated by the correlation of the theoretical and the experimental diclofenac concentrations and expressed as percentage.

#### *Morphological analysis*

The uncoated cores and the nanoparticle coated microparticles were examined under scanning electron microscopy (SEM) (Jeol Scanning Microscope, JSM-5800, Tokyo, Japan), at different magnifications between 1000–90 000 times. Samples were analysed after they had been gold sputtered (Jeol Jee 4B SVG-IN, Tokyo, Japan).

### In vitro drug release studies

An exact amount of each powder (equivalent to 0.017 mmol of diclofenac) was added in 100 ml of three different release media: phosphate buffer pH 1.2, pH 5.0 and pH 7.4. The experiments were carried out at  $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$  under constant magnetic stirring (Tuncay *et al.* 2000, Giunchedi *et al.* 2001). Samples were withdrawn at pre-determined time intervals (5, 15, 30 and 60 min) and replaced by an equal volume of dissolution medium. The collected samples were centrifuged (3000 rpm, 10 min) and the supernatant (1 ml) was diluted appropriately with the mobile phase and filtered through a hydrophilic membrane (GVWP, 0.22  $\mu\text{m}$ , Millipore) and assayed by HPLC according to the method described above.

In order to investigate the morphology of the powder during the release experiment, the sediments obtained after centrifugation were treated and examined by SEM, as described below. The samples collected at 5 and 60 min from the medium buffered at pH 7.4 were centrifuged (3000 rpm, 10 min) and the correspondent sediments were kept in desiccator for 72 h at room temperature. Afterwards, these samples were examined under SEM, as described above. In parallel, similar experiments using water as dissolution medium were carried out.

## Results and discussion

### Colloidal suspensions

The polymeric nanoparticle aqueous suspensions were used as organic nanostructured coating for drug-loaded inorganic microparticles. The polymeric colloidal suspensions were prepared by nanoprecipitation of Eudragit S100<sup>®</sup>, using Miglyol 810<sup>®</sup> as oil phase in the case of nanocapsules (NC) and omitting it in the case of nanospheres (NS). The polymeric colloidal suspensions, NC and NS, presented acid pH values ( $3.71 \pm 0.03$  and  $3.60 \pm 0.01$ , respectively), and the particle sizes of  $119 \pm 1$  nm and  $67 \pm 9$  nm, respectively.

### Hydrophilic drug-loaded microparticles

The sodium diclofenac-loaded nanoparticle-coated microparticles, prepared in one step by the addition of the drug and silicon dioxide into the polymeric nanoparticle suspensions, presented yields of 70% when nanocapsules were used as coating material and 65% when nanospheres were employed as coating (table 2,

Table 2. Spray-dried hydrophilic and hydrophobic drug-loaded nanoparticle-coated microparticles, characteristics, yields and encapsulation efficiencies.

Entry	Formulation	Drug	Yield (%)	Encapsulation efficiency (%), $M \pm SD$
1	NC-MP-1 (one step)	Salt	70	$95.78 \pm 3.68$
2	NS-MP-1 (one step)	Salt	65	$82.16 \pm 2.58$
3	NC-MP-2 (two steps)	Salt	76	$79.15 \pm 0.15$
4	NS-MP-2 (two steps)	Salt	70	$80.26 \pm 0.16$
5	NC-MP	Free acid	41	$98.01 \pm 1.86$
6	NS-MP	Free acid	61	$93.14 \pm 5.60$
7	NC-triacetin-MP	Free acid	51	$111.29 \pm 10.01$
8	NS-triacetin-MP	Free acid	40	$76.57 \pm 0.52$



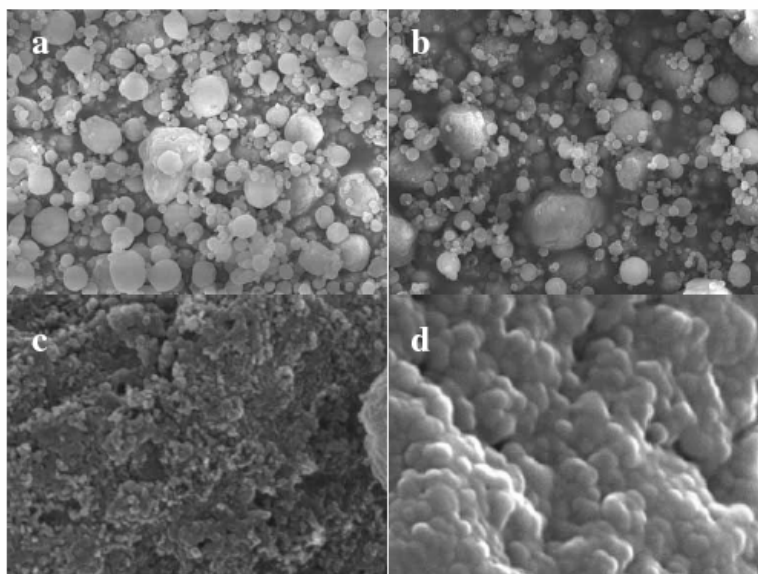


Figure 3. SEM micrographs of hydrophilic drug-loaded nanoparticle coated microparticles prepared in one step using nanospheres, (a) width = 132  $\mu\text{m}$  and (c) 2.93  $\mu\text{m}$ , and using nanocapsules, (b) width = 132  $\mu\text{m}$  and (d) 2.93  $\mu\text{m}$ .

entries 1 and 2). The encapsulation efficiencies were  $95.78 \pm 3.68\%$  (NC-MP-1) and  $82.16 \pm 2.58\%$  (NS-MP-1).

The morphological analyses of these powders (figure 3) showed spherical shaped microparticles for both formulations, sodium diclofenac-loaded NC-MP-1 and sodium diclofenac-loaded NS-MP-1. At a higher magnification, the corresponding microparticle surfaces presented nanostructures with 170–200 nm (NC-microparticles) and 60–70 nm (NS-microparticles).

The release experiments were conducted at pH 1.2, 5.0 and 7.4 using buffered media. To evaluate the effectiveness of coating for these systems and the time required to the establishment of the diclofenac acid-base equilibrium, a powder composed only by the sodium diclofenac and the silicon dioxide was prepared by spray-drying. The sodium diclofenac-loaded inorganic microparticles were obtained with 72% of yield. The encapsulation efficiency (by drug adsorption) was  $83.26 \pm 2.63\%$  and the morphological analysis showed spherical shaped microparticles presenting the surface similar to silicon dioxide raw material. This powder (core-DicONa) presented  $3.47 \pm 2.02\%$  of drug released in pH 1.2 after 5 min, remaining constant for the 60 min of experiment (figure 4). On the other hand, at pH 5.0 the acid-base equilibrium of diclofenac was achieved after 15 min presenting a drug release of  $41.87 \pm 0.84\%$ , which remained constant for 60 min. This equilibrium was achieved after 5 min of experiment in pH 7.4, releasing  $104.46 \pm 4.80\%$  of drug.

Regarding the nanoparticle-coated micropowders at pH 1.2, the diclofenac released from NC-microparticles (NC-MP-1) was  $23.35 \pm 0.73\%$ , while from NS-microparticles (NS-MP-1) it was lower than 5% after 60 min. At pH 5.0, the drug was released in  $33.88 \pm 0.08\%$  after 15 min and  $44.75 \pm 0.55\%$  after 60 min from NC-MP-1 and from NS-MP-1, after 15 min the drug was released in  $46.86 \pm 0.20\%$  remaining constant for 60 min of experiment. At pH 7.4, the diclofenac released from NC-MP-1 was  $85.31 \pm 0.18\%$  and  $100.92 \pm 0.79\%$  after

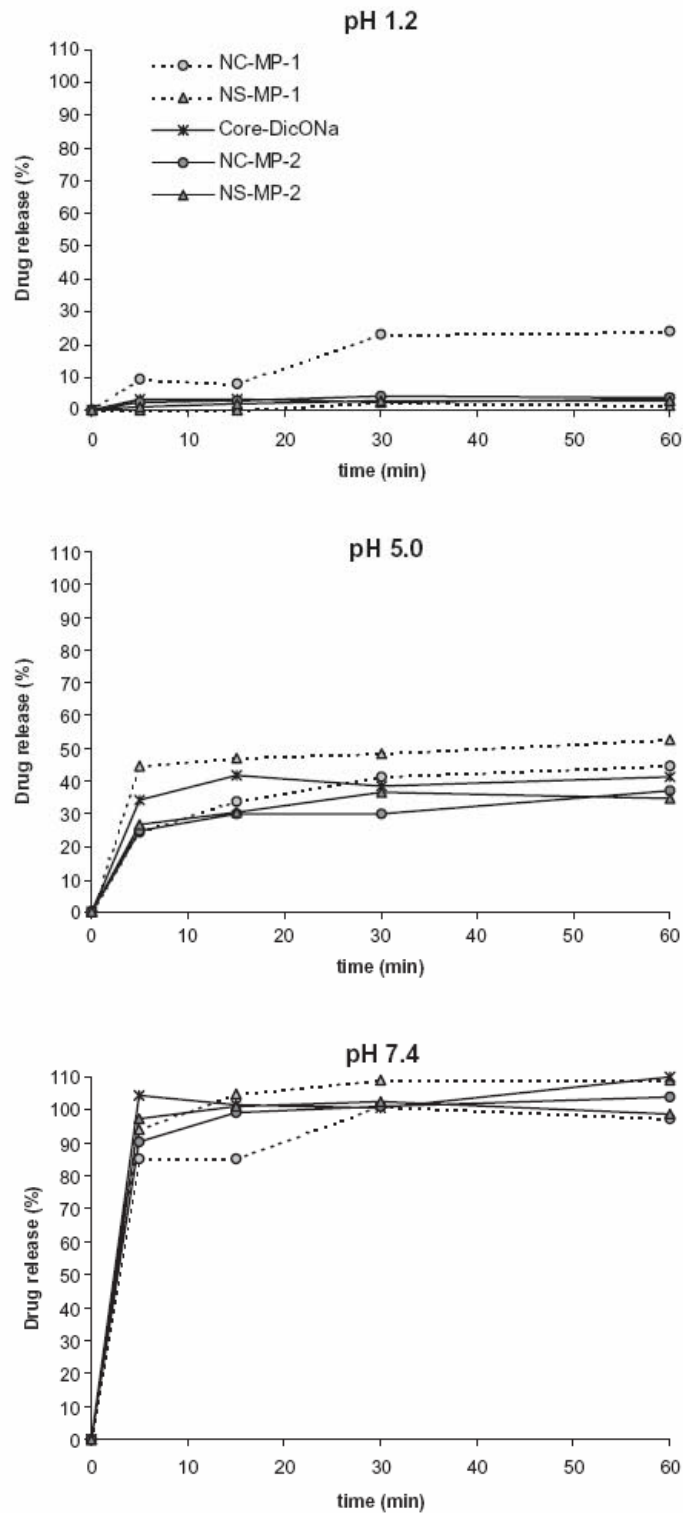


Figure 4. Diclofenac release profiles from powders prepared with hydrophilic model in phosphate buffer pH 1.2, pH 5.0 and pH 7.4 (powders obtained in one step using nanocapsules (NC-MP-1) and using nanospheres (NS-MP-1), powders obtained in two steps using nanocapsules (NC-MP-2) and using nanospheres (NS-MP-2) and uncoated core (Core-DicONa)).

5 and 30 min, respectively, while the drug released from NS-MP-1 was  $104.96 \pm 0.73\%$  after 15 min of experiment (figure 4). It is well known that substances presenting ionizable groups in their chemical structure show a solubility pH dependent. In the case of the diclofenac, the ionic form is the sodium carboxylate (hydrophilic) that is protonated in pH lower than 3.0, remaining insoluble in water. At pH values higher than 4.0, the solubility of the drug in water increases due to the prevalence of the carboxylate form (diclofenac  $pK_a$  3.8 at  $25^\circ\text{C}$  (Chiarini *et al.* 1984)). Considering the solubility of the polymer (Eudragit S100<sup>®</sup>) at pH values higher than 7.0 (Kibbe 2000) by the ionization of the carboxylic groups, the results observed for both formulations (NC-MP-1 and NS-MP-1) in buffer at pH 7.4 could be attributed to the dissolution of the coating material and the drug.

In order to verify the influence of preparing the nanoparticle-coated microparticles containing the hydrophilic drug in one or two steps, the powder composed only by sodium diclofenac and silicon dioxide was used as core to obtain the nanoparticle coated microparticles in two steps. This core was added into the unloaded polymeric nanoparticle suspensions (NC or NS) and each mixture was spray-dried. The corresponding powders presented 76% and 70% of yields (table 2, entries 3 and 4) and the encapsulation efficiencies were  $79.15 \pm 0.15\%$  and  $80.26 \pm 0.16\%$ , using NC and NS suspensions as coating, respectively. The morphological analyses showed similar sizes and distribution for these formulations, when compared with nanoparticle-coated microparticles obtained in one step. The surface of both NS-microparticles (NS-MP-1 and NS-MP-2), prepared in one or two steps, presented similar adsorbed nanostructures (60–70 nm) as well as both NC-microparticles (NC-MP-1 and NC-MP-2) showed nanostructures  $\sim 200$  nm on their surfaces. The release experiments (figure 4) carried out at pH 1.2 with nanoparticle-coated microparticles, prepared in two steps, presented drug release lower than 4% after 60 min. Regarding the results of the experiments carried out at pH 5.0, in which the polymer is insoluble, the NC-MP-2 and NS-MP-2 presented  $29.93 \pm 0.52\%$  and  $30.70 \pm 0.41\%$  of drug released after 15 min and  $37.27 \pm 0.66\%$  and  $34.92 \pm 0.60\%$  after 60 min, respectively. At pH 7.4 after 5 min, the NC-MP-2 released  $90.36 \pm 0.62\%$  of diclofenac that reached  $99.44 \pm 1.13\%$  after 15 min, while NS-MP-2 released  $101.53 \pm 1.50\%$  of drug after 5 min.

#### *Hydrophobic drug-loaded microparticles*

The hydrophobic model (diclofenac acid form) was associated with the inorganic core and this powder was coated using the unloaded NC or NS (figure 2(b)) in order to compare the release behaviour of the drug (acid or salt forms) from the powders.

The present approach allowed an increase of five times of the diclofenac content in the powders when compared with the powders previously obtained (figure 2(a)) (Müller *et al.* 2001).

The diclofenac-loaded nanoparticle-coated microparticles, prepared by the addition of the inorganic core composed by diclofenac (acid) and silicon dioxide into the polymeric nanoparticle suspensions, presented yields of 41% and 61% when NC or NS were used as coating material, respectively (table 2, entries 5 and 6).

The encapsulation efficiencies were  $98.01 \pm 1.86\%$  (NC-MP) and  $93.14 \pm 5.60\%$  (NS-MP).

The morphological analyses of these powders showed sizes and distribution for these formulations similar to those observed for the sodium diclofenac-loaded microparticles. Furthermore, the surface of the diclofenac-loaded nanoparticle-coated microparticles also presented nanostructures with diameters similar to those determined for the original suspensions (170–200 nm and 60–70 nm, for NC-MP and NS-MP, respectively).

The powder composed only by the diclofenac (acid) and the silicon dioxide was obtained with 100% of yield by an evaporation process. The encapsulation efficiency was  $91.03 \pm 3.57\%$  and the morphological analysis showed irregular shaped microparticles presenting a surface similar to raw silicon dioxide. This powder (core-DicOH) presented  $12.26 \pm 3.88\%$  of drug released in pH 1.2 after 5 min, remaining constant for the 60 min of experiment (figure 5). On the other hand, at pH 5.0, the acid-base equilibrium of diclofenac was achieved after 15 min presenting a drug release of  $35.66 \pm 5.16\%$ , which remained constant for 60 min. At pH 7.4 after 15 min, the drug was released in  $94.04 \pm 4.67\%$ , reaching  $98.99 \pm 4.85\%$  after 30 min.

Regarding the nanoparticle-coated micropowders, at pH 1.2 after 60 min (figure 5), the diclofenac released from NC-MP was  $16.28 \pm 4.05\%$ , while from NS-MP it was  $5.27 \pm 0.81\%$ . At pH 5.0, the drug was released in  $64.19 \pm 0.62\%$  after 15 min and in  $80.60 \pm 0.46\%$  after 60 min from NC-MP and from NS-MP it was released in  $31.03 \pm 2.47\%$  and  $39.71 \pm 0.87\%$ , respectively. At pH 7.4 after 5 min, NC-MP released  $101.53 \pm 0.58\%$  of diclofenac, while NS-MP presented values of  $61.14 \pm 10.57\%$  (5 min),  $78.02 \pm 3.62\%$  (15 min) and  $95.97 \pm 6.14\%$  (60 min).

The release of diclofenac from the NC-MP in pH 5.0 was greater than the release of the drug from the powder composed only by diclofenac and silicon dioxide (core-DicOH). In this case, the drug was more superficially associated with the NC-MP than with the core-DicOH. Even though the diclofenac was previously added to the core, these results suggested the drug became partially associated with the NC during the preparation of the NC-MP. To circumvent this association, an organic compound which could saturate the polymeric colloid could be added in the formulation. In order to verify this hypothesis, the triacetin, generally used as a plasticizer in pharmaceutical formulations (Kibbe 2000), was added into the suspensions before spray-drying (NC-triacetin-MP), because this ester could saturate the NC preventing the shift of the drug from the core to the coating. With the aim of comparing formulations prepared with NC or NS, the corresponding NS-triacetin-MP was also obtained. The powders NC-triacetin-MP and NS-triacetin-MP presented 51% and 40% of yields (table 2, entries 7 and 8) and the encapsulation efficiencies were  $111.29 \pm 10.01\%$  and  $76.57 \pm 0.52\%$ , respectively. The morphological analyses showed similar characteristics of these powders in comparison to the previous powders prepared in the absence of triacetin, presenting nanostructures adsorbed on their surfaces with diameters similar to those observed for the original suspensions.

Concerning the release experiments at pH 1.2 (figure 5), these powders presented diclofenac releases lower than 5% for NC-triacetin-MP and lower than 17% for NS-triacetin-MP. At pH 5.0, the drug was released in  $23.90 \pm 1.01\%$  after 15 min and  $33.35 \pm 1.79\%$  after 60 min from NC-triacetin-MP and, respectively,

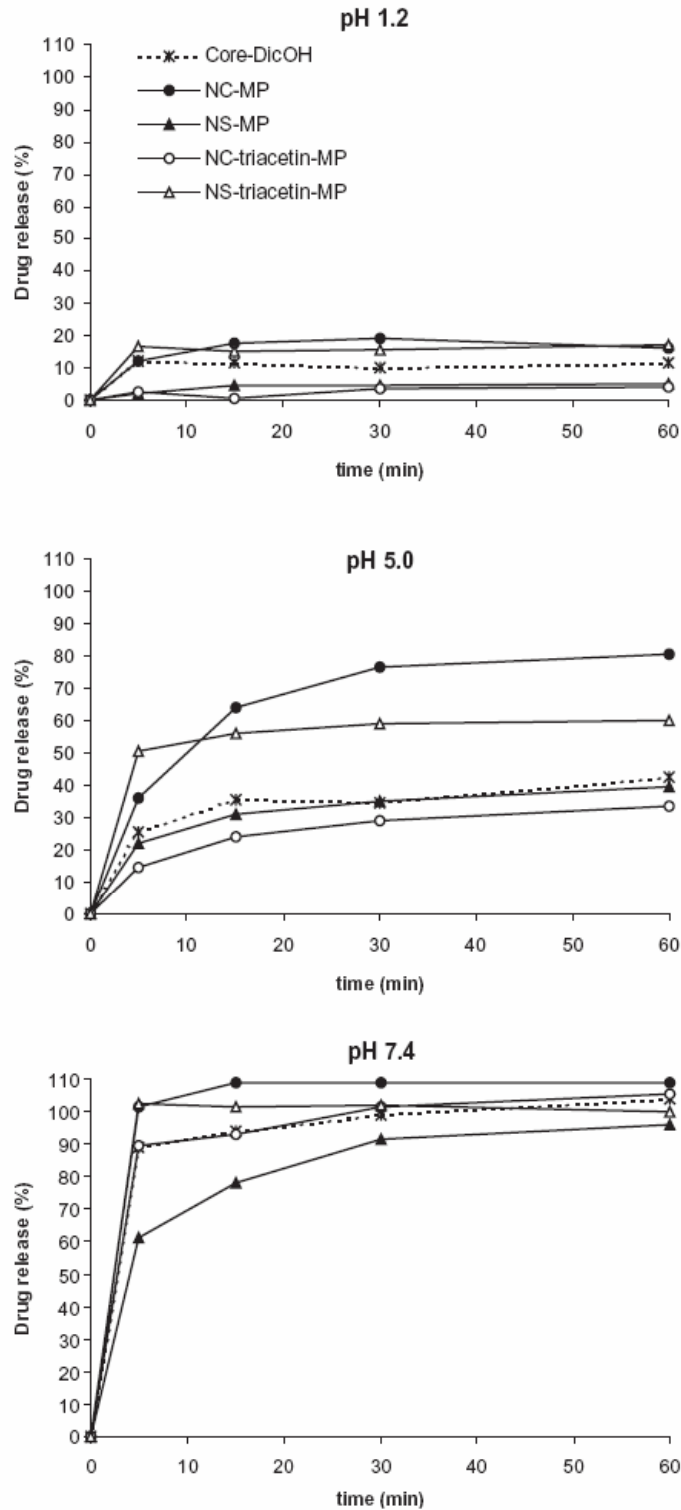


Figure 5. Diclofenac release profiles from powders prepared with hydrophobic model in phosphate buffer pH 1.2, pH 5.0 and pH 7.4 (powders prepared with nanocapsules (NC-MP) and with nanospheres (NS-MP), corresponding powders obtained in the presence of triacetin (NC-triacetin-MP) and (NS-triacetin-MP) and uncoated core (Core-DicOH)).

from NS-triacetin-MP,  $55.86 \pm 0.25\%$  and  $60.04 \pm 0.06\%$ . Regarding the release profiles at pH 7.4, NC-triacetin-MP released  $93.01 \pm 11.1\%$  of diclofenac after 15 min, while NS-triacetin-MP presented values of  $102.35 \pm 0.11\%$  after 5 min. After 30 min, the diclofenac was released in  $101.53 \pm 8.08\%$  from NC-triacetin-MP in this medium, presenting a release profile similar to that observed for the core-DicOH, due to the solubility of the polymer at this pH value. Regarding the NS-MP powder, a lower rate of drug release at pH 7.4 was observed when compared with the core-DicOH. These results can be attributed to the presence of microcrystals of diclofenac observed by optical microscopy after dispersion of NS-MP in buffer (pH 7.4) (data not showed).

Considering the solubility of the polymer and the drug in their salt forms (sodium carboxylate) at pH higher than 7.0, the samples of the NC-MP were collected from the release medium at pH 7.4 after 5 and 60 min and the residues of centrifugation were analysed by SEM. The micrographs (5 and 60 min) were similar and they showed modified surfaces in which the presence of nanoparticles could not be visualized when compared with the surfaces before the dispersion of the powders in the release medium. In order to refute that the morphological changes on the microparticle surfaces were due to desorption of nanoparticles, a comparative study was carried out using distilled water as release medium. After 5 and 60 min, the results showed the presence of nanoparticles adsorbed on the microparticles with diameter similar to those observed before the re-dispersion of powders. To confirm that the morphological changes on the microparticle surfaces were due to the polymer dissolution, a complementary study was conducted using a similar formulation (NC-MP) prepared with poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) instead of Eudragit S100<sup>®</sup>. Once the PCL is insoluble in water independently of the pH value of the medium, the powders were dispersed in water or buffer (pH 7.4) and the micrographs of samples (residues after centrifugation) showed the presence of nanoparticles adsorbed on the micropowder surfaces in all cases (5 and 60 min, water and pH 7.4). These results confirmed that the changes on the powder surface (NC-MP) observed by SEM were due to the dissolution of the polymer (Eudragit S100<sup>®</sup>), nanocoating material, during the release experiment carried out at pH 7.4.

In conclusion, this study showed the technological feasibility of preparing controlled nanoparticle-coated drug-loaded inorganic microparticles by spray-drying. When the diclofenac was employed as hydrophilic model, in this salt form, the powders prepared in two steps (core previously prepared) showed an adequate gastroresistance by the use of Eudragit S100<sup>®</sup>. In parallel, the use of diclofenac as a hydrophobic model (acid form) conducted to powders presenting good gastroresistance when the nanocapsules and triacetin were employed.

### Acknowledgements

R.C.R.B thanks Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES) for scholarship. The authors thank Fundação de Apoio à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Rede de Nanobiotecnologia/CNPq/MCT/Brazil for financial support.

## References

- AMMOURY, N., DUBRASQUET, M., FESSI, H., DEVISSAGUET, J. P., PUISIEUX, F. and BENITA, S., 1993, Indomethacin-loaded poly (D,L-lactide) nanocapsules: protection from gastrointestinal ulcerations and anti-inflammatory activity evaluation in rats. *Clinical Materials*, **13**, 121–130.
- BENITA, S., 1996, *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications* (New York: Marcel Dekker).
- BODMEIER, R. and CHEN, H., 1988, Preparation of biodegradable poly( $\pm$ )lactide microparticles using a spray-drying technique. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **40**, 754–757.
- CHIARINI, A., TARTARINI, A. and FINI, A., 1984, pH-solubility relationship and partition coefficients for some anti-inflammatory arylaliphatic acids. *Archiv der Pharmazie*, **317**, 268–273.
- CONTE, U., CONTI, B., GIUNCHEDI, P. and MAGGI, L., 1994, Spray dried polylactide microsphere preparation: influence of the technological parameters. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **20**, 235–258.
- FESSI, H., PUISIEUX, F. and DEVISSAGUET, J.-P., 1988, *European Patent*, 0274961 A1.
- GIUNCHEDI, P., CONTI, B., GENTA, I., CONTE, U. and PUGLISI, G., 2001, Emulsion spray-drying for the preparation of albumin-loaded PLGA microspheres. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **27**, 745–750.
- GUTERRES, S. S., FESSI, H., BARRAT, G., DEVISSAGUET, J.-P., and PUISIEUX, F., 1995b, Poly(D,L-lactide) nanocapsules containing diclofenac: i. formulation and stability study. *International Journal of Pharmaceutics*, **113**, 57–63.
- GUTERRES, S. S., FESSI, H., BARRAT, G., PUISIEUX, F. and DEVISSAGUET, J.-P., 1995a, Poly(D,L-lactide) nanocapsules containing non-steroidal anti-inflammatory drugs: gastrointestinal tolerance following intravenous and oral administration. *Pharmaceutical Research*, **12**, 1–3.
- GUTERRES, S. S., MÜLLER, C. R., POHLMANN, A. R. and DALLA COSTA, T., 2001, Gastrointestinal tolerance following oral administration of spray-dried diclofenac-loaded nanocapsules and nanospheres. *S.T.P. Pharma Sciences*, **11**, 229–233.
- HUANG, Y. C., CHIANG, C. H. and YEH, M. K., 2003, Optimizing formulation factors in preparing chitosan microparticles by spray-drying methods. *Journal of Microencapsulation*, **20**, 247–260.
- KAWASHIMA, Y., IWAMOTO, T., NIWA, T., TAKEUCHI, H. and HINO, T., 1993, Uniform and improved bioavailability of newly developed rapid and sustained release suspensions of ibuprofen microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, **89**, 9–17.
- KIBBE, A. H., 2000, *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (London: Pharmaceutical Press).
- LIN, S. and KAO, Y., 1991, Tablet formulation study of spray-dried sodium diclofenac enteric-coated microcapsules. *Pharmaceutical Research*, **8**, 919–924.
- MAGENHEIM, B. and BENITA, S., 1991, Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. *S.T.P. Pharma Sciences*, **1**, 221–241.
- MÜLLER, C. R., BASSANI, V. L., POHLMANN, A. R., MICHALOWSKI, C. B., PETROVICK, P. R., and GUTERRES, S. S., 2000, Preparation and characterization of spray-dried polymeric nanocapsules. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **26**, 343–347.
- MÜLLER, C. R., SCHAFFAZICK, S. R., POHLMANN, A. R., DE LUCCA FREITAS, L., PESCE DA SILVEIRA, N., DALLA COSTA, T., and GUTERRES, S. S., 2001, Spray-dried diclofenac-loaded poli( $\epsilon$ -caprolactone) nanocapsules and nanospheres. preparation and physicochemical characterization. *Pharmazie*, **56**, 864–867.
- PALMIERI, G. F., BONACUCINA, G., DI MARTINO, P. and MARTELLI, S., 2001, Spray-drying as a method for microparticulate controlled release systems preparation: advantages and limits. I. Water-soluble drugs. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **27**, 195–204.
- PALMIERI, G. F., BONACUCINA, G., DI MARTINO, P. and MARTELLI, S., 2002, Gastro-resistant microspheres containing ketoprofen, *Journal of Microencapsulation*, **19**, 111–119.

- PALMIERI, G. F., WEHRLE, P. and STAMM, A., 1994, Evaluation of spray-drying as a method to prepare microparticles for controlled drug release. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **20**, 2859–2879.
- POHLMANN, A. R., WEISS, V., MERTINS, O., PESCE DA SILVEIRA, N. and GUTERRES, S. S., 2002, Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **16**, 305–312.
- SKIBA, M., MORVA, C., DUCHENE, D., PUISIEUX, F. and WOUESSIDJEW, D., 1995, Evaluation of gastrointestinal behaviour in the rat of amphiphilic  $\beta$ -cyclodextrin nanocapsules, loaded with indomethacin. *International Journal of Pharmaceutics*, **126**, 275–279.
- TUNCAY, M., CALIS, S., KAS, H. S., ERCAN, M. T., PEKSOY, I. and HINCAL, A. A., 2000, Diclofenac sodium incorporated plga (50:50) microspheres: formulation considerations and *in vitro/in vivo* evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, **195**, 179–188.
- WAN, L. S. C., HENG, P. W. S. and CHIA, C. G. H., 1992, Spray drying as a process for microencapsulation and the effect of different coating polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **18**, 997–1011.
- WATANABE, T. O., WAKIYAMA, N. O., USUI, F. O., IKEDA, M. O., ISOBE, T. O. and SENNA, M., 2001, Stability of amorphous indomethacin compounded with silica. *International Journal of Pharmaceutics*, **226**, 81–91.



**CAPÍTULO 3:** Caracterização morfológica de micropartículas contendo diclofenaco, revestidas a partir de suspensões de nanoesferas poliméricas

---



### 3.1. INTRODUÇÃO

Até o presente momento, foi apresentada a possibilidade de obtenção de micropartículas a partir de nanopartículas poliméricas, assim como uma otimização inicial do processo de revestimento e a aplicabilidade da técnica a fármacos com características hidrofílicas ou lipofílicas. Os estudos de liberação *in vitro* e as características físico-químicas das formulações apresentaram características variadas, em função da composição das formulações utilizadas como material de revestimento.

Diante destes resultados, surge a necessidade de uma melhor compreensão das características dos sistemas formados. Neste sentido, o presente capítulo traz a caracterização morfológica das micropartículas formadas a partir de suspensões de nanoesferas poliméricas, como ferramenta para uma melhor interpretação dos resultados.

O presente trabalho foi delineado buscando a caracterização dos sistemas em relação a sua morfologia, incluindo análises microscópicas (microscopia eletrônica de varredura e microscopia óptica), determinação da área superficial, volume, distribuição de poros, tamanho de partícula e análises através de difração de raios-X.



**PUBLICAÇÃO 3:** Morphological characterization of nanosphere-coated diclofenac-loaded microparticles

Submetido ao European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics

---

---



MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF NANOSPHERE-COATED  
DICLOFENAC-LOADED MICROPARTICLES

Ruy C. R. Beck<sup>a</sup>, Adriana R. Pohlmann<sup>a,b</sup>, Maria I. Z. Lionzo<sup>a</sup>, Tania M. H. Costa<sup>c</sup>, Edilson V. Benvenuti<sup>d</sup>, Maria I. Ré<sup>d</sup>, Marcia R. Gallas<sup>e</sup>, Silvia S. Guterres<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil, Phone: +55 51 3316-5411, Telefax: +55 51 3316-5437 ([nanoc@farmacia.ufrgs.br](mailto:nanoc@farmacia.ufrgs.br))

<sup>b</sup> Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CP 15003, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Sólidos e Superfície, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CP 15003, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>d</sup> Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S.A., Divisão de Química, CP 0141, 01064-970, São Paulo, SP, Brazil

<sup>e</sup> Departamento de Física, Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

Address correspondence to Prof. Sílvia S. Guterres, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Av. Ipiranga 2752, Porto Alegre 90610-000, RS, Brazil  
e-mail: [nanoc@farmacia.ufrgs.br](mailto:nanoc@farmacia.ufrgs.br)

Phone: 55 51 33165090      Fax: 55 51 33165437

## ABSTRACT

Our previous works showed the technological feasibility of nanostructured-coated microparticles as multiple-unit drug delivery systems by spray-drying. The microparticles prepared with the diclofenac acid (hydrophobic model) and coated with nanospheres showed slower release at pH 7.4 than the microparticles prepared with sodium diclofenac. Regarding these results, this paper is devoted to compare and characterize different nanosphere-coated diclofenac-loaded microparticles. Their morphological analyses were carried out by SEM and optical microscopy, X-ray diffraction and nitrogen adsorption-desorption isotherms. The microparticle sizes ranged between 6 and 12  $\mu\text{m}$ . Comparing the powders (uncoated drug-loaded cores) before (151 and 163  $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ ) and after coating (126 and 132  $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ ), it was observed a decrease in the surface area without difference in the pore volumes (0.22 to 0.26  $\text{cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$ ). The use of triacetin as a plasticizer gave the lowest surface area and pore volume (116  $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ , 0.18  $\text{cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$ ). SEM analyses of the surface of powders showed adsorbed nanospheres (100 nm). In addition, the optical microscopy and the X-ray analyses showed the presence of crystals in the diclofenac acid-loaded formulations prepared in two steps by evaporation and spray-drying. On the other hand, the nanosphere-coated sodium diclofenac-loaded microparticles prepared in two steps by spray-drying (core and coating) were crystal free.

**Key-Words:** diclofenac, microparticles, nanoparticles, nanospheres, SEM, spray-drying, X-ray diffraction, surface area, nitrogen-isotherms



## INTRODUCTION

Polymeric microparticles are widely studied in the pharmaceutical field with the purpose, among others, to obtain better results in the oral administration of drugs by the production of multiple-unit drug delivery systems. These systems present the advantages as: ready distribution over a large surface area, more constant drug plasma levels, higher accuracy in reproducibility dose by dose, less decrease in bioavailability, minor risk of toxicity due to the dose dumping (1,2), gastrointestinal tract protection from drug toxicity, labile drug protection from degradation in the gastrointestinal tract and delivery antigens to the Peyer's patches for oral immunization (3).

Microparticles can be prepared by several physical and chemical methods reported in the literature (4). Among these methods, the spray-drying technique has been successfully employed in the preparation of microparticulated delivery systems (5-8). This method exhibits advantages such as a rapid and one-step process, it is applicable to heat-sensitive materials, and it presents an easy industrial transposition (9). Despite the more complex and onerous production of the multiple-unit drug delivery systems, they present several advantages in relation to the single-unit systems, as described above.

In parallel, polymeric nanospheres and nanocapsules, which are generically named nanoparticles, are studied as drug delivery systems with the purpose to increase the drug efficacy, decrease the drug toxicity and/or to develop prolonged drug delivery systems (10-13). In this way, nanospheres are matrix of polymer, which includes poly(alkyl cyanoacrylates), poly(methyl metacrylates) or polyesters such as poly( $\epsilon$ -caprolactone), poly(lactide), poly(glycolide) and their copolymers (11). Methods for the preparation of nanospheres can start from either a monomer (interfacial polymerization method) or from a preformed polymer (nanoprecipitation and emulsification-diffusion methods) (12). These nanostructured-polymer aqueous suspensions present some disadvantages during storage,

such as microbiological contamination, polymer hydrolysis and physico-chemical instability due to the particle agglomeration and sedimentation. Several works in the literature report different approaches to dry these suspensions, including freeze-drying (14) and spray-drying (15).

The spray-drying technique was proposed to obtain oral solid forms containing diclofenac-loaded nanoparticles, using colloidal silicon dioxide (Aerosil 200<sup>®</sup>) as drying adjuvant (15-19). The scanning electron microscopy analysis of spray-dried powders showed spherical microparticles, which presented nanoparticles on their surface (17,19,20). In parallel, silica nano and microparticles have been also described by other authors as controlled release carrier systems prepared by sol-gel processes (21,22), porous hollow silica nanoparticles (23) or as organosilicate-polymer drug delivery systems (24). Furthermore, silica particles have been studied in the adsolubilization of drugs and other substances on their surfaces, employing cationic or non-ionic surfactants (25,26), in the development of powder for inhalation (27) and nanoparticles for *in vitro* gene transfer (28,29).

In our previous work (30), we reported the use of nanoparticle suspensions (nanospheres or nanocapsules) as coating material for microparticles, which core was composed by drug and silicon dioxide. The method was developed considering the physico-chemical nature of the model of drug. For the hydrophilic model (Fig. 1), two approaches were used: a) core and coating prepared in one step: the sodium diclofenac and the silicon dioxide were added into the nanoparticle suspension and the mixture was spray-dried, and b) core and coating prepared in two steps: the silicon dioxide was added in a sodium diclofenac solution and spray-dried, this powder (the core) was added into the nanoparticle suspension and the mixture was spray-dried. For the hydrophobic model, the silicon dioxide was added into an acetone solution of the drug and the solvent was removed by evaporation under reduced pressure (Fig. 2). This powder (the core) was added into the nanoparticle suspension with or

without triacetin as plasticizer and the mixture was spray-dried. The *in vitro* drug release showed modified profiles from these systems according to the drug model (hydrophilic or hydrophobic), the coating material (nanospheres or nanocapsules) and the presence or absence of triacetin. The formulation prepared with the diclofenac acid (hydrophobic model) and coated with nanosphere suspension showed slower drug release at pH 7.4 than the microparticles prepared with sodium diclofenac.

Regarding these results, this paper is devoted to compare and characterize nanosphere-coated diclofenac-loaded microparticles. The morphological characterization was carried out using scanning electron and optical microscopies, X-ray diffraction, and nitrogen adsorption-desorption isotherms to obtain the surface area and the pore size distribution.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Diclofenac (sodium salt) was obtained from Sigma (St. Louis, USA); Eudragit S100<sup>®</sup> (EUD) was supplied from Almapal (São Paulo, Brazil). Sorbitan monostearate (Span 60<sup>®</sup>) and polysorbate 80 (Tween 80<sup>®</sup>) were supplied by Delaware (Porto Alegre, Brazil). Colloidal silicon dioxide (Aerosil 200<sup>®</sup>) was acquired from Degussa (São Paulo, Brazil). All other chemicals and solvents presented pharmaceutical grade and were used as received.

## Diclofenac Free Acid Form

An aqueous solution (400 mL) of sodium diclofenac (3.0 g, 9.43 mmol) was acidified with 5 mol.L<sup>-1</sup> HCl (5 mL). The precipitate (free acid form of diclofenac) was filtered and recrystallized from ethanol/water 1:1 (v/v). Colorless crystals were obtained with 90% of yield and characterized by infrared analysis (FT-IR 8300, Shimadzu, Tokio, Japan).

IR ( $\nu$ , cm<sup>-1</sup>): 3322 (NH), 2940 (br, OH), 1694 (CO), 1587 (C=C), 1507 and 1453 (Ar), 1160 (C-O).

## Preparation and Characterization of the Nanosphere Suspensions

Nanospheres (NS) were prepared by the nanoprecipitation method as described by Fessi and co-workers (31). The lipophilic solution consisted of Span 60<sup>®</sup> (0.1532 g), Eudragit S100<sup>®</sup> (1.0 g) and acetone (267.0 mL) was added under moderate magnetic stirring to an aqueous solution (533.0 mL) containing Tween 80<sup>®</sup> (0.1532 g). The mixture was stirred for 10 min at room temperature. Thus, the acetone was eliminated and the aqueous phase concentrated by evaporation under reduced pressure. The final volume was adjusted to 100 mL, corresponding to a polymer concentration of 10 mg.mL<sup>-1</sup>. The nanosphere suspension was characterized by pH measurements (Micronal, B-474, São Paulo, Brazil) and by particle size determination using photon correlation spectroscopy (PCS) after dilution of samples (500 times) with water (Milli-Q<sup>®</sup>). The scattered light was observed at an angle of 90° (Brookhaven Instruments, goniometer BI-200M/2.0 version, Holtsville, USA; BI9863 detection system; Laser He-Ne source 35 mW, 127 model,  $\lambda$ = 632.8 nm, Spectra Physics, Mountain View, USA).

## Preparation of the Microparticles

The microparticles were prepared in triplicates as previously reported (30) according to the solubility of the drug. Fig. 1 and Fig. 2 show the illustrative methods used for hydrophilic (sodium diclofenac) and hydrophobic (diclofenac acid) models. These methods are described below.

### Hydrophilic drug-loaded microparticles

To obtain the core of the microparticles (uncoated core-DicONa), the sodium diclofenac (0.270 g, 0.7 mmol) was dissolved in water (50 mL) and added of the Aerosil 200<sup>®</sup> (1.5 g) (Fig. 1b). This mixture was fed into a mini-spray-dryer Büchi 190<sup>®</sup> (Flawil, Switzerland) with a two-component nozzle and co-current flow, to give a powder (the core) with a final concentration of sodium diclofenac of 0.48 mmol.g<sup>-1</sup> of core. The inlet temperature at the drying chamber was maintained around 170 °C ± 4 °C and the spray rate feed was 3 mL.min<sup>-1</sup>. At the coating step, 1.5 g of the core material, which corresponds to 0.230 g (0.7 mmol) of sodium diclofenac in 1.270 g of silicon dioxide, was rapidly dispersed into 50 mL of the NS aqueous suspension under magnetic stirring at room temperature. This mixture was also spray-dried as described above.

The nanosphere-coated microparticles were also obtained by an one step process (Fig. 1a). Sodium diclofenac (0.230 g, 0.7 mmol) and the Aerosil 200<sup>®</sup> (1.270 g) were directly added to the NS aqueous suspension, under magnetic stirring at room temperature. This mixture was spray-dried as described above.

The powders were called NS-coated-MP-DicONa-2 or NS-coated-MP-DicONa-1, respectively, according to the number of process steps involved in the preparation of the microparticles.

#### *Hydrophobic drug-loaded microparticles*

To obtain the core of the microparticles (uncoated core-DicOH), the diclofenac free acid (0.250 g, 0.7 mmol) was dissolved in acetone (50 mL) and added of the Aerosil 200<sup>®</sup> (1.5 g) (Fig. 2). The acetone was removed under reduced pressure to obtain a solid product, with a final concentration of diclofenac acid of 0.48 mmol.g<sup>-1</sup> of powder. This powder (the core) was maintained in a desiccator at room temperature during 48 h. At the coating step, 1.5 g of core material, which corresponds to 0.214 g (0.7 mmol) of diclofenac in 1.270 g of silicon dioxide, was carefully milled in a mortar for 10 min, and dispersed into 50 mL of the NS aqueous suspension under magnetic stirring at room temperature. The mixture was fed into a mini-spray-dryer Büchi 190<sup>®</sup> (Flawil, Switzerland), using the same operational conditions described above. The powder was called NS-coated-MP-DicOH.

To study the influence of a plasticizer on the morphological characteristics of the microparticles, the triacetin [20% (w/w) in relation to the polymer] was added to the nanosphere suspensions, followed by the addition of the core under magnetic stirring during 10 minutes. After that, the mixture was spray-dried. The powder was called NS-coated-MP-DicOH-triacetin.

## Determination of Yield and Encapsulation Efficiency

The yields of the formulations were calculated by the sum of the weights of all components, discounting the content of water in the suspension. The powders (cores and nanosphere-coated microparticles) were dispersed in acetonitrile (DicOH-microparticles) or buffer pH 7.4 (DicONa-microparticles) for 60 min at room temperature. The dispersions were filtered through a hydrophilic membrane (GVWP, 0.45  $\mu\text{m}$ , Millipore) and analyzed by HPLC. The chromatographic system consisted of a Nova Pak<sup>®</sup> RP 18 –Waters column and a Perkin Elmer instrument (200 Series, Shelton, USA). The mobile phase was prepared with acetonitrile/pH 5.0 phosphate buffer (50:50% v/v), and the flow was 1 mL.min<sup>-1</sup>. The volume injected was 20  $\mu\text{L}$  and diclofenac was detected at 280 nm. The encapsulation efficiency of each formulation was calculated from the correlation of the theoretical and the experimental diclofenac concentrations and expressed as percentages.

## Morphological Analyses

### Nitrogen-isotherms

The solids were previously degassed under vacuum at 40 °C for 2 hours. The nitrogen adsorption-desorption isotherms were determined at liquid nitrogen boiling point in a home-made volumetric apparatus, using nitrogen as probe. The specific surface areas of microparticles were determined by the BET multipoint technique (32) and the pore size distribution was obtained using BJH method (33).

## Scanning electron microscopy

The uncoated cores and the nanosphere-coated microparticles were examined under scanning electron microscopy (SEM) (Jeol Scanning Microscope, JSM-5800, Tokyo, Japan), at 20 kV, employing different magnifications (between 1,000x and 95,000x). Samples were analyzed after they had been gold sputtered (Jeol Jee 4B SVG-IN, Tokyo, Japan). The images were processed, using the Quantikov software (34), to determine the diameter sizes of the particles adsorbed on the microparticle surface.

## Optical microscopy

The uncoated core and the microparticles were examined, after redispersion in water, phosphate buffer pH 7.4 or mineral oil, and photographs were taken for morphological analysis under a light microscope (Model BX-41, Olympus<sup>®</sup>, Japan) coupled with a photographic camera (Model PM-20, Olympus<sup>®</sup>, Japan) at a magnification of 120x.

## Particles Size Distributions and Average Diameters

The particle size distributions were determined by laser diffractometry with a Beckman Coulter - tornado (Beckman Instruments, USA) by drying dispersion. The mean diameter over the volume distribution  $d_{4,3}$  was used as a particle size distribution parameter.

## X-Ray Analyses



X-ray analyses were performed on the polymer, on the drug (diclofenac acid and sodium diclofenac) and on the microparticles. Diffraction powder patterns were obtained with a Siemens diffractometer (model D500) using Cu K $\alpha$  radiation at 35 kV.

## RESULTS AND DISCUSSION

In this paper, polymeric nanospheres were used as nanostructured coating for drug-loaded microparticles. The nanosphere (NS) aqueous suspension was prepared by nanoprecipitation of Eudragit S100<sup>®</sup>. After preparation, the suspension presented pH values of  $3.60 \pm 0.01$  and particle size of  $67 \pm 9$  nm by dynamic light scattering (PCS).

The nanosphere-coated drug-loaded microparticles were prepared using sodium diclofenac as hydrophilic drug model and diclofenac free acid as hydrophobic model. The acid form of diclofenac was prepared by classical procedure reacting the commercial sodium diclofenac with  $5 \text{ mol.L}^{-1}$  HCl. The acid was obtained with very good yield (90 %) and its IR spectrum showed bands at 3322, 2940 and  $1694 \text{ cm}^{-1}$  corresponding to NH, OH and C=O stretchings. The yields of nanosphere-coated drug-loaded microparticles were in the range of 40 to 80 % and the encapsulation efficiencies were between 75 and 95 %. All samples presented a macroscopic aspect of powder.

The surface area and pore volume (Table 1) were obtained by N<sub>2</sub> adsorption-desorption isotherms using the BET and BJH methods. In order to compare the results obtained from the samples prepared by different methods, the commercial silicon dioxide (Aerosil 200<sup>®</sup>) as well as the evaporated or spray-dried neat silicon dioxide were also analyzed. The evaporated silicon dioxide ( $175 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$  and  $0.27 \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}$ ) and the spray-dried silicon dioxide ( $180 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$  and  $0.24 \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}$ ) presented a decrease in the surface area as compared with the commercial silicon dioxide ( $214 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$  and  $0.30 \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}$ ). Comparing the uncoated drug-loaded cores with

the evaporated and spray-dried silicon dioxide, the surface areas decreased without difference in the pore volumes (uncoated core-DicONa:  $151 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  and  $0.26 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ ; uncoated core-DicOH:  $163 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  and  $0.25 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ ). Furthermore, after coating the cores using the nanosphere suspension the surface areas showed an additional decrease (NS-coated-MP-DicONa-2:  $126 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ; NS-coated-MP-DicOH:  $132 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ). The NS-coated-MP-DicONa-1 prepared in 1 step presented surface area of  $121 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ . Among the nanosphere-coated drug-loaded microparticles, the sodium diclofenac-loaded samples (NS-coated-MP-DicONa-1 and NS-coated-MP-DicONa-2) showed lower surface areas than the diclofenac acid-loaded sample (NS-coated-MP-DicOH). However, the use of a plasticizer (triacetin) for the preparation of the latter furnished the NS-coated-MP-DicOH-triacetin sample, which presented the lowest value of surface area ( $116 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ).

With the aim to compare the effects of the presence of the drug and the presence of the nanospheres of the agglomerates in the surface areas, neat silicon dioxide was added into the nanosphere suspension and the mixture was spray-dried. The surface area of the nanosphere-coated drug-unloaded microparticles (MP-NS) was  $144 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ . The results showed that both nanospheres and drug contributed to the decrease in the surface area values.

The pore size distributions of commercial, evaporated and spray-dried silicon dioxide, uncoated cores and respective nanosphere-coated microparticles were determined by using the BJH method (33). In the mesoporous region (pore diameter between 2 and 50 nm) all samples presented similar distribution profiles near zero. The macropores of Aerosil 200<sup>®</sup> are resultants from the agglomeration of its primary particles, and the presence of nanostructures and/or drug (organic materials) in the samples promoted the observed decreases in the surface areas (Table 1). The presence of the organic materials in the samples could cause a partial reduction in the nitrogen accessibility to the pores, consequently promoting a decrease in the surface area of microparticles. The SEM analyses of powders showed that the different

methods gave different shaped microparticles. The uncoated core-DicOH showed irregular microparticles, while the respective NS-coated drug-loaded microparticles (NS-coated-MP-DicOH and NS-coated-MP-DicOH-triacetin) showed spheroid microparticles. On the other hand, the uncoated core-DicONa and its respective drug-loaded microparticle (NS-coated-MP-DicONa-2) as well as the NS-coated-MP-DicONa-1 presented homogeneous spherical shaped microparticles (Fig. 3). Concerning the analyses of microparticle surfaces, all formulations (NS-coated-MP-DicOH, NS-coated-MP-DicOH-triacetin, NS-coated-MP-DicONa-1, NS-coated-MP-DicONa-2 and MP-NS) presented rugged surfaces as previously observed by SEM (30). The size distributions of nanospheres at the surface of microparticles were calculated as described by Pinto (34) using the SEM photomicrographs (95,000x of magnification). For all powders, the adsorbed nanospheres showed similar mean particle sizes around 100 nm with a standard deviation of approximately 30 nm as depicted for NS-coated-MP-DicONa-2 in Fig. 4. The slightly difference between the nanosphere mean sizes, determined by PCS in the suspension and calculated from the SEM photomicrographs after drying could be explain by a probable rearrangement of nanospheres during spray-drying as previously observed for poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanospheres (19).

In order to determine the influence of microparticle size distribution in the decrease of surface area, the powders were analyzed by laser diffractometry. The mean microparticle sizes and size ranges determined for the uncoated cores and for the nanosphere-coated microparticles are presented in Table 2. The nanosphere-coated DicOH-loaded microparticles presented particle sizes slightly greater than the respective uncoated core (NS-coated-MP-DicOH: 12.33  $\mu\text{m}$ , NS-coated-MP-DicOH-triacetin: 8.16  $\mu\text{m}$  and uncoated-core DicOH: 7.27  $\mu\text{m}$ ). On the other hand, the particle sizes of nanosphere-coated DicONa-loaded microparticles were a few smaller than the respective uncoated core (NS-coated-MP-DicONa-1: 8.11  $\mu\text{m}$ ; NS-coated-MP-DicONa-2: 6.19  $\mu\text{m}$  and uncoated core-DicONa: 11.07  $\mu\text{m}$ ).

The optical microscopic analyses of the uncoated cores and the respective microparticles dispersed in water showed spherical agglomerates for the DicONa-loaded microparticles and irregular agglomerates for the DicOH-loaded microparticles. Crystalline structures were observed only in the DicOH-loaded samples (uncoated core-DicOH; NS-coated-MP-DicOH; NS-coated-MP-DicOH-triacetin). After dispersion of these powders in phosphate buffer pH 7.4, the crystalline structures were not visualized and the microparticles presented similar morphological characteristics as those observed after the redispersion in water. Finally, the microparticles dispersed in mineral oil demonstrated the presence of crystalline structures in all drug-loaded samples independent of the model (acid or salt) probably due to the apolar chemical characteristic of this solvent.

In order to identify these crystals and to establish the physical state of the drug in the formulations, X-ray analyses were performed. Fig. 5 shows the X-ray diffraction patterns for the diclofenac acid (A), sodium diclofenac (B) and the polymer Eudragit S100<sup>®</sup> (C). The diffractograms from D to I are the experimental results from the different microparticle samples. It can be seen diffraction peaks in the DicOH-loaded microparticles (D, F and G) that corresponds to the pattern of the diclofenac acid. These peaks are superimposed to the amorphous silica pattern, that has a very broad diffraction line at  $2\theta \approx 22^\circ$ . On the other hand, the uncoated core-DicONa diffractogram does not show any peak. The absence of crystallinity in this uncoated core indicated that de DicONa was amorphous or molecularly dispersed within the microparticles. The NS-coated-MP-DicONa-1 (H) presented the diffraction peak of diclofenac acid crystals, while the NS-coated-MP-DicONa-2 (I) presented broad diffraction lines corresponding to the polymer and silicon dioxide. The very broad diffraction line of the polymer (C) ( $2\theta \approx 13^\circ$ ) was also observed for all nanosphere-coated formulations (F-I).

The presence of diclofenac acid crystals [diclofenac  $pK_a$  3.8 at 25 °C (35)] in the NS-coated-MP-DicONa-1 and its absence in the uncoated core-DicONa and in the NS-coated-MP-DicONa-2 suggested that the DicONa directly dispersed in the nanosphere suspension added of silicon dioxide has been partially protonated during the preparation of the former (NS-coated-MP-DicONa-1). The diffraction peaks of DicOH observed for uncoated core-DicOH, NS-coated-MP-DicOH and NS-coated-MP-DicOH-triacetin confirmed that the crystals observed by optical microscopy correspond to the drug in its acid form. The presence of microcrystals in the DicOH-loaded formulations can explain the slow release profile of diclofenac from NS-coated-MP-DicOH at pH 7.4 previously reported (30).

In conclusion, the nanosphere-coated diclofenac-loaded microparticles were successfully characterized. The SEM analyses of powders showed that the different methods gave different shaped microparticles. The uncoated core-DicOH showed irregular microparticles, while the respective DicOH-loaded microparticles showed spheroid microparticles. On the other hand, the uncoated core-DicONa and the DicONa-loaded microparticles presented homogeneous spherical shaped microparticles. Although the SEM analyses of the surfaces of the nanosphere-coated microparticles and uncoated cores showed similar characteristics, the coating process was confirmed by the determination of the decrease in the surface area of powders. The presence of the triacetin as a plasticizer in the nanosphere-coated DicOH-loaded microparticles cause the highest decrease in the surface area comparing all formulations. The presence of the organic materials (drug and nanosphere coating) in the samples promoted decreases in the surface areas of microparticles. In addition, the optical microscopy and the X-ray analyses showed the presence of crystals in all diclofenac acid-loaded formulations prepared in two steps by evaporation and spray-drying. Diclofenac acid crystals were also detected by X-ray diffraction in sodium diclofenac-loaded formulation prepared in one step. On the other hand, the nanosphere-coated sodium diclofenac-loaded microparticles prepared

in two steps by spray-drying (core and coating) were crystal free, suggesting that the drug is amorphous or molecularly dispersed within the microparticles.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

RCRB thanks Capes for his fellowship. The authors thank the financial support of FAPERGS, Rede Nanobiotec/CNPq/MCT, and grant from CNPq/Brasília/Brasil. SEM analyses were carried out in the *Centro de Microscopia da UFRGS*.

#### REFERENCES

- [1] S. Lin, Y. Kao, Tablet formulation study of spray-dried sodium diclofenac enteric-coated microcapsules, *Pharm. Res.* 8 (1991) 919--924.
- [2] Y. Kawashima, T. Iwamoto, T. Niwa, H. Takeuchi, T. Hino, Uniform and improved bioavailability of newly developed rapid and sustained release suspensions of ibuprofen microspheres, *Int. J. Pharm.* 89 (1993) 9--17.
- [3] M. Murillo, C. Gamazo, M. M. Goñi, J. M. Irache, M. J. Blanco-Príeto, Development of microparticles prepared by spray-drying as a vaccine delivery system against brucellosis, *Int. J. Pharm.* 242 (2002) 341--344.
- [4] S. Benita, *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications*, Marcel Dekker, New York, USA, 1996.
- [5] U. Conte, B. Conti, P. Giunchedi, L. Maggi, Spray dried polylactide microsphere preparation: influence of the technological parameters, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 20 (1994) 235--258.
- [6] M. D. Blanco, M. V. Bernardo, R. L. Sastre, R. Olmo, E. Muñiz, J. M. Teijón, Preparation of bupivacaine-loaded poly( $\epsilon$ -caprolactone) microspheres by spray-drying:

- drug release studies and biocompatibility, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 55 (2003) 229--236.
- [7] Y. C. Huang, C. H. Chiang, M. K. Yeh, Optimizing formulation factors in preparing chitosan microparticles by spray-drying methods, *J. Microencapsul.* 20 (2003) 247--260.
- [8] F. Oneda, M. I. Ré, The effect of formulation variables on the dissolution and physical properties of spray-dried microspheres containing organic salts, *Powder Technol.* 130 (2003) 377--384.
- [9] L. S. C. Wan, P. W. S. Heng, C. G. H. Chia, Spray drying as a process for microencapsulation and the effect of different coating polymers, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 18 (1992) 997--1011.
- [10] P. Couvreur, C. Dubernet, F. Puisieux, Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41 (1995) 2--13.
- [11] G. M. Barratt, Therapeutic applications of colloidal drug carriers. *PSTT* 3 (2000) 163--171.
- [12] S. R. Schaffazick, S. S. Guterres, L. L. Freitas, A. R. Pohlmann, Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos, *Quim. Nova* 26 (2003) 726--737.
- [13] A. R. Pohlmann, L. U. Soares, L. Cruz, N.P. da Silveira, S. S. Guterres, Alkaline Hydrolysis as a tool to determine the association form of indomethacin in nanocapsules prepared with poly( $\epsilon$ -caprolactone), *Curr. Drug Delivery* 1 (2004) 103--110.
- [14] S. R. Schaffazick, A. R. Pohlmann, T. Dalla-Costa, S. S. Guterres, Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56 (2003) 501--505.

- [15] C. R. Müller, V. L. Bassani, A. R. Pohlmann, C. B. Michalowski, P. R. Petrovick, S. S. Guterres, Preparation and characterization of spray-dried polymeric nanocapsules, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 26 (2000) 343-347.
- [16] a) S. S. Guterres, A. R. Pohlmann, T. Dalla-Costa, V. L. Bassani, C. R. Müller, Br INPI 9906081-7 (1999). b) S. S. Guterres, A. R. Pohlmann, T. Dalla-Costa, V. L. Bassani, C. R. Müller, Procédé de séchage de suspensions colloïdales de nanocapsules et de nanosphères polymères par aspersion, Fr Patent 2,801,227 (2000).
- [17] C. R. Müller, S. R. Schaffazick, A. R. Pohlmann, L. L. Freitas, N. P. da Silveira, T. Dalla Costa, S. S. Guterres, Spray-dried diclofenac-loaded poli( $\epsilon$ -caprolactone) nanocapsules and nanospheres: Preparation and physicochemical characterization, *Pharmazie* 56 (2001) 864--867.
- [18] S. S. Guterres, C. R. Müller, A. R. Pohlmann, T. Dalla Costa, Gastro-intestinal tolerance following oral administration of spray-dried diclofenac-loaded nanocapsules and nanospheres, *S.T.P. Pharm. Sci.* 11 (2001) 229--233.
- [19] A. R. Pohlmann, V. Weiss, O. Mertins, N. P. da Silveira, S. S. Guterres, Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models, *Eur. J. Pharm. Sci.* 16 (2002) 305--312.
- [20] R. P. Raffin, E. S. Obach, G. Mezzalana, A. R. Pohlmann, S. S. Guterres, Nanocápsulas poliméricas secas contendo indometacina: estudo de formulação e de tolerância gastrointestinal em ratos, *Acta Farm. Bonaerense* 22 (2003) 163--172.
- [21] P. Kortesoja, M. Ahola, M. Kangas, M. Jokinen, T. Leino, L. Vuorilehto, S. Laakso, J. Kiesvaara, A. Yli-Urpo, M. Marvola, Effect of synthesis parameters of the sol-gel-processed spray-dried silica gel microparticles on the release rate of dexmedetomidine, *Biomaterials* 23 (2002) 2795--2801.



- [22]I. Smirnova, J. Mamic, W. Arlt, Adsorption of drugs on silica aerogels, *Langmuir* 19 (2003) 8521--8525.
- [23]J.-G. Chen, H.-M. Ding, J.X Wang, L. Shao, Preparations and characterization of porous hollow silica nanoparticles for drug delivery application, *Biomaterials* 25 (2004) 723--727.
- [24]S. H. Cypes, W. M. Saltzman, E. P. Giannelis, Organocilicate-polymer drug delivery systems: controlled release and enhanced mechanical properties, *J. Controlled Release* 90 (2003) 163--169.
- [25]I. Cherkaoui, V. Monticone, C. Vaution, C. Treiner, Surface modification of silica particles by a cationic surfactant: adsolubilization of steroids from aqueous solutions, *Int. J. Pharm.* 176 (1998) 111--120.
- [26]I. Cherkaoui, V. Monticone, C. Vaution, C. Treiner, Coadsorption of the sodium salts of two steroids molecules at a silica/interface as induced by the adsorption of a cationic surfactant, *Int. J. Pharm.* 201 (2000) 71--77.
- [27]Y. Kawashima, T. Serigano, T. Hino, H. Yamamoto, H. Takeuchi, Design of inhalation dry powder of pranlukast hydrate to improve dispersibility by the surface modification with light anhydrous silicic acid (Aerosil 200), *Int. J. Pharm.* 173 (1998) 243--251.
- [28]C. Kneuer, M. Sameti, U. Bakowsky, T. Schiestel, H. Schirra, H. Schmidt, C.-M. Lehr, A nonviral DNA delivery system based on the surface modified silica-nanoparticles can efficiently transfect cells in vitro, *Bioconj. Chem.* 11 (2000) 926--932.
- [29]M. Sameti, G. Bohr, M. N. V. Ravi Kumar, C. Kneuer, U. Bakowsky, M. Nacken, H. Schmidt, C.-M. Lehr, Stabilisation by freeze-drying of cationially modified silica nanoparticles for gene delivery, *Int. J. Pharm.* 266 (2003) 51--60.

- [30]R. C. R. Beck, A. R. Pohlmann, S. S. Guterres, Nanoparticle coated microparticles: preparation and characterisation, *J. Microencapsul.* 21 (2004) 499--512.
- [31]H. Fessi, F. Puisieux, J.-Ph. Devissaguet, European Patent 0274961 A1, 1988.
- [32]S. Brunauer, P. H. Emmet, E. Teller, Adsorption of gases in multimolecular layers, *J. Chem. Soc.* 60 (1938) 309--319.
- [33]E. P. Barret, L. G. Joyner, P. P. Halenda, The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms, *J. Am. Chem. Soc.* 73 (1951) 373--380.
- [34]L. C. M. Pinto, PhD Thesis. Universidade de São Paulo, IPEN, 1996.
- [35]A. Chiarini, A. Tartarini, A. Fini, pH-solubility relationship and partition coefficients for some anti-inflammatory arylaliphatic acids, *Arch. Pharm.* 317 (1984) 268--273.

Figure 1. Two approaches used to prepare the nanoparticle-coated diclofenac-loaded microparticles: a) core and coating prepared in one step, and b) core and coating prepared in two steps.

Figure 2. After adding the silicon dioxide into an acetone solution of the drug the solvent was evaporated and the core was added into the nanosphere suspension with or without triacetin and the mixture was spray-dried.

Figure 3. SEM (photo width = 132  $\mu\text{m}$ ) of hydrophobic drug-loaded samples: (A) uncoated core-DicOH, (B) NS-coated-MP-DicOH, (C) NS-coated-MP-DicOH-triacetin, and hydrophilic drug-loaded samples: (D) uncoated core-DicONa, (E) NS-coated-MP-DicONa-1, (F) NS-coated-MP-DicONa-2.

Figure 4. SEM (photo width = 1.39  $\mu\text{m}$ ) of the surface of a microparticle from NS-coated-MP-DicONa-2 sample.

Figure 5. X-ray diffraction pattern of: (A) DicOH; (B) DicONa; (C) Eudragit S100<sup>®</sup>; (D) Uncoated core-DicOH; (E) Uncoated core-DicONa; (F) NS-coated-MP-DicOH; (G) NS-coated-MP-DicOH-triacetin; (H) NS-coated-MP-DicONa-1 and (I) NS-coated-MP-DicONa-2.

Table 1. Morphological characteristics of the silicon dioxide and of the organic-inorganic microparticles.

Sample	Surface area (m <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup> )	Pore volume (cm <sup>3</sup> .g <sup>-1</sup> )
Commercial colloidal silicon dioxide	214 ± 11	0.30 ± 0.02
Evaporated silicon dioxide	175 ± 09	0.27 ± 0.01
Spray-dried silicon dioxide	180 ± 09	0.24 ± 0.01
Uncoated core-DicOH	163 ± 08	0.25 ± 0.01
Uncoated core-DicONa	151 ± 08	0.26 ± 0.01
MP-NS	144 ± 07	0.24 ± 0.01
NS-coated-MP-DicOH	132 ± 07	0.22 ± 0.01
NS-coated-MP-DicOH-triacetin	116 ± 06	0.18 ± 0.01
NS-coated-MP-DicONa-1	121 ± 06	0.22 ± 0.01
NS-coated-MP-DicONa-2	126 ± 06	0.22 ± 0.01

Table 2. Particle sizes of the organic-inorganic drug loaded microparticles.

Sample	Mean volume diameter	Distribution of particles sizes			
		d <sub>4.3</sub> (µm)	d <sub>0.9</sub> (µm)	d <sub>0.1</sub> (µm)	d <sub>0.5</sub> (µm)
Uncoated core - DicONa	11.07	27.99	2.50	6.84	63.6
Uncoated core - DicOH	7.27	12.74	2.75	6.30	71.7
NS-coated-MP-DicOH	12.33	30.01	1.52	6.87	58.4
NS-coated-MP-DicOH-triacetin	8.16	21.54	1.37	4.60	70.2
NS-coated-MP-DicONa-1	8.11	19.96	1.81	5.02	70.6
NS-coated-MP-DicONa-2	6.19	12.69	1.81	4.91	82.6

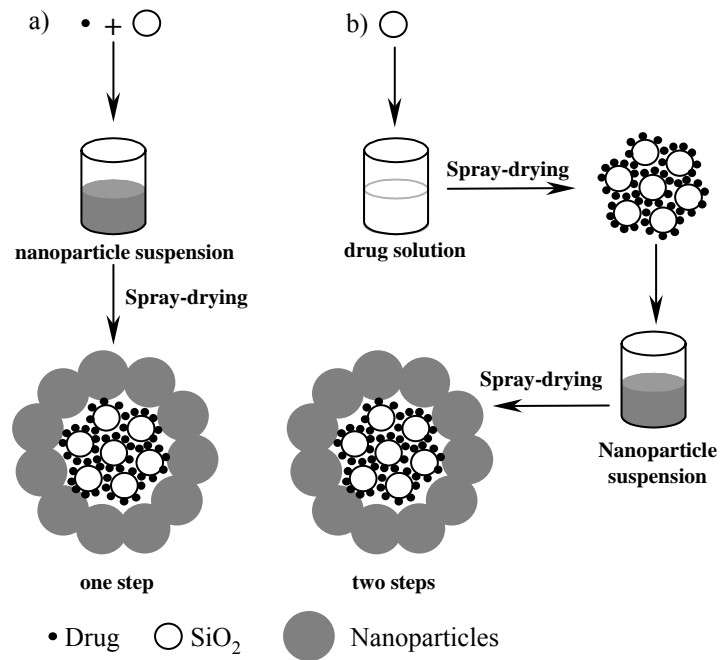


Figure 1. Two approaches used to prepare the nanoparticle-coated diclofenac-loaded microparticles: a) core and coating prepared in one step, and b) core and coating prepared in two steps.

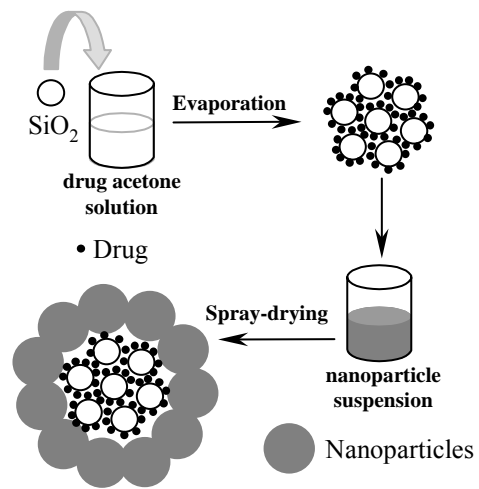


Figure 2. After adding the silicon dioxide into an acetone solution of the drug the solvent was evaporated and the core was added into the nanosphere suspension with or without triacetin and the mixture was spray-dried.

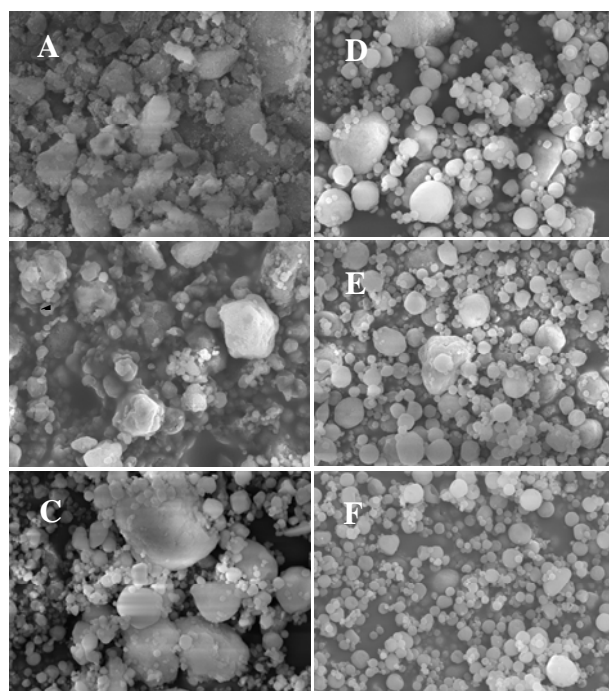


Figure 3. SEM (photo width = 132  $\mu\text{m}$ ) of hydrophobic drug-loaded samples: (A) uncoated core-DicOH, (B) NS-coated-MP-DicOH, (C) NS-coated-MP-DicOH-triacetin, and hydrophilic drug-loaded samples: (D) uncoated core-DicONa, (E) NS-coated-MP-DicONa-1, (F) NS-coated-MP-DicONa-2.



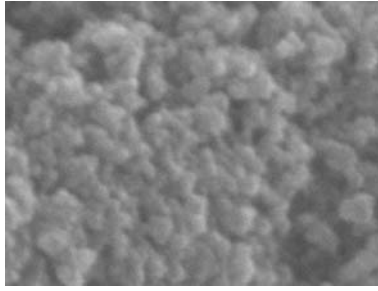


Figure 4. SEM (photo width = 1.39  $\mu\text{m}$ ) of the surface of a microparticle from NS-coated-MP-DicONa-2 sample.

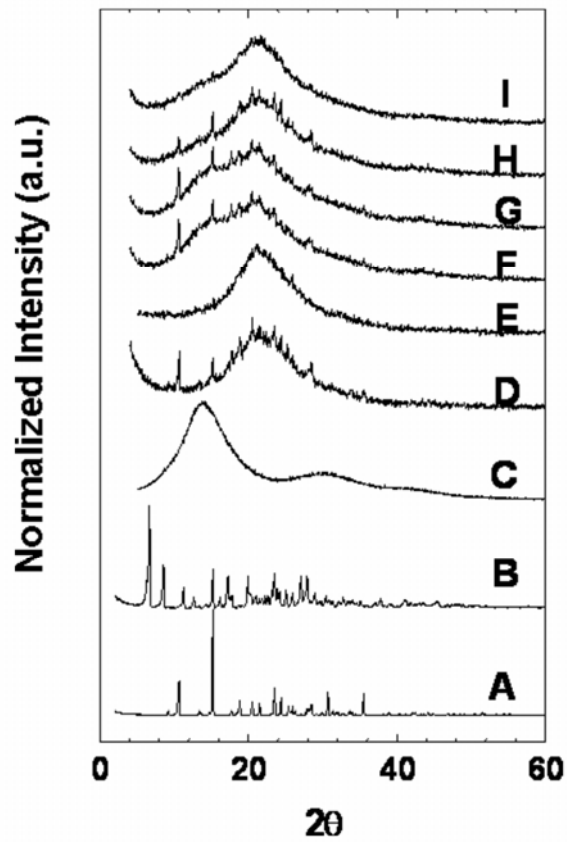


Figure 5. X-ray diffraction pattern of: (A) DicOH; (B) DicONa; (C) Eudragit S100<sup>®</sup>; (D) Uncoated core-DicOH; (E) Uncoated core-DicONa; (F) NS-coated-MP-DicOH; (G) NS-coated-MP-DicOH-triacetin; (H) NS-coated-MP-DicONa-1 and (I) NS-coated-MP-DicONa-2.

**CAPÍTULO 4:** Micropartículas revestidas a partir de suspensões de nanocápsulas: estudo morfológico

---

---



#### **4.1. INTRODUÇÃO**

No trabalho anterior foi confirmado o processo de revestimento das micropartículas orgânico-inorgânicas pelo emprego de suspensões de nanoesferas poliméricas. Esta confirmação foi obtida tanto pela redução da área superficial, quanto pelos resultados de tamanho das micropartículas e observação das nanoestruturas adsorvidas na superfície das micropartículas.

Neste capítulo, é apresentada a continuidade do estudo anterior, através da caracterização morfológica das micropartículas obtidas a partir de uma suspensão de nanocápsulas. Esta caracterização torna-se importante considerando-se que estas formulações apresentaram boas propriedades de gastrorresistência e liberação modificada (Capítulo 3), tanto pelo emprego do fármaco em sua forma hidrofílica quanto em sua forma hidrofóbica (neste caso, na presença de triacetina).



**PUBLICAÇÃO 4:** Nanocapsule-coated microparticles: a morphological study

Artigo em redação para ser submetido ao Journal of Drug Delivery Science and Technology

---

---





## Nanocapsule-coated microparticles: a morphological study

R. C. R. Beck<sup>a</sup>, A. R. Pohlmann<sup>a,b</sup>, M. I. Z. Lionzo<sup>b</sup>, T. M. H. Costa<sup>c</sup>, E. V. Benvenutti<sup>c</sup>, M. I. Ré<sup>d</sup>, M. R. Gallas<sup>e</sup>, S. S. Guterres<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil (e-mail:[nanoc@farmacia.ufrgs.br](mailto:nanoc@farmacia.ufrgs.br))

<sup>b</sup> Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEP 15003), 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Sólidos e Superfície, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>d</sup> Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S.A., Divisão de Química, CP 0141, 01064-970, São Paulo, SP, Brazil

<sup>e</sup> Departamento de Física, Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

## **ABSTRACT**

The application of polymeric colloidal suspensions as coating material to prepare nanoparticle-coated microparticles was recently reported by our research group. The use of different colloidal systems led to products with different physicochemical characteristics. A promising control of the diclofenac release was demonstrated by using nanocapsules as the coating material compared to the use of nanospheres suspension. In the present work we carried out a specific morphological study of these microparticles prepared with nanocapsules and we evaluated the integrity of the nanostructures after the application of a compression force. The particle sizes ranged from 6 to 15  $\mu\text{m}$  and the presence of nanostructures on the surface of the microparticles observed by SEM analyses led to a reduction in the surface area of the nanocapsule-coated formulations (151 and 163  $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ ) in relation to the respective uncoated cores (60 and 50  $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ ). The optical microscopy and X-ray analyses showed the presence of crystals in all diclofenac-loaded formulations, except in the sodium diclofenac-loaded uncoated core. The feasibility to convert this microparticles into tablets was demonstrated by the application of a compression force. The nanostructures remained intact on the surface and in the inner compartment of the tablets.

## I. INTRODUCTION

There has been explosive growth of nanoscience and nanotechnology in the last decade, because of the availability of the methods of synthesizing, as well as recent tools for characterizing and manipulating the nanoparticles in different scientific areas [1]. In the pharmaceutical field, polymeric nanocapsules (NC) in aqueous suspensions are defined as an oil core surrounded by a thin polymer layer [2]. On the other hand, nanospheres are considered drug carriers constituted by a polymeric matrix. Both systems are studied as alternatives to increase the drug efficacy, to decrease the drug toxicity and/or to develop prolonged release drug delivery systems [3]. Several works in the literature showed the application of these systems as drug carriers for anticancers, peptides, anti-inflammatories and antibiotics drugs [3-9]. Nanosized suspensions (nanocapsules or nanospheres) can be prepared following different methods described in the literature [4], as the interfacial polymerization [10], the preformed polymer precipitation (nanoprecipitation) [11] and the emulsification-diffusion [12].

However, these colloidal suspensions presented some disadvantages during storage, such as microbiological contamination, polymer hydrolysis and physico-chemical instability due to the particle agglomeration and sedimentation [13]. In order to overcome these disadvantages, our group has developed a spray-drying technique to convert this drug-loaded NC aqueous suspension in a powder, using the colloidal silicon dioxide as a drying adjuvant [13-17]. The morphological analysis of these powders showed the presence of nanostructures on their particle surface [14, 18]. Other works showed the decrease of gastrointestinal toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs entrapped in these powders and their potential as controlled delivery systems, as observed for diclofenac, by an increasing in its half-time plasma concentration [19].

More recently [20] we have developed another strategy to prepare microparticles using the spray-drying technique. In this case, the feasibility to prepare nanoparticle-coated microparticles, using polymeric unloaded-nanoparticle suspension (nanocapsules or nanospheres) as coating material was demonstrated. This technique allowed preparing polymeric microparticles without the use of organic solvents at the coating step, decreasing the environmental toxicity and the explosion risk. As the drug is in the inorganic microparticle core (drug and silicon dioxide), another advantage of this technique is its higher drug load capacity if compared with the former systems, where the drug is entrapped in the nanoparticles. These microparticles presented nanostructures adsorbed on their surfaces and they showed a modified diclofenac release (drug model), either in its hydrophilic form or in its hydrophobic form.

The use of different polymeric colloidal systems (nanocapsules or nanospheres) in the preparation of nanoparticle-coated microparticles can lead to products presenting significant differences in their behaviour as observed in our previous work [20]. Regarding the release profiles of the drug from the formulations it was verified a promising behavior for some microparticles coated by nanocapsules in comparison to those coated by the nanospheres [20]. Despite the advantages showed for the nanocapsule-coated microparticles in control the diclofenac release, both in its hydrophobic or hydrophilic form, no specific study concerning their morphological characterization was carried out up to now. In this way, the aim of this paper was to characterize different nanocapsule-coated diclofenac-loaded microparticles, in terms of scanning electron and optical microscopy, X-ray diffraction, particle size, surface area and pore size distribution. In addition, we evaluated the integrity of the nanocoating layer after the application of a compression force to convert these powders into tablets.

## II. MATERIALS AND METHODS

### 1. Materials

Diclofenac (sodium salt) was obtained from Sigma (St. Louis, USA); Eudragit S100<sup>®</sup> (EUD) was supplied from Almapal (São Paulo, Brazil); sorbitan monostearate (Span 60<sup>®</sup>) and polysorbate 80 (Tween 80<sup>®</sup>) were supplied by Delaware (Porto Alegre, Brazil). Colloidal silicon dioxide (Aerosil 200<sup>®</sup>) and the caprylic/capric triglyceride (Miglyol 810<sup>®</sup>) were acquired from Degussa (São Paulo, Brazil) and Huls (Puteaux, France), respectively. Avicel<sup>®</sup> PH-101 (microcrystalline cellulose) and Ac-Di-Sol<sup>®</sup> (cross-linked carboxymethylcellulose) were obtained from FMC (Philadelphia, USA). All other chemicals and solvents presented pharmaceutical grade and they were used as received.

### 2. Preparation of Free Acid Form of Diclofenac

An aqueous solution (400 mL) of sodium diclofenac (3.0 g, 9.43 mmol) was acidified with 5 mol.L<sup>-1</sup> HCl (5 mL). The precipitate (free acid form of diclofenac) was filtered and recrystallized from ethanol/water 1:1 (v/v). Colorless crystals were obtained with 90% of yield and characterized by infrared analysis (FT-IR 8300, Shimadzu, Tokyo, Japan). IR ( $\nu$ , cm<sup>-1</sup>): 3322 (NH), 2940 (br, OH), 1694 (CO), 1587 (C=C), 1507 and 1453 (Ar), 1160 (C-O).

### 3. Preparation and Characterization of Nanoparticle Suspensions

Nanocapsules (NC) were prepared by the nanoprecipitation method, as described by Fessi and co-workers [11]. The lipophilic solution consisted of Span 60<sup>®</sup> (0.1532 g), Eudragit S100<sup>®</sup> (1.0 g), Miglyol 810<sup>®</sup> (3.30 mL) and acetone (267.0 mL). This organic phase was added under moderate magnetic stirring to an aqueous solution (533.0 mL) containing Tween 80<sup>®</sup> (0.1532 g). The mixture was stirred for 10 min at room temperature. Thus, the acetone was eliminated

and the aqueous phase concentrated by evaporation under reduced pressure. The final volume was adjusted to 100 mL, corresponding to a polymer concentration of 10 mg.mL<sup>-1</sup>. The nanocapsule suspension was characterized by pH measurements (Micronal, B-474, São Paulo, Brazil) and by particle size determination using photon correlation spectroscopy (PCS) after the dilution of samples (500 times) with water (Milli-Q<sup>®</sup>). The scattered light was observed at an angle of 90° (Brookhaven Instruments, goniometer BI-200M/2.0 version, Holtsville, USA; BI9863 detection system; Laser He-Ne source 35 mW, 127 model,  $\lambda = 632.8$  nm, Spectra Physics, Mountain View, USA).

#### **4. Preparation of Hydrophilic Drug-Loaded Microparticles**

To obtain the core of the microparticles (uncoated core-DicONa), the sodium diclofenac (0.270 g or 0.7 mmol) was dissolved in water (50 mL) and added of the Aerosil 200<sup>®</sup> (1.5 g). The mixture was fed into a mini-spray-dryer Büchi 190<sup>®</sup> (Flawil, Switzerland) with a two-component nozzle and co-current flow, to give a powder (the core), with a final concentration of DicONa of 0.48 mmol.g<sup>-1</sup> of core. The inlet temperature at the drying chamber was maintained around 170 °C  $\pm$  4 °C and the spray rate feed was 3 mL min<sup>-1</sup>. At the coating step, 1.5 g of the core material was rapidly dispersed into 50 mL of the NC aqueous suspension under magnetic stirring at room temperature. This mixture was also spray-dried as described above.

The nanocapsule-coated microparticles were also obtained by an one step process. Sodium diclofenac (0.230 g, 0.733 mmol) and the Aerosil 200<sup>®</sup> (1.270 g) were directly added to the NC aqueous suspension, under magnetic stirring at room temperature. This mixture was spray-dried as described above. The powders were called NC-coated-MP-DicONa-2 or NC-coated-MP-DicONa-1, respectively, according to the number of process steps involved in the preparation of the microparticles.

## 5. Preparation of Hydrophobic Drug-Loaded Microparticles

To obtain the core of the microparticles (uncoated core-DicOH), the diclofenac free acid (0.250 g, 0.7 mmol) was dissolved in acetone (50 ml) and added of the Aerosil 200<sup>®</sup> (1.5 g). The acetone was removed under reduced pressure to obtain a solid product, with a final concentration of diclofenac acid of 0.48 mmol.g<sup>-1</sup> of powder. This powder (the core) was maintained in a dessicator at room temperature during 48 h. At the coating step, 1.5 g of the core material, which correpond to 0.214 g (0.7 mmol) of diclofenac in 1.270 g of silicon dioxide, was carefully milled in a mortar for 10 min, and dispersed into 50 mL of the NC aqueous suspension under magnetic stirring at room temperature. The mixture was fed into a mini-spray-dryer Büchi 190<sup>®</sup> (Flawil, Switzerland), using the same operational conditions described above. The powder obtained was called NC-coated-MP-DicOH.

To study the influence of a plasticizer on the morphological characteristics of the microparticles, the triacetin [20 % (w/w) in relation to the polymer] was added to the nanoparticle suspensions, followed by the addition of the core under magnetic stirring during 10 min. After that, the mixture was spray-dried. The powder obtained was called NC-coated-MP-DicOH-triacetin.

## 6. Microparticles Characterization

### 6.1 Determination of Yield and Encapsulation Efficiency

The yields of the formulations were calculated by the sum of the weights of all components, discounting the content of water in the suspension. The powders (cores and nanoparticle coated microparticles) were dispersed in acetonitrile (DicOH-microparticles) or in buffer pH 7.4 (DicONa-microparticles) for 60 min at room temperature. The dispersions were centrifuged and filtered through a hydrophilic membrane (GVWP, 0.45 µm, Millipore) and

analyzed by HPLC [20]. The chromatographic system consisted of a Nova Pak<sup>®</sup> RP 18 – Waters column and a Perkin Elmer instrument (200 Series, Shelton, EUA). The mobile phase was prepared with acetonitrile/pH 5.0 phosphate buffer (50:50% v/v), and the flow was 1 mL.min<sup>-1</sup>. The volume injected was 20 µl and diclofenac was detected at 280 nm. The encapsulation efficiency of each formulation was calculated by the correlation of the theoretical and the experimental diclofenac concentrations and expressed as percentages.

## 6.2 Nitrogen-Isotherms

The solids were previously degassed under vacuum at 40 °C for 2 hours. The nitrogen adsorption-desorption isotherms were determined at liquid nitrogen boiling point in a home-made volumetric apparatus, using nitrogen as probe. The specific surface areas of microparticles were determined by the BET multipoint technique [21] and the pore size distribution was obtained using BJH method [22].

## 6.3 Scanning Electron Microscopy

The uncoated cores and the nanocapsule-coated microparticles were examined under scanning electron microscopy (SEM) (Jeol Scanning Microscope, JSM-5800, Tokyo, Japan), at 20 kV, employing different magnifications (between 1,000x and 95,000x). Samples were analyzed after they had been gold sputtered (Jeol Jee 4B SVG-IN, Tokyo, Japan).

## 6.4 Optical Microscopy

The uncoated core and the microparticles were examined after redispersion in water, phosphate buffer pH 7.4 or mineral oil. Photographs were taken for morphological analysis under a light microscope (Model BX-41, Olympus<sup>®</sup>, Japan) coupled with a photographic camera (Model PM-20, Olympus<sup>®</sup>, Japan) at a magnification of 120x.



## 6.5 Particles Size Distribution and Average Diameter

The particle size distribution was determined by laser diffractometry with a Beckman Coulter - tornado (Beckman Instruments, USA) by dry dispersion. The mean diameter over the volume distribution ( $d_{4.3}$ ) was used as a particle size distribution parameter.

## 6.6 X-Ray Analyses

X-ray analyses were performed on the polymer, the drug (diclofenac acid and sodium diclofenac) and on the microparticles. Diffraction powder patterns were obtained with a Siemens diffractometer (model D500) using Cu K $\alpha$  radiation at 35 kV.

## 7. Preparation of Tablets

An amount of nanocapsule-coated microparticles (NC-coated-MP-DicOH) equivalent to 50 mg of diclofenac was mixed with Avicel pH 101 (0.2712 g) in a mortar. Colloidal silicon dioxide (1.0 %) and Ac-Di-Sol<sup>®</sup> (2.5 %) were added, and the mixed powder was directly tableted on a tableting machine (Korsch EK0, Germany) equipped with a concave punch. The tablet weighed 775 mg, with a hardness of 162 N (Tester PTZ-1, Schleuniger, Germany). The SEM analysis was carried out as described above. The tablet surface and its inner compartment after longitudinal breaking were analyzed.

## III. RESULTS AND DISCUSSION

In this work, diclofenac in its acid or salt forms were used as drug models (hydrophobic and hydrophilic, respectively). These two different forms were chosen to minimize the influence of chemical structure of drug on the nanocapsule-coated microparticles characteristics since they present the same skeleton. Also, the triacetin, a plasticizer largely employed in pharmaceutical field [23], was added in some formulations before spray-drying (NC-coated-MP-triacetin), in order to study its influence on the nanoparticle-coating process.

The aqueous nanocapsules (NC) suspensions prepared by the nanoprecipitation of Eudragit S100<sup>®</sup> were in the submicromic range ( $119 \pm 1$  nm), presenting acid pH values ( $3.71 \pm 0.03$ ). These nanocapsule formulations in aqueous suspension were used as nanostructured coating for drug-loaded microparticles. The nanocapsule-coated diclofenac-loaded microparticles were obtained with yields between 40 – 80 % and presented drug encapsulation efficiencies in the 75 – 112 % range. These characteristics of the microparticles were dependent of the hydrophobicity of the drug form (diclofenac acid or salt) and the number of steps involved in their preparation [20]. All samples presented a macroscopic aspect of powder.

The mean particle size and size ranges determined for the uncoated core and for the NC-coated microparticles are presented in Table 1. The NC-coated DicOH-loaded microparticles presented particle sizes greater than the respective uncoated core (NC-coated-MP-DicOH: 10.11  $\mu\text{m}$ , NC-coated-MP-DicOH-triacetin: 14.90  $\mu\text{m}$  and uncoated core-DicOH: 7.27  $\mu\text{m}$ ). On the other hand, the NC-coated DicONa-loaded microparticles presented a slightly decrease in the particle size in relation to the respective uncoated core (NC-coated-MP-DicONa-2: 9.24  $\mu\text{m}$ , NC-coated-MP-DicONa-1: 6.17  $\mu\text{m}$  and uncoated Core-DicONa: 11.07  $\mu\text{m}$ ). These values were satisfactory because microparticles with particle sizes below 10  $\mu\text{m}$  represent good candidates for oral administration [24]. SEM analyses of powders showed that the shape of microparticles is dependent of the method employed for the preparation of the formulation. The uncoated core-DicOH showed irregular microparticles, while the respective NC-coated

drug-loaded microparticles (NC-coated-MP-DicOH and NC-coated-MP-DicOH-triacetin) showed spheroid microparticles. On the other hand, the uncoated core-DicONa and its correspondent nanoparticle-coated microparticle (NC-coated-MP-DicONa-2 and NC-coated-MP-DicONa-1) presented homogeneous spherical shaped microparticles (Figure 1). At higher magnification, the uncoated cores (uncoated core-DicOH and uncoated core-DicONa) showed a rugged surface with the presence of some cavities (Figure 2, A and B). On the other side, nanostructures (170-200 nm) were observed on the surface of the NC-coated microparticles formulations (NC-coated-MP-DicOH, NC-coated-MP-DicOH-triacetin, NC-coated-MP-DicONa-2, NC-coated-MP-DicONa-1). Figure 2 (C and D) showed the surface of some of these formulations (NC-coated-DicOH-triacetin and NC-coated-MP-DicONa-2).

In order to determine the influence of the presence of the nanostructures on the surface of the microparticles, the surface area and the pore volume were determined by nitrogen adsorption-desorption using the BET and BJH methods. These results are also shown in Table 1.

Commercial silicon dioxide (Aerosil 200<sup>®</sup>) as well as the evaporated or spray-dried pure silicon dioxide were used to compare the results from the samples prepared by different methods. The evaporated silicon dioxide ( $175 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  and  $0.27 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ ) and the spray-dried silicon dioxide ( $180 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  and  $0.24 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ ) presented a decrease in the surface area in relation to the commercial silicon dioxide ( $214 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  and  $0.30 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ ). The uncoated drug-loaded cores presented a decrease in the surface areas compared to the evaporated and spray-dried pure silicon dioxide, without difference in the pore volumes (uncoated core-DicONa:  $151 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  and  $0.26 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ ; uncoated core-DicOH:  $163 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  and  $0.25 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ ). On the other hand, either the surface area as the pore volumes showed a great decrease after coating the cores using the nanocapsule suspension (NC-coated-MP-DicOH:  $60 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  and  $0.07 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ ; NC-coated-MP-DicOH-triacetin:  $60 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  and  $0.06 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ ; NC-coated-MP-DicONa-1:  $72 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  and  $0.08 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ ; NC-coated-MP-DicONa-2:  $50 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  and  $0.08 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ ). The use of a

plasticizer (triacetin) for the preparation of NC-coated DicOH-loaded microparticles did not cause a decrease in the surface area and pore volume, although its presence lead to a better control in the diclofenac release, as showed in our previous work [20]. This result are in agreement with our previous hypothesis to explain this lower drug release due to the saturation of the polymeric colloid with the plasticizer preventing the shift of the drug from the core to the coating [20].

In order to evaluate the influence of the presence of drug on surface area of powders a comparative spray-dried formulation was prepared by adding pure silicon dioxide into a nanocapsule suspension before the drying. The surface area of this nanocapsule-coated drug-unloaded microparticles was  $72 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ . This result showed that the decrease in surface areas of the nanocapsule-coated drug loaded microparticles is mainly due to the nanostructured coating. The drug presence did not show any influence on the surface area. The pore size distribution of uncoated cores and respective nanocapsule-coated microparticles were determined by using the BJH method [22]. In the mesoporous region (pore diameter between 2 and 50 nm) the nanocapsule-coated microparticles presented a decrease in the pore distribution in relation to the respective uncoated core-DicOH or uncoated Core-DicONa (data not showed). This reduction is associated with the decrease in the surface area, as commented above (Table 1). The presence of the organic material in the samples could cause a partial reduction in the nitrogen accessibility to the pores, consequently promoting a decrease in the surface area of microparticles.

The optical microscopy analyses of the uncoated cores and the respective microparticles dispersed in water showed spherical agglomerates for the DicONa-loaded microparticles and irregular agglomerates for the DicOH-loaded microparticles (Figure 3). Crystalline structures were observed only in the uncoated Core-DicOH. These crystals were further encapsulated

inside the core of the microparticles and their observation by SEM was not possible. After redispersion of these powders in pH 7.4, the crystalline structures were not visualized and the microparticles presented similar morphological characteristics as those observed after the redispersion in water.

In order to identify the crystals and to determine the physical state of the drug in the microparticles powders, X-ray analysis were performed. Figure 4 shows the X-ray diffraction patterns for the diclofenac acid (A), sodium diclofenac (B) and the polymer Eudragit S100 (C). The diffractograms from D to I are the experimental results from the different samples. It can be seen diffraction peaks in the DicOH-loaded microparticles (D, F, G, H, I) that correspond to the pattern of the diclofenac acid. These peaks are superimposed to the amorphous silica pattern, that has a very broad diffraction line at  $2\theta \approx 22^\circ$ . On the other hand, the uncoated core-DicONa diffractogram does not show any peak (E). This absence of crystallinity in the uncoated core indicated that de DicONa was amorphous or molecularly dispersed in the microparticles. The very broad diffraction line of the polymer (C) ( $2\theta \approx 13^\circ$ ) was also observed for the all nanocapsule-coated formulations (F-I). The presence of diclofenac acid crystals [diclofenac  $pK_a$  3.8 at 25 °C [22]] in the nanocapsule-coated DicONa-loaded formulations and its absence in the uncoated core-DicONa suggested that the DicONa presented in the uncoated core has been partially protonated after its dispersion in the nanocapsule suspension ( $pH 3.71 \pm 0.03$ ). The diffraction peaks of DicOH observed for uncoated core-DicOH, NC-coated-MP-DicOH and NC-coated-MP-DicOH-triacetin confirmed that the crystals observed by optical microscopy correspond to the drug in its acid form.

Finally, we demonstrated the feasibility of application of a compression force to convert nanocapsule-coated microparticles into solid dosage forms, as tablets, without change in their integrity. Figure 5 shows the morphological analyses by SEM of tablets prepared with the

NC-coated-MP-DicOH. The images showed clearly the presence of the nanostructured material (170 - 200 nm) so much in the surface as in the inner compartment of the tablet.

#### **IV. CONCLUSION**

Hydrophobic or hydrophilic drug-loaded NC-coated microparticles presented a particle size in the range between 6 and 15  $\mu\text{m}$  and different shapes depending on the processes involved in their preparation (evaporation under reduced pressure and/or spray-drying). The presence of the nanostructures adsorbed on the surface of the microparticles forming a coating layer leads to a decrease in their surface area, pore volume and pore volume distribution, independently of the drug model. The optical microscopy analyses associated to X-ray analyses showed the presence of crystals in all diclofenac-loaded formulations, excepting in the uncoated core-DicONa. The integrity of the nanostructures present on the surface of the microparticles after the application of a compression force was demonstrated by SEM analyses, which showed intact nanostructured material on the surface and in the inner compartment of the tablets. These results present the possibility to study the use of these microparticles in the development of oral controlled drug delivery systems.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

RCRB thanks Capes for his research grant. The authors thank the financial support of FAPERGS, CNPq and Rede de Nanobiotecnologia/CNPq/MCT-Brazil.

## REFERENCES

1. RAO C. N. R., CHEETHAM A. K.- Science and technology of nanomaterials: current status and future prospects - J. Mater. Chem., **11**, 2887-2894, 2001.
2. SCHAFFAZICK S. R., DE FREITAS L. L., POHLMANN A. R., GUTERRES S. S. - Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos - Quím. Nova, **26**, 726-737, 2003.
3. COUVREUR P., DUBERNET C., PUISIEUX F. - Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends - Eur. J. Pharm. Biopharm., **41**, 2-13, 1995.
4. COUVREUR P., BARRAT G., FATTAL E., LEGRAND P, VAUTHIER C - Nanocapsule technology: a review - Critical Reviews<sup>TM</sup> in Therapeutic Drug Carrier Systems, **19**, 99-134, 2002.
5. RAVI KUMAR M. N. V., SAMETI M., M., KNEUER C., LAMPRECHT A., LEHR C.-M - Polymeric nanoparticles for drug delivery and gene delivery - Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology, **9**, 1-19, 2004.
6. MU L., FENG S. S. - A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS - J. Control. Release, **86**, 33-48, 2003.
7. LBOUTOUNNE H., CHAULET J-F., PLOTON C., FALSON F., PIROT F. - Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanocapsule encapsulated forma and as a digluconate J. Control. Release, **82**, 319-334, 2002.

8. MIYAZAKI S., TAKAHASHI A., KUBO W. - Poly n-butylcyanoacrylate (PNBCA) nanocapsules as a carrier for NSAIDs: in vitro release and in vivo skin penetration - J. Pharm. Pharmaceut. Sci., **6**, 240-245, 2003.
9. GUTERRES S. S., FESSI H., BARRAT G., DEVISSAGUET J. P., PUISIEUX F. - Poly(d,l-lactide) nanocapsules containing non-steroidal anti-inflammatory drugs: gastrointestinal tolerance following intravenous and oral administration - Int. J. Pharm., **113**, 57-63, 1995.
10. AL KHOURY N. F., ROBLOT-TREUPEL L., FESSI H., DEVISSAGUET J. P., PUISIEUX F. – Development of a new process for the manufacture of polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules - Int. J. Pharm., **28**, 125-132, 1986.
11. FESSI H., PUISIEUX F., DEVISSAGUET J.-PH. - Procédé de préparation des systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules - European Patent 0274961 A1, 1988
12. QUINTANAR-GUERRERO D., ALLEMANN E., FESSI H., DOELKER E. – Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers - Drug Dev. Ind. Pharm., **24**, 1113-1128, 1998.
13. MAGENHEIM B., BENITA S. - Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach - S.T. P. Pharma Sci., **1**, 221-241, 1991.
14. MÜLLER C. R., BASSANI V. L., POHLMANN A. R., MICHALOWSKI C. B., P. PETROVICK R., GUTERRES S. S. - Preparation and characterization of spray-dried polymeric nanocapsules - Drug Dev. Ind. Pharm., **26**, 343-347, 2000.
15. GUTERRES S. S., POHLMANN A. R., DALLA-COSTA T., BASSANI V. L., MULLER C. R. - *Br INPI 9906081-7*, 1999.
16. GUTERRES S. S., POHLMANN A. R., DALLA-COSTA T., BASSANI V. L., MULLER C. R. - *French Patent 0015084*, 2000.



17. POHLMANN A. R., WEISS V., MERTINS O., PESCE DA SILVEIRA N., GUTERRES S. S. - Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models - Eur. J. Pharm. Sci., **16**, 305-312, 2002.
18. MÜLLER C. R., SCHAFFAZICK S. R., POHLMANN A. R., DE LUCCA FREITAS L., PESCE DA SILVEIRA N., DALLA COSTA T., GUTERRES S. S. - Spray-dried diclofenac-loaded poli( $\epsilon$ -caprolactone) nanocapsules and nanospheres. preparation and physicochemical characterization - Pharmazie, **56**, 864-867, 2001.
19. GUTERRES S. S., MÜLLER C. R., MICHALOWSKI C. B., POHLMANN A. R., DALLA COSTA T. - Gastro-intestinal tolerance following oral administration of spray-dried diclofenac-loaded nanocapsules and nanospheres - S.T.P. Pharma Sci., **11**, 229-233, 2001.
20. BECK R. C. R., POHLMANN A. R., GUTERRES S. S. – Nanoparticle-coated microparticles: preparation and characterization - J. Microencapsulation, **21**, 499-512, 2004.
21. BRUNAUER S., EMMET P. H., TELLER E.- Adsorption of gases in multimolecular layers - J. Chem. Soc., **60**, 309-319, 1938.
22. BARRET E. P., JOYNER L. G., HALENDA P. P. - The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms - J. Am. Chem. Soc., **73**, 373-376, 1951.
23. A. H. KIBBE, Handbook of Pharmaceutical Excipients, Pharmaceutical Press, London, England, 2000.
24. DESAI M. P., LABHASETWAR V., AMIDON G. L., LEVY R. J. - Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size - Pharm. Res., **13**, 1838-1845, 1996.

## FIGURE CAPTIONS

Figure 1. SEM micrographs (width = 132  $\mu\text{m}$ ) of drug-loaded microparticles: (A) uncoated core-DicOH, (B) uncoated core-DicONa, (C) NC-coated-MP-DicOH-triacetin and (D) NC-coated-MP-DicONa-2.

Figure 2. SEM micrographs (width = 2.93  $\mu\text{m}$ ). of drug-loaded microparticles: (A) uncoated core-DicOH, (B) uncoated core-DicONa, (C) MP-NC-DicOH-triacetin and (D) MP-NC-DicONa-2.

Figure 3. Light micrographs at a magnification  $\times 120$  of DicOH and DicONa-drug loaded microparticles, after redispersion in water: (A) uncoated Core-DicOH; (B) uncoated Core-DicONa; (C) NC-coated-MP-DicOH; (D) NC-coated-MP-DicOH-triacetin; (E) NC-coated-MP-DicONa-1; (F) NC-coated-MP-DicONa-2.

Figure 4. X-ray diffraction pattern of: (A) DicOH; (B) DicONa; (C) Eudragit S100<sup>®</sup>; (D) uncoated core-DicOH; (E) uncoated core-DicONa; (F) NC-coated-MP-DicOH; (G) NC-coated-MP-DicOH-triacetin; (H) NC-coated-MP-DicONa-1 and (I) NC-coated-MP-DicONa-2.

Figure 5. SEM micrographs of tablets: (A) and (B) tablet surface (132  $\mu\text{m}$  and 2.93, respectively); (C) and (D) inner compartment (132  $\mu\text{m}$  and 2.93  $\mu\text{m}$ , respectively).

Table 1. Morphological characteristics of the organic-inorganic loaded microparticles.

Sample	Mean	Distribution of			Surface area (m <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup> )	Pore volume (cm <sup>3</sup> .g <sup>-1</sup> )	
	Volume	particles sizes					
	diameter	d <sub>4.3</sub>	d <sub>0.9</sub>	d <sub>0.1</sub>			<10
	(μm)	(μm)	(μm)	μm (%)			
Uncoated core - DicONa	11.07	27.99	2.50	63.6	163 ± 08	0.250 ± 0.010	
Uncoated core - DicOH	7.27	12.74	2.75	71.7	151 ± 08	0.260 ± 0.010	
NC-coated-MP-DicOH	10.11	25.59	1.14	64.6	60 ± 03	0.070 ± 0.005	
NC-coated-MP-DicOH-triacetin	14.90	33.93	1.66	45.1	60 ± 03	0.060 ± 0.005	
NC-coated-MP-DicONa-1	9.24	21.50	1.47	63.1	72 ± 04	0.080 ± 0.005	
NC-coated-MP-DicONa-2	6.17	12.00	1.24	81.5	50 ± 02	0.070 ± 0.005	

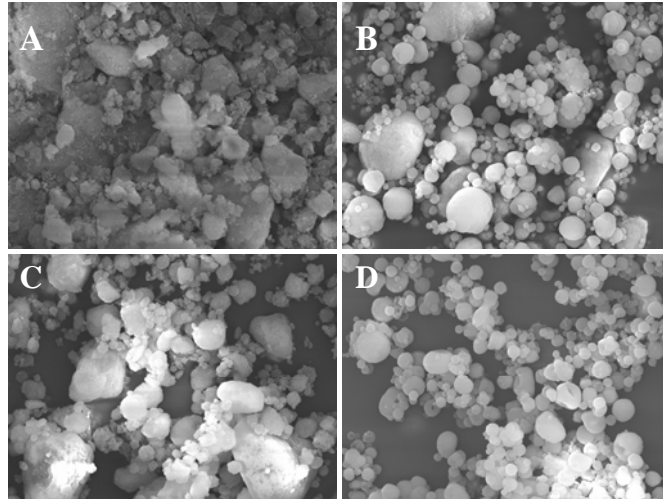


Figure 1. SEM micrographs (width = 132  $\mu\text{m}$ ) of drug-loaded microparticles: (A) uncoated core-DicOH, (B) uncoated core-DicONa, (C) NC-coated-MP-DicOH-triacetin and (D) NC-coated-MP-DicONa-2.

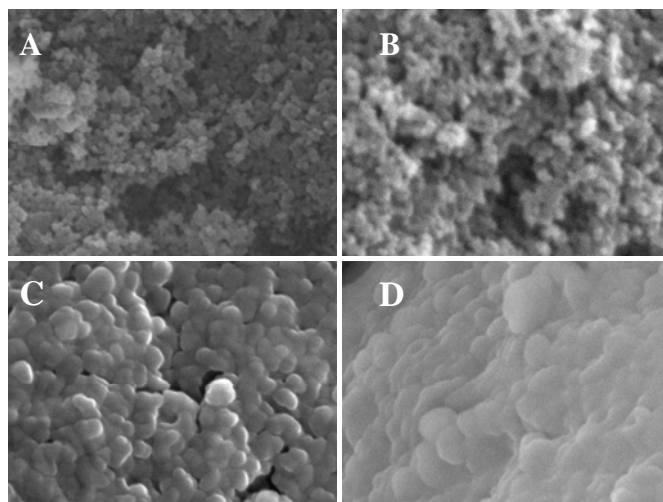


Figure 2. SEM micrographs (width = 2.93  $\mu\text{m}$ ). of drug-loaded microparticles: (A) uncoated core-DicOH, (B) uncoated core-DicONa, (C) MP-NC-DicOH-triacetin and (D) MP-NC-DicONa-2.

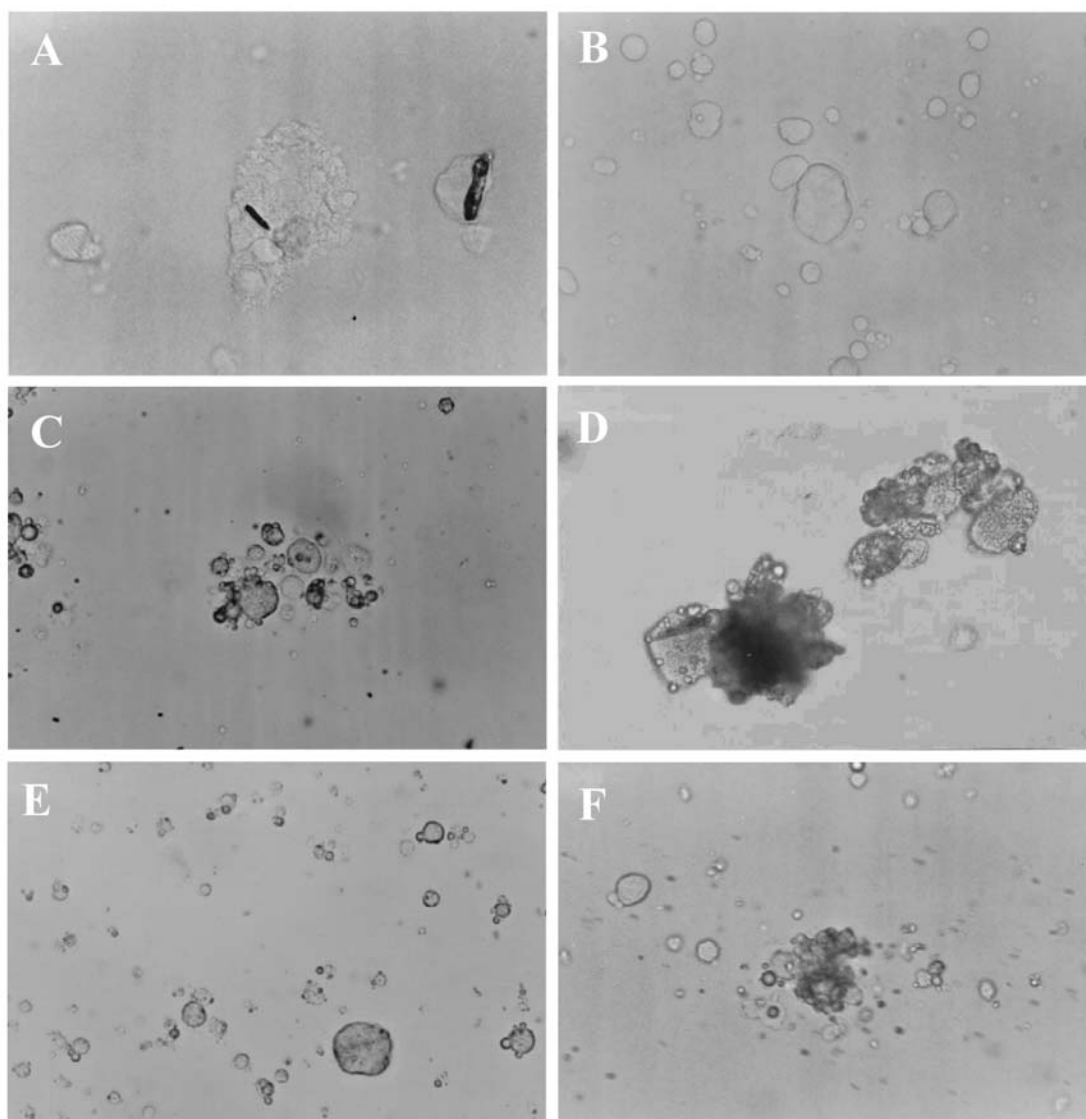


Figure 3. Light micrographs at a magnification x 120 of DicOH and DicONa-drug loaded microparticles, after redispersion in water: (A) uncoated Core-DicOH; (B) uncoated Core-DicONa; (C) NC-coated-MP-DicOH; (D) NC-coated-MP-DicOH-triacetin; (E) NC-coated-MP-DicONa-1; (F) NC-coated-MP-DicONa-2.

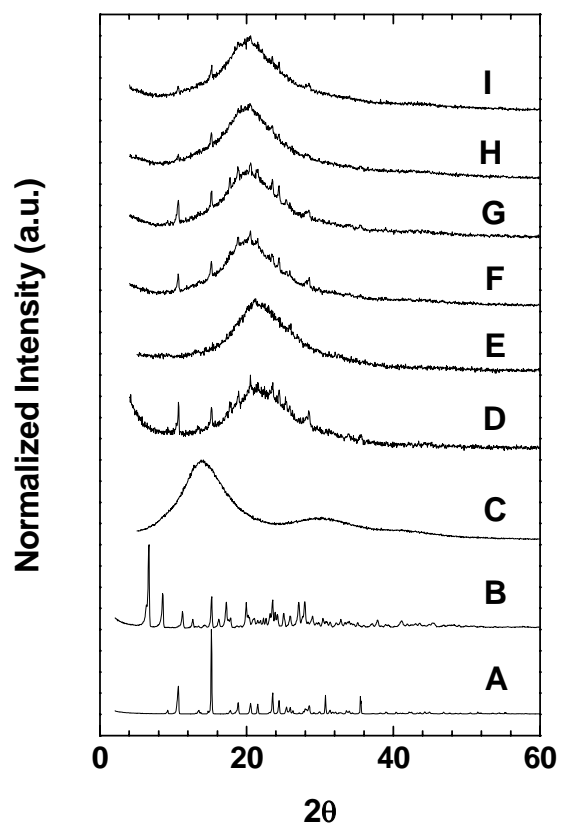


Figure 4. X-ray diffraction pattern of: (A) DicOH; (B) DicONa; (C) Eudragit S100<sup>®</sup>; (D) uncoated core-DicOH; (E) uncoated core-DicONa; (F) NC-coated-MP-DicOH; (G) NC-coated-MP-DicOH-triacetin; (H) NC-coated-MP-DicONa-1 and (I) NC-coated-MP-DicONa-2.

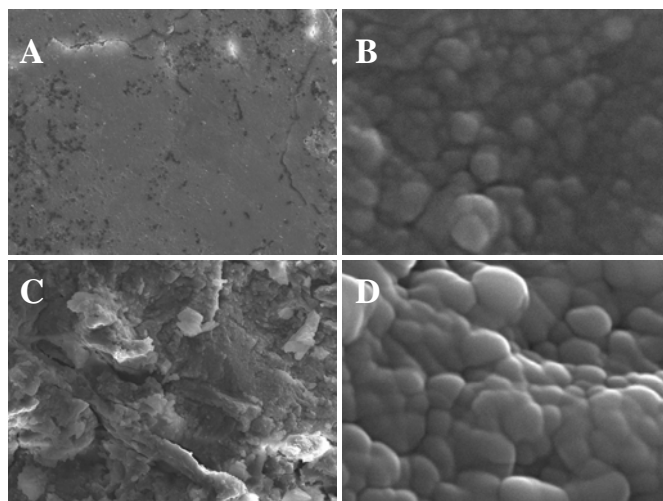


Figure 5. SEM micrographs of tablets: (A) and (B) tablet surface (132  $\mu\text{m}$  and 2.93, respectively); (C) and (D) inner compartment (132  $\mu\text{m}$  and 2.93  $\mu\text{m}$ , respectively).



**CAPÍTULO 5:** Micropartículas nanorrevestidas obtidas a partir de uma dispersão polimérica: preparação, caracterização, liberação *in vitro* e avaliação da tolerância gastrintestinal *in vivo*

---

---



## **5.1. INTRODUÇÃO**

Nos capítulos anteriores foi apresentada a preparação e a caracterização físico-química e biológica de micropartículas orgânica-inorgânicas revestidas a partir de suspensões coloidais poliméricas (nanopartículas poliméricas). Os materiais de revestimento (nanopartículas) avaliados até este momento foram nanoesferas e nanocápsulas. Os resultados mostraram significativas diferenças na estrutura e características das micropartículas obtidas, de acordo com o material de revestimento.

A partir do exposto, este capítulo apresenta a preparação de micropartículas nanorevestidas utilizando outro material de revestimento nanoestruturado, composto por uma dispersão polimérica obtida de maneira simples e rápida, sem a utilização de solventes orgânicos. A partir do sucesso da preparação desta formulação, foi realizada a sua caracterização físico-química e avaliação da tolerância gastrointestinal.



**PUBLICAÇÃO 5:** Nanostructure-Coated Diclofenac-loaded  
Microparticles: Preparation, Morphological Characterization, *in vitro*  
Release and *in vivo* Gastrointestinal Tolerance

Aceito para publicação no Journal of the Brazilian Chemical Society

---

---



Nanostructure-coated Diclofenac-loaded Microparticles: Preparation, Morphological Characterization, *in vitro* Release and *in vivo* Gastrointestinal Tolerance

Ruy C. R. Beck<sup>a</sup>, Adriana R. Pohlmann<sup>a,b</sup>, Edilson V. Benvenuti<sup>c</sup>, Teresa Dalla Costa<sup>a</sup>, Sílvia S. Guterres<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga, 1752, Porto Alegre, 90610-000, RS, Brazil. Telephone: 55 51 33165500, Fax: 55 51 33165437 (e-mail: nanoc@farmacia.ufrgs.br)

<sup>b</sup> Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CP 15003, Porto Alegre, 91501-970, RS, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Química Inorgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CP 15003, Porto Alegre, 91501-970, RS, Brazil

## Nanostructure-coated Diclofenac-loaded Microparticles: Preparation, Morphological Characterization, *in vitro* Release and *in vivo* Gastrointestinal Tolerance

### Resumo

Micropartículas com revestimento nanoestruturado, contendo diclofenaco, foram preparadas e caracterizadas apresentando um rendimento de 80 % e taxa de encapsulação de 83 %. A análise morfológica (MEV) permitiu a visualização de nanoestruturas adsorvidas à superfície das micropartículas, que apresentaram uma diminuição da área superficial e do volume de poros em relação ao núcleo. A liberação *in vitro* do fármaco (pH 5,0 e 7,4) mostrou eficiência de dissolução de 34 % e 78 % (núcleo), 74 % e 83 % (mistura física), e 58 % e 85 % (micropartículas nanorrevestidas), respectivamente. A modelagem matemática mostrou os modelos biexponencial (pH 5,0) e monoexponencial (pH 7,4) como aqueles que melhor descreveram os perfis de liberação. A administração oral em ratos demonstrou o efeito protetor destas micropartículas frente à toxicidade gastrointestinal do diclofenaco, sugerindo que esta estratégia de revestimento apresenta um emprego potencial no desenvolvimento de sistemas de administração oral de fármacos.

### Abstract

This work reports the preparation and characterization of polymeric nanostructure-coated diclofenac-loaded microparticles. After spray-drying, powders presented 80 % of yield and encapsulation efficiency of 83 %. SEM analyses showed nanostructures adsorbed onto the surface of microparticles presenting surface area (BET) and pore volumes (BJH) ( $83 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $0.10 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ ) smaller than the uncoated core ( $163 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $0.25 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ ). *In vitro* drug release experiments at pH 5.0 and 7.4 showed dissolution efficiencies of 34 % and 78 % (uncoated core), 74 % and 83 % (physical mixture of raw materials), and 58 % and 85 % (nanostructure-



coated microparticles), respectively. Mathematical modeling of the dissolution profiles fitted a biexponential model at pH 5.0 and a monoexponential model at pH 7.4. After oral administration in rats, this powder showed a protective effect against the mucosal diclofenac damage, suggesting that the strategy of coating presents a potential use for oral administration of drugs.

Key-words: diclofenac, polymer, nanostructure-coating, microparticles, gastrointestinal tolerance.

## **Introduction**

In pharmaceutical field, coating techniques are largely employed in order to produce sustained release dosage forms for oral administration, as well as to protect the drug from inactivation or the gastrointestinal mucosa against drug damage. In general coating processes are carried out on single unit dosage forms, as tablets or capsules, after their production<sup>1</sup>.

Several reports in the literature showed that the coating of particles present more advantages compared to the coating of unit dosage forms<sup>2-4</sup>. These advantages are given by the more reproducible gastrointestinal transport, higher bioavailability, more uniformly spread out in the gastrointestinal tract and reduction of the local irritation<sup>3,5</sup>. The main methods useful in particle coating are: air suspension (Wurster process, fluid-bed dryer) centrifugation, spray-drying, coacervation (aqueous phase separation) and interfacial polymerization<sup>1</sup>. Coating systems using organic solvents offer some processing advantages such as low heat of vaporization, stability of water-soluble or moisture-sensitive drugs, and short processing time. However, safety precautions, environmental pollution and the economic advantages favor the use of systems using water as a solvent<sup>6-10</sup>.

Drug carriers have been developed by several approaches to increase the efficacy and/or to decrease the toxicity of drugs<sup>11-15</sup>. Regarding the oral administration, microparticles were widely proposed to carry drugs in the past 30 years<sup>16</sup>. In general, these systems consist of polymeric materials in which the drug is dispersed, entrapped, dissolved or adsorbed<sup>11,17</sup>.

An easy method for preparing microparticulated delivery systems is the spray-drying technique, which has been successfully employed as described in the literature<sup>5,8,18-21</sup>. This method is widely used in industrial processes to prepare conventional pharmaceutical or nutritional products<sup>22,23</sup>. In this way, spray-drying is an important method to develop new microparticulated systems at experimental scale that can allow an easy industrial transposition.

Recently our research group has developed a method to dry nanoparticulated aqueous suspensions by spray-drying<sup>24-27</sup>. These powders consist of microparticles of silicon dioxide (containing or not a drug) individually coated by polymeric nanoparticles (containing or not a drug) (Figure 1). In the past few years we were dedicated to characterize these new systems in order to understand their organization at molecular level, as well as their competence to control the drug release<sup>9,28-30</sup>.

[Insert Figure 1 about here]

The polymeric nanoparticles used to coat the inorganic microparticles can be prepared by nanoprecipitation or interfacial deposition of pre-formed polymers as previously described<sup>9,31-33</sup>. These methods generally employ an organic phase which is purged into an aqueous phase. The organic solvent is evaporated and the water concentrated by distillation under reduced pressure.

This work reports an inedited approach for the preparation of new nanostructure-coated microparticles by spray-drying from a buffered aqueous suspension. The formulation is based on the use of nanostructured Eugragit S100<sup>®</sup> as coating material of a core composed by the drug (diclofenac) and the silicon dioxide. The major advantages of this new microparticulated system are the absence of organic solvent either in the preparation of the polymeric nanostructure suspension or in the coating step, as well as the production of a new material in which each microparticle is individually coated. The new formulation was characterized in terms of powder yield, encapsulation efficiency, morphology, *in vitro* drug release and *in vivo* gastrointestinal tolerance.

## **Materials and Methods**

### **Materials**

Diclofenac (sodium salt) was obtained from Sigma (St. Louis, EUA); Eudragit S100<sup>®</sup> (EUD) was supplied from Almapal (São Paulo, Brazil). Colloidal silicon dioxide (Aerosil 200<sup>®</sup>) was acquired from Degussa (São Paulo, Brazil). All others chemicals and solvents presented pharmaceutical grade and were used as received.

#### Preparation of Free Acid Form of Diclofenac

An aqueous solution (400 mL) of sodium diclofenac (3.0 g, 9.43 mmol) was acidified with 5 M HCl (5 mL) and the precipitate (free acid form of diclofenac) was filtered and recrystallized from ethanol/water 1:1 (v/v). Colorless crystals were obtained with 90% of yield and characterized by infrared analysis (FT-IR 8300, Shimadzu, Tokyo, Japan).

IR ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3322 (NH), 2940 (br, OH), 1694 (CO), 1587 (C=C), 1507 and 1453 (aromatic rings), 1160 (C-O).

#### Preparation of the Core

To obtain the core of the microparticles (uncoated core), 50 mL of a diclofenac (free acid) acetone solution ( $5.00 \text{ mg.mL}^{-1}$  or  $0.34 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) were added of Aerosil 200<sup>®</sup> (1.5 g). The acetone was removed under reduced pressure to obtain a solid product. This powder (the core) was maintained in a dessiccator at room temperature for 48 h.

#### Preparation and Characterization of the Nanostructure Suspension

A polymeric dispersion was prepared using the EUD (1.0 g) and phosphate buffer pH 7.4 (100 mL). This suspension was used as coating material for producing polymeric-coated microparticles (MP).

The particle size was measured by photon correlation spectroscopy (PCS) after dilution of samples with water (Milli-Q<sup>®</sup>). The scattered light was observed at an angle of 90° (Brookhaven Instruments, goniometer BI-200M/2.0 version, Holtsville, USA; BI9863 detection system; Laser He-Ne source 35 mW, 127 model,  $\lambda = 632.8$  nm, Spectra Physics, Mountain View, USA).

#### Preparation of Nanostructure-Coated Microparticles

The core material (1.5 g) was carefully milled in a mortar for 10 min, and dispersed into 50 mL of the nanostructure suspension under magnetic stirring at room temperature. The mixture was fed into a mini-spray-dryer Büchi 190<sup>®</sup> (Flawil, Switzerland) with a two-component nozzle and co-current flow (Air flow rate: 500 NL/h; Atomizing air pressure: 2 bar). The inlet air temperature and feeding spray rate varied according to preliminary experiments. The powder was designed MP.

A physical mixture consisted of Aerosil 200<sup>®</sup> (1.27 g) and sodium diclofenac (0.72 mmol) was prepared as control.

#### Determination of Yield and Encapsulation Efficiency

The yield of the formulation was calculated by the sum of the weights of all components, discounting the content of water from the nanostructure suspension.

The powders (cores and polymeric nanostructure-coated microparticles) were dispersed in phosphate buffer pH 7.4 for 60 min, at room temperature, followed by the centrifugation of the mixtures. Then, the supernatants were appropriately diluted with mobile phase and filtered through a hydrophilic membrane (GVWP, 0.22  $\mu\text{m}$ , Millipore). The samples were analyzed by HPLC. The chromatographic system consisted of a Lichrospher<sup>®</sup> column RP 18 (250 x 4

mm, Merck, Darmstadt, Germany) and a Perkin Elmer instrument (200 Series, Shelton, EUA). The mobile phase consisted of acetonitrile/pH 5.0 phosphate buffer (60:40 % v/v) with a flow rate of 1.2 mL.min<sup>-1</sup>. The volume injected was 20 µL. Diclofenac was detected at 280 nm.

The encapsulation efficiency of each formulation was calculated by the correlation of the theoretical and the experimental diclofenac concentrations and expressed as percentages (%). The HPLC method was validated according to the following characteristics: linearity, range, precision, accuracy and specificity<sup>34,35</sup>. This method is linear ( $r^2 = 1$ ) in the range of 3 – 15 µg.mL<sup>-1</sup>, accurate (100.04 ± 6.40 % – 101.56 ± 3.25 %) and precise (DPR: 1.25 – 1.57 % and 1.47 and 1.91 %, for repeatability and intermediate precision, respectively).

## Morphological Characterization

### *Scanning Electron Microscopy*

The uncoated core and the MP formulation were examined under scanning electron microscopy (SEM) (Jeol Scanning Microscope, JSM-5800, Tokyo, Japan) at different magnifications between 1,000 and 90,000 times. Samples were analyzed after they had been gold sputtered (Jeol Jee 4B SVG-IN, Tokyo, Japan).

### *Surface Area and Pore Size Distribution*

The nitrogen adsorption-desorption isotherms of previous degassed organic-inorganic solids, under vacuum at 40 °C, were determined at liquid nitrogen boiling point in a home-made volumetric apparatus, using nitrogen as probe. The specific surface areas of powders were determined by the BET multipoint technique<sup>36</sup> and the pore size distribution was obtained using BJH method<sup>37</sup>.

### *In Vitro* Drug Release

The *in vitro* drug release experiments were carried out using a flow-through cell technique. The apparatus consisted by recycling flow-through cells (Desaga, Wiesloch, Germany) connected to a peristaltic pump (Desaga, Wiesloch, Germany). The flow rate was 1 mL.min<sup>-1</sup>. Release experiments were carried out at 37 ± 0.5 °C, using dissolution media at pH 5.0 or pH 7.4 (phosphate buffer). An exact amount of each powder (equivalent to 6.80 x 10<sup>-3</sup> mmol of diclofenac) was placed in each cell. Samples were collected at predetermined time intervals, diluted (if necessary), and filtered through a hydrophilic membrane (GVWP, 0.22 µm, Millipore) for HPLC analyses. Experiments were carried out in triplicate.

The dissolution profiles of diclofenac from microparticles were analyzed by: a) ANOVA-based method (point to point comparison); b) Model-dependent methods, MicroMath Scientist<sup>®</sup> software, Salt Lake City, USA); and c) Model-independent method (dissolution efficiency - DE).

### *In vivo* Gastrointestinal Tolerance

Experiments were carried out on male Wistar rats, weighing between 250 and 350 g (Biotério Central, UFRGS, Porto Alegre, Brazil). The animals were divided into groups of ten. The groups were kept in separate cages and the rats were allowed to eat and drink *ad libitum*. The sodium diclofenac aqueous solution and diclofenac-loaded formulations (uncoated-core, physical mixture of raw materials and MP) were given at a dose of 20 mg.kg<sup>-1</sup> by the intragastric route. The solution and formulations were administered daily for 3 consecutive days. Twenty-four hours after the third administration, the rats were decapitated following laparotomy. In order to quantify gastrointestinal lesions, the stomach was opened along the

greater curvature and the intestine (duodenum, jejunum and ileum) was slit open opposite the attached mesenteric tissue. The organs were washed with normal saline (0.9 % NaCl) to remove luminal contents and the mucosal surfaces were examined. Lesions were scored for each organ according to an arbitrary scale as previously reported<sup>38</sup>. The mean organ lesional index was calculated for each organ in all animals of the same group and then dividing the total lesional score sum by the number of animals in each group. Statistical comparisons of the gastrointestinal lesional indexes in rats were conducted using the Kruskal-Wallis analysis of variance by rank.

## **Results and Discussion**

### Preparation and Characterization of Nanostructure-Coated Microparticles

The core of microparticles consisted of diclofenac (free acid) and silicon dioxide. The uncoated core was obtained with a yield of approximately 100 % by an evaporation process and presented an encapsulation efficiency of  $91.03 \pm 3.57$  %.

Eudragit S100<sup>®</sup> is generally used to produce modified release systems due to its gastric resistance<sup>39</sup>. In this work, the nanostructured suspension of Eudragit S100<sup>®</sup> was proposed for coating the diclofenac-loaded silicon dioxide core. The nanostructure suspension presented nanometric particle sizes in the range of 50-400 nm determined by dynamic light scattering.

The nanostructure-coated microparticles were prepared by spray-drying in one step after dispersing the diclofenac-loaded core into the nanostructured Eudragit S100<sup>®</sup> aqueous suspension. The yield of the process was 80 % and the encapsulation efficiency was  $82.68 \pm 0.61$  %.

By SEM the morphological analyses of the uncoated-core showed irregular shaped microparticles presenting surface similar to the raw silicon dioxide<sup>9</sup>. On the other hand, the



MP powder showed nanostructures adsorbed on the surface of microparticles (Figure 2) in a wide size distribution. The morphological data corroborate well with the polydispersion detected in the nanostructure suspension before spray-drying.

[Insert Figure 2 about here]

The surface area and pore size distribution were determined by BET and BJH methods<sup>37,38</sup>. The uncoated-core presented a surface area of 163 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> (Table 1), while the raw silicon dioxide showed a value of 214 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>. The pores of the Aerosil 200<sup>®</sup> are resultant from the agglomeration of its primary particles. In this way, the presence of the drug in the macropores of silicon dioxide can explain the decrease in the surface area value for the uncoated-core.

Comparing to the silicon dioxide, the MP powder also presented a decrease in the surface area (Table 1). The value of 83 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> determined for MP could be explained by a partial reduction in the nitrogen accessibility to the pores. The polymeric coating produced a decrease in the microparticles surface area compared to the uncoated-core. The pore volume values were 0.31 cm<sup>3</sup>.g<sup>-1</sup>, 0.25 cm<sup>3</sup>.g<sup>-1</sup>, and 0.10 cm<sup>3</sup>.g<sup>-1</sup> for commercial silicon dioxide, uncoated-core and MP, respectively. These values showed that the presence of the organic polymer (Eudragit S100<sup>®</sup>) reduced the surface area and pore volume of microparticles. The pore size distribution showed a slightly decrease in the mesoporous region (pore between 2 and 50 nm) for the MP (Figure 3). These results suggest that the drug-loaded silicon dioxide (uncoated core) was coated by the nanostructured polymer after spray-drying.

[Insert Table 1 about here]

[Insert Figure 3 about here]

### *In Vitro* Drug Release

In order to characterize the *in vitro* release profile of this new formulation, experiments were carried out comparing MP, uncoated-core and physical mixture of raw materials using

phosphate buffer at pH 5.0 and 7.4 (Figures 4 and 5, respectively). At pH 5.0, the uncoated-core presented a diclofenac release of 17 % after 60 min, and 53 % after 360 min. On the other hand, the drug was released 51 % after 60 min, and 101 % after 360 min from physical mixture, and 44 % and 75 % from MP, respectively. The dissolution efficiencies at pH 5.0 (Table 2) were  $33.93 \pm 8.45$  % (uncoated-core),  $74.12 \pm 4.49$  % (physical mixture), and  $58.42 \pm 6.29$  % (MP).

[Insert Figure 4 about here]

[Insert Table 2 about here]

At pH 7.4 the Eudragit S100<sup>®</sup> dissolves<sup>39</sup> and the release of the drug from MP could follow two mechanisms: *a*) drug diffusion due to the diclofenac dissolution after carboxylate formation (diclofenac  $pK_a$  3.8 at 25 °C<sup>40</sup>) and *b*) polymer erosion after its salt formation and dissolution. The drug release was 100 % from MP after 60 min. The dissolution efficiencies (Table 2) were  $78.05 \pm 0.63$  % for the uncoated-core,  $83.65 \pm 1.23$  % for physical mixture and  $84.47 \pm 2.65$  % for MP. At this pH, it was not observed difference ( $p > 0.05$ ) in the dissolution efficiency between MP and physical mixture. However, the uncoated core showed a slightly lower dissolution efficiency ( $p \leq 0.05$ ) than the other formulations. The presence of salts in the MP formulation could promote a faster drug release than the drug release observed from the uncoated core.

[Insert Figure 5 about here]

Mathematical modeling was used to analyze the dissolution profiles (Table 3). The selection of model was based on the best correlation coefficient, the best model selection criteria (MSC) and the best graphic adjustment. At pH 5.0, the biexponential model fitted the dissolution data for the uncoated core ( $k = 0.0078 \text{ min}^{-1}$ ;  $k' = 0.0001 \text{ min}^{-1}$ ), as well as for physical mixture ( $k = 0.0337 \text{ min}^{-1}$ ;  $k' = 0.0080 \text{ min}^{-1}$ ) and MP ( $k = 0.0219 \text{ min}^{-1}$ ;  $k' = 0.0018$

min<sup>-1</sup>). The percentage of drug in each sample that contributed for the burst phase release was 40 % (uncoated core), 32 % (physical mixture) and 55 % (MP). In the physical mixture sample the small particles of drug were responsible for its burst release, whereas, in the other samples (uncoated core and MP), the drug burst release was a consequence of free and/or adsorbed drug.

[Insert Table 3 about here]

At pH 7.4 the monoexponential model fitted better the dissolution data than the other models (Table 3). The observed rate constant values were  $k = 0.0380 \text{ min}^{-1}$  (uncoated core),  $k = 0.0497 \text{ min}^{-1}$  (physical mixture), and  $k = 0.0447 \text{ min}^{-1}$  (MP). In this medium, modeling the dissolution profiles did not provide a resolution to determine burst and sustained releases. Comparing the uncoated core and the MP, the difference of diclofenac dissolution rates could be explained by the presence of phosphate buffer in the aqueous Eudragit S100<sup>®</sup> suspension that was used to prepare the MP.

#### *In vivo* Gastrointestinal Tolerance

Diclofenac was chosen as model of drug due to its hydrophobic characteristics and its gastrointestinal side-effects (irritation, ulceration and mucosal damage), which allowed to carry out an *in vivo* experiment to evaluate the effectiveness of the polymeric nanocoating.

All formulations (sodium diclofenac aqueous solution, uncoated core, physical mixture and MP) presented a low lesional index for the stomach ( $0.11 \pm 0.33$  for sodium diclofenac aqueous solution,  $0.00 \pm 0.00$  for uncoated core,  $0.70 \pm 1.48$  for physical mixture and  $0.00 \pm 0.00$  for MP) which did not differ significantly among the groups ( $p < 0.05$ ) (Figure 6). These results correlate well with those reported for non-steroidal anti-inflammatory drugs using the same animal model<sup>27,29,38,41</sup>. Rats are more sensitive to intestinal ulcerations than other mammals, including human beings, due to high enterohepatic recirculation<sup>42</sup>.

[Insert Figure 6 about here]

Regarding the duodenum (Figure 6), the lesional indexes were  $3.61 \pm 2.09$  for sodium diclofenac aqueous solution,  $0.50 \pm 0.71$  for uncoated core,  $4.00 \pm 2.98$  for physical mixture and  $1.40 \pm 2.38$  for MP. All these values depicted few ulceration in this organ. Lesional indexes in the jejunum were  $49.67 \pm 33.48$  for sodium diclofenac aqueous solution,  $41.10 \pm 25.06$  for uncoated core,  $29.50 \pm 18.04$  for physical mixture and  $6.60 \pm 5.55$  for MP. The MP presented a mucosal protective effect ( $p < 0.05$ ). These results showed that the drug-loaded silicon dioxide was not able to protect the intestinal mucosa (uncoated core) without polymeric coating. On the other hand, in our previous work<sup>27</sup>, the diclofenac-loaded silicon dioxide has presented a protective effect of intestinal mucosa. The different behavior of these formulations prepared without nanostructure suspension or polymeric nanoparticles can be explained by the different drug concentration employed in the present work, which is higher (0.5:3.0 % w/w) than in the previous report (0.1:3.00 % w/w). Finally, the lesional indexes in the ileum were  $106.11 \pm 30.69$  for sodium diclofenac aqueous solution,  $90.80 \pm 47.49$  for uncoated core,  $79.90 \pm 36.32$  for physical mixture and  $18.90 \pm 12.77$  for MP. The results observed for the ileum are similar to those recorded in the jejunum. Comparing all formulations, the MP presented a mucosal protective effect ( $p < 0.05$ ).

The total lesional indexes (Figure 6) calculated by the sum of the partial lesional indexes were  $156.11 \pm 48.54$  for sodium diclofenac aqueous solution,  $132.40 \pm 45.71$  for uncoated core,  $109.10 \pm 35.85$  for physical mixture and  $29.89 \pm 12.15$  for MP.

In conclusion, the nanostructure-coated microparticles were produced with excellent yield and encapsulation efficiency. Additionally, the morphological analyses suggested that the drug loaded core was coated by the nanostructured polymer giving the nanostructure-coated microparticles. Corroborating with these analyses, the drug release profiles and the gastrointestinal tolerance evaluation showed the advantages of the new formulation over the

simple mixture of raw materials. This new powder showed a protective effect against the mucosal diclofenac damage in rats, suggesting that this strategy of coating presents a potential use for oral administration of drugs.

### **Acknowledgments**

RCRB thanks Capes for his research grant. The authors thank the financial support of FAPERGS, CNPq and Rede de Nanobiotecnologia/CNPq/MCT.

## References

1. Lieberman, H. A & Lachman, L. In *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets Volume 3*, 4<sup>th</sup> ed., Marcell Dekker:New York, 1982, ch. 3.
2. Hasan, M.; Najib, N.; Suleiman, M.; El-Sayed, Y.; Abdel-Hamid, M.; *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **1992**, *18*, 1981.
3. Hosny, E. A.; El-Mahrouk, G. M.; Gouda, M. W.; *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **1998**, *24*, 661.
4. Walter, K.; Von Nieciecki, A.; *Arzneim. Forschung*, **2001**, *51*, 643.
5. Palmieri, G. F.; Bonacucina, G.; Di Martino, P.; Martelli, S.; *Drug Dev. Ind. Pharm* **2001**, *27*, 195.
6. Lin, S. ; Kao, Y.; *Pharm. Res.*, **1991**, *8*, 919.
7. Obara, S.; McGinity, J. W.; *Int. J. Pharm.*, **1995**, *126*, 1.
8. Palmieri, G. F.; Bonacucina, G.; Di Martino, P.; Martelli, S.; *J. Microencapsulation*. **2002**, *19*, 111.
9. Beck, R. C .R.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S.; *J. Microencapsulation*. **2004**, *21*, 499.
10. Lecomte, F.; Siepmann, J.; Walther, M.; Macrae, R. J.; Bodmeier, R.; *J. Controlled Release*, **2004**, *99*, 1.
11. Benita, S. In *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications*; Marcel Dekker: New York, 1996.
12. He, P., Davis, S. S., Illum, L.; *Int. J. Pharm.* **1999**, *187*, 53.
13. Schaffazick, S. R.; de Freitas, L. L.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S.; *Quim. Nova*. **2003**, *26*, 726.
14. Brannon-Peppas, L.; *Int. J. Pharm.* **1995**, *116*, 1.

15. Couvreur, P.; Barratt, G.; Fattal, E.; Legrand, P.; Vauthier, C.; *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **2002**, *19*, 99.
16. Freiberg, S.; Zhu, S.S.; *Int. J. Pharm.* **2004**, *282*, 1.
17. Wan, L. S.; Heng, P. W. S.; Chia, C.; G.; H.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1992**, *18*, 997.
18. Bodmeier, R.; Chen H.; *J. Pharm. Pharmacol.* **1988**, *40*, 754.
19. Conte, U.; Conti, B. B.; Giunchedi, P.; Maggi, L. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1994**, *20*, 235.
20. Palmieri, G. F.; Wehrle, P.; Stamm, A.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1994**, *20*, 2859.
21. Huang, Y. C.; Chiang, C. H.; Yeh, K. M.; *J. Microencapsulation.* **2003**, *20*, 247.
22. Broadhead, J.; Edmond Rouan, S. K.; Rhodes, C. T.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1992**, *18*, 1169.
23. Oneda, F.; Ré, M. I.; *Powder Technol.* **2003**, *130*, 377.
24. Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R.; Dalla-Costa, T.; Bassani, V. L.; Muller, C. R.; *Br PI* 9906081-7, **1999**.
25. Guterres, S. S.; Weiss, V.; Lucca Freitas, L.; Pohlmann, A. R.; *Drug Delivery*, **2000**, *7*, 195.
26. Müller, C. R.; Bassani, V. L.; Pohlmann, A. R.; Michalowski, C. B.; Petrovick, P. R.; Guterres, S. S.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2000**, *26*, 343.
27. Guterres, S. S.; Müller, C. R.; Pohlmann, A. R.; Dalla Costa, T.; *S.T.P. Pharma Sci.* **2001**, *11*, 229.
28. Pohlmann, A. R.; Weiss, V.; Mertins, O.; Pesce da Silveira, N.; Guterres, S. S.; *Eur. J. Pharm. Sci.* **2002**, *16*, 305.
29. Raffin, R. P.; Obach, E. S.; Mezzalira, G.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S.; *Acta Farm. Bonaerense.* **2003**, *22*, 163.

30. Müller, C. R.; Schaffazick, S. R.; Pohlmann, A. R.; De Lucca Freitas, L.; Pesce da Silveira, N.; Dalla Costa, T.; Guterres, S. S.; *Pharmazie*. **2001**, *56*, 864.
31. Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J.P.; *European Patent 0274961*, **1988**.
32. Calvo, P.; Vila-Jato, J. L.; Alonso, M. J.; *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 530.
33. Pohlmann, A. R.; Soares, L. U.; Cruz, L.; Pesce da Silveira, N.; Guterres, S.S.; *Current Drug Delivery*. **2004**, *1*, 103.
34. Validation of Analytical Procedures: Methodology, ICH-Harmonised Tripartite Guideline, IFPMA, Geneva, Switzerland, 1996.
35. The United States Pharmacopoeia. 27 Ed., The United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, USA, 2003.
36. Brunauer, S.; Emmet, P. H.; Teller, E.; *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *60*, 309.
37. Barret, E. P.; Joyner, L. G.; Halenda, P. P.; *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 373.
38. Ammoury, N.; Dubrasquet, M.; Fessi, H.; Devissaguet, J.P.; Puisieux, F.; Benita, S.; *Clinical Materials*. **1993**, *13*, 121.
39. Lamprecht, A.; Yamamoto, H.; Takeuchi, H.; Kawashima, Y.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *58*, 37.
40. Chiarini, A.; Tartarini, A.; Fini, A.; *Arch. Pharm.* **1984**, *317*, 268.
41. Guterres, S. S.; Fessi, H.; Barratt, G.; Puisieux, F.; Devissaguet, J.P.; *Pharm. Res.* **1995**, *12*, 1.
42. Fara, J. W.; Myrback, R. E.; *Pharm. Res.* **1990**, *7*, 616.



## Figure Captions

Figure 1. Schematic representation of nanostructure-coated microparticles, in which the drug is associated with the organic phase (A) or with the inorganic phase (B).

Figure 2. SEM micrographs (bar = 200nm) of (a) surface of a particle from the uncoated core and (b) surface of a particle from the nanostructure-coated microparticles (MP).

Figure 3. Pore size distribution of commercial silicon dioxide (Aerosil 200<sup>®</sup>), uncoated-core and nanostructure-coated microparticles (MP) obtained by BJH method.

Figure 4. Release profiles (phosphate buffer pH 5.0) of diclofenac from the uncoated-core, physical mixture, and nanostructure-coated microparticles (MP).

Figure 5. Release profiles (phosphate buffer pH 7.4) of diclofenac from the uncoated-core, physical mixture, and nanostructure-coated microparticles (MP).

Figure 6. Mean organ lesional index following three consecutive daily doses of 20 mg.kg<sup>-1</sup> of sodium diclofenac aqueous solution (DicONa), uncoated-core, physical mixture, and nanostructure-coated microparticles (MP).

Table 1 – Superficial area and pore volume of nanostructure-coated microparticles (MP), uncoated-core, and commercial silicon dioxide (Aerosil 200<sup>®</sup>).

Sample	Superficial area (m <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup> )	Pore volume (cm <sup>3</sup> .g <sup>-1</sup> )
MP	83	0.10
Uncoated core	163	0.25
Aerosil 200 <sup>®</sup>	214	0.31

Table 2. Dissolution efficiency determined for the uncoated core, physical mixture, and nanostructure-coated microparticles (MP) at pH 5.0 and 7.4.

Formulation	Dissolution efficiency (%)	
	pH 5.0	pH 7.4
Uncoated core	33.93 ± 8.45	78.05 ± 0.63
Physical mixture	74.12 ± 4.49	83.65 ± 1.23
MP	58.42 ± 6.29	84.47 ± 2.65

Table 3 – Model-dependent approaches used for mathematical modeling.

Approach	Method	Equation <sup>a,b,c</sup>
Model-dependent	Zero-order	% diss = $kt$
	First-order	% diss = $100(1-e^{-kt})$
	Biexponential	% diss = $100[1-(A.e^{-k.t} + B.e^{-k'.t})]$
	Weibull	% diss = $100 [1-e^{-(t/T_d)^\beta}]$
	Higuchi	% diss = $kt^{0.5}$

<sup>a</sup> % *diss*: percentage dissolved at time *t*.

<sup>b</sup> *k* and *k'*: dissolution rate constants.

<sup>c</sup> *T<sub>d</sub>*: time at which 63.2% of the material is dissolved; *β*: shape parameter.

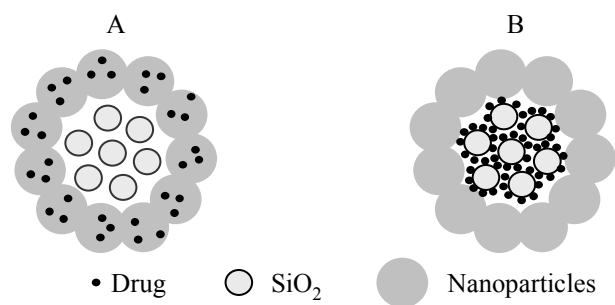


Figure 1. Schematic representation of nanostructure-coated microparticles, in which the drug is associated with the organic phase (A) or with the inorganic phase (B).

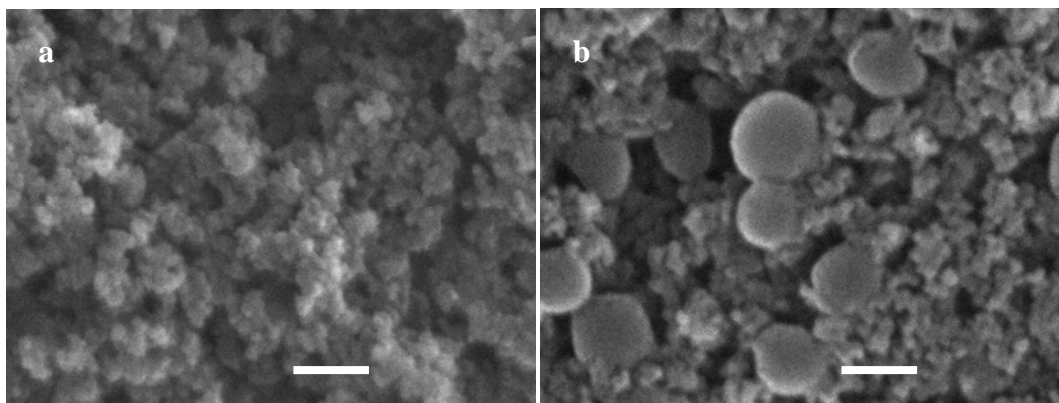


Figure 2. SEM micrographs (bar = 200 nm) of (a) surface of a particle from the uncoated core and (b) surface of a particle from the nanostructure-coated microparticles (MP).

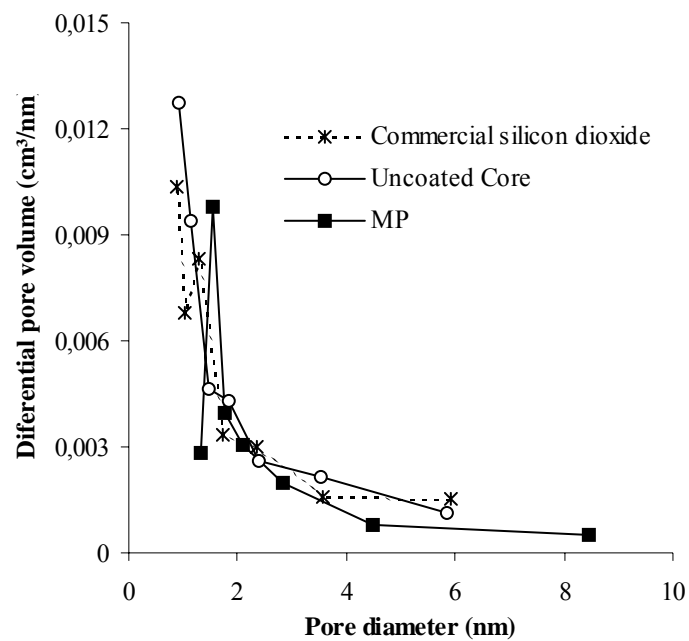


Figure 3. Pore size distribution of commercial silicon dioxide (Aerosil 200<sup>®</sup>), uncoated-core and nanostructure-coated microparticles (MP) obtained by BJH method.

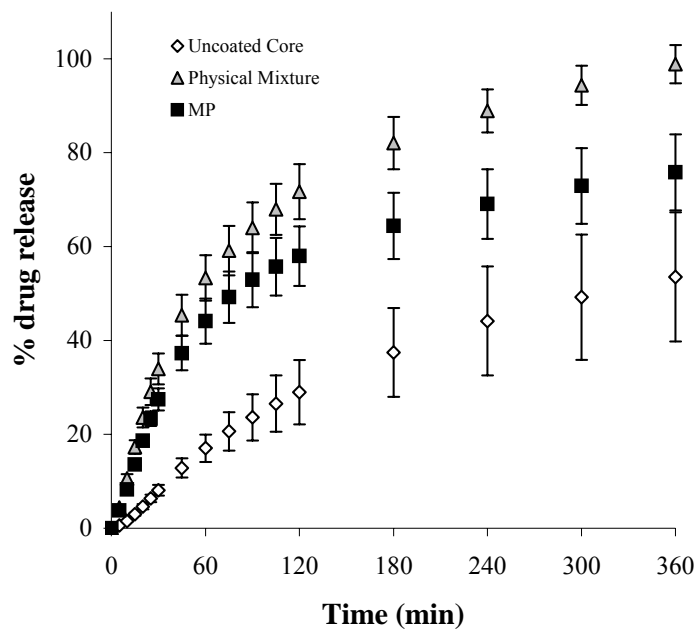


Figure 4. Release profiles (phosphate buffer pH 5.0) of diclofenac from the uncoated-core, physical mixture, and nanostructure-coated microparticles (MP).



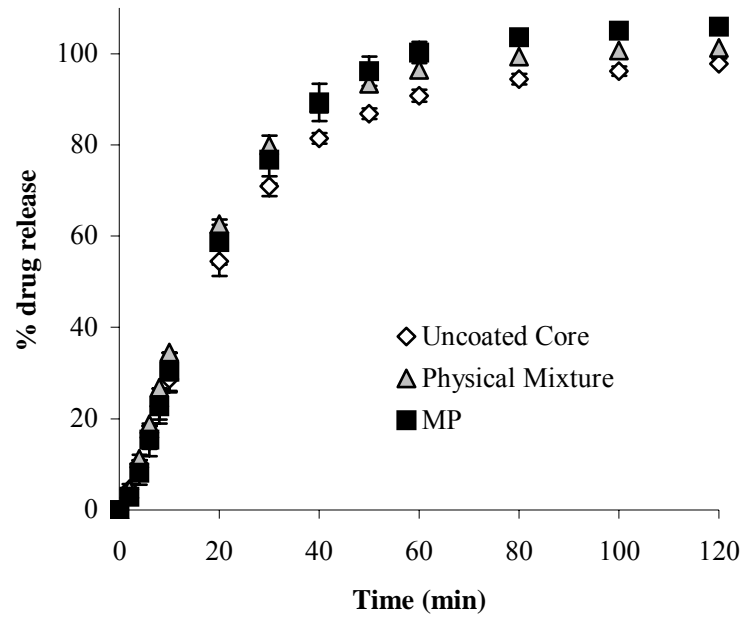


Figure 5. Release profiles (phosphate buffer pH 7.4) of diclofenac from the uncoated-core, physical mixture, and nanostructure-coated microparticles (MP).

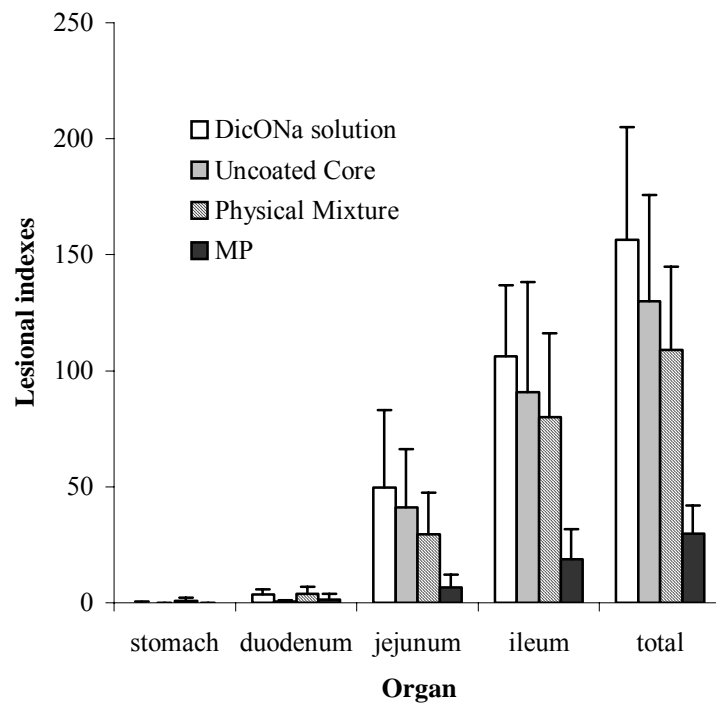


Figure 6. Mean organ lesional index following three consecutive daily doses of  $20 \text{ mg.kg}^{-1}$  of sodium diclofenac aqueous solution (DicONa), uncoated-core, physical mixture, and nanostructure-coated microparticles (MP).

**CAPÍTULO 6:** Micropartículas nanorrevestidas contendo dexametasona: correlação entre a liberação do fármaco in vitro e a sua absorção através de monocamadas de células Caco-2

---

---



## 6.1. INTRODUÇÃO

O presente capítulo apresenta a aplicação do método de preparação de micropartículas nanorrevestidas na obtenção de sistemas microparticulados contendo um fármaco antiinflamatório esteroidal (glicocorticóide), a dexametasona. A escolha do fármaco foi realizada levando-se em consideração suas características físico-químicas, como a hidrofobia e a sua solubilidade aquosa independente do pH.

As micropartículas foram preparadas de acordo com a metodologia descrita anteriormente, utilizando-se nanocápsulas ou nanoesferas como materiais de revestimento e avaliando-se o emprego de um plastificante hidrofílico, o polígon 6000, na preparação das micropartículas. A interação destas micropartículas com as células Caco-2, uma linhagem celular originada de adenocarcinoma de cólon humano, foi avaliada em termos de transporte do fármaco através das monocamadas celulares e citotoxicidade. Essa linhagem celular tem sido amplamente aceita como modelo de membrana para uma rápida avaliação da absorção de fármacos no intestino (Yamashita *et al.*, 2000) e seu emprego tem crescido enormemente em várias áreas de pesquisa, incluindo a área de ciências farmacêuticas (Artursson *et al.*, 2001).

O estudo da interação das micropartículas nanorrevestidas com as células Caco-2 foi realizado durante o estágio de doutorado no exterior junto ao Departamento de Tecnologia Farmacêutica e Biofarmácia, na cidade de Saarbrücken, Alemanha, sob a supervisão do Prof. Dr. Claus-Michael Lehr.



**PUBLICAÇÃO 6:** Dexamethasone-loaded nanoparticle-coated microparticles: correlation between the in vitro drug release and the drug absorption across Caco-2 cells monolayers

Artigo em redação para ser submetido ao Journal of Controlled Release

---

---





Dexamethasone-loaded nanoparticle-coated microparticles: correlation between the in vitro drug release and the drug absorption across Caco-2 cells monolayers

R. C. R. Beck<sup>a</sup>, S. S. Guterres<sup>a</sup>, A. R. Pohlmann<sup>a,b</sup>, C. Hoffmeister<sup>c</sup>, M. R. Gallas<sup>d</sup>, E. Collnot<sup>e</sup>, U. F. Schaefer<sup>e</sup>, C. M. Lehr<sup>e\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, , 90610-000, RS, Brazil.

Telephone: 55 51 33165411, Fax: 55 51 33165437 (nanoc@farmacia.ufrgs.br)

<sup>b</sup> Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CP 15003, Porto Alegre, 91501-970, RS, Brazil

<sup>c</sup> Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga, 1752, Porto Alegre.

<sup>d</sup> Departamento de Física, Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>e</sup> Department of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Saarland University, Saarbrücken, 66123, Germany (lehr@mx.uni-saarland.de).

## **Abstract**

This work reports the study of the microencapsulation of dexamethasone in nanoparticle-coated microparticles and its influence on the drug absorption across Caco-2 cell monolayers. The adaptability of this in vitro methodology to predict the drug release characteristics from microparticulated systems was also evaluated. Nanoparticle-coated microparticles were prepared by spray-drying using nanocapsules or nanospheres suspensions as coating material. They presented encapsulation efficiency ranged from 90 to 117 % and yields between 49 and 67 %. The moisture content was below 2 % for all formulations. SEM and AFM analysis demonstrated that the nanoparticle-coated microparticles (20 - 55  $\mu\text{m}$ ) show nanostructures adsorbed on their surface with a similar diameter compared to the original suspensions (60-70 nm and 170-200 for nanospheres and nanocapsules suspensions, respectively). The type of the nanocoating material (nanospheres or nanocapsules) presented a significant influence on the drug release profile and on the drug permeation across Caco-2 cells. Nanocapsule-coated microparticles presented lower percentual of drug released and lower  $P_{\text{app}}$  value compared to the nanosphere-coated formulations. A correlation between the  $P_{\text{app}}$  values and the drug released suggests that the Caco-2 transport studies can be an important tool to predict the release characteristics of a drug from microparticulated systems.

## **Introduction**

Caco-2 cells, the human colon adenocarcinoma cell line, undergo spontaneous enterocytic differentiation in culture, forming monolayers of polarized enterocytes that exhibit morphological and functional similarities to the small intestinal epithelium [1]. They have been used to study drug transport by all the four different transport routes across the intestinal epithelium: the passive transcellular and paracellular routes, the carrier mediated route and by the transcytosis [2]. Caco-2 cells have been widely accepted as a potent in vitro model membrane for the rapid screening of the intestinal drug absorption [3] and their use have increased dramatically in many research fields including the pharmaceutical sciences [2]. However, only few works have been carried out to study the influence of the microencapsulation of a drug on its absorption across Caco-2 cells monolayers [4-8]. These works presented different results in relation to the drug permeability, according to the model drug and the type of microparticle. Insulin-loaded microparticles showed an increase in the permeability of the drug across Caco-2 cell monolayers [4-6], whereas famotidine-loaded microparticles showed a decrease in the permeability of drug depending on the polymer type and particle size [7].

Microparticles are widely studied in the pharmaceutical field to design modified drug delivery systems [9]. Oral microparticulated delivery systems exhibit several advantages including ready distribution on a large surface area, more constant plasma levels, higher accuracy in reproducibility dose by dose and less decrease in bioavailability [10]. It was also demonstrated that the microparticles seem to be equally promising to be employed in the inflammatory bowel diseases (IBD) treatment [11]. The advantage of using microparticles is given by their small size. The decrease in the diameter of the drug carrier systems increases its residence time in the gut, in the case of diarrhea, a frequently symptom of IBD [11-14]. In

addition, the treatment of IBD is based on the regular intake of anti-inflammatory drugs and the daily administration of high drug doses is required [14].

Concerning the methods for the preparation of microparticles, we recently have reported a novel strategy to prepare these systems by spray-drying, using polymeric nanoparticles (nanospheres or nanocapsules), as the coating material [15]. These microparticles are prepared by the nanoparticle-coating of a organic-inorganic core, compounded of silicon dioxide and a model drug (diclofenac). The nanoparticle-coating efficiency was demonstrated by the SEM analysis, that demonstrated the presence of nanostructures forming a polymeric covering layer on the organic-inorganic core surface. This observation was also accompanied by a modified drug release from the nanoparticle-coated microparticles in relation to the uncoated core. This method presents significant advantages, as the avoiding of the use of organic solvents during the coating step, the lesser environmental impact and the absence of the risk of explosion during the spray-drying process.

Considering all these previous studies, this work reports the preparation of nanoparticle-coated microparticles and the study of the influence of microencapsulation on the absorption of a drug (dexamethasone) across Caco-2 monolayers. The adaptability of this model membrane as a tool to predict the drug release characteristics from microparticulated systems was evaluated. The microparticles were characterized in terms of process yields, encapsulation efficiencies, water contents, microparticle sizes, in vitro drug release and morphological analysis by scanning electronic microscopy and atomic force microscopy.

## Materials and Methods

### Materials

Dexamethasone was obtained from Henrifarma (São Paulo, Brazil); Eudragit S100<sup>®</sup> (EUD) was supplied from Almapal (São Paulo, Brazil). Caprylic/capric triglyceride mixture was delivered from Brasquim (Porto Alegre, Brazil); polyethylene glycol 6000 (PEG 6000), sorbitan monostearate (Span 60<sup>®</sup>) and polysorbate 80 (Tween 80<sup>®</sup>) were supplied by Delaware (Porto Alegre, Brazil). Colloidal silicon dioxide (Aerosil 200<sup>®</sup>) was acquired from Degussa (São Paulo, Brazil). The Caco-2 cell line was obtained from the ATCC (American Type Culture Collection, clone C2BBE1). Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), trypsin (0.25%)-EDTA (1mM) were purchased from Gibco Laboratories (New York, USA). Non-essential amino acids (NEAA) were obtained from Sigma (Steinheim, Germany). HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) was purchased from Carl Roth (Karlsruhe, Germany). All others chemicals and solvents presented pharmaceutical or chromatographic grade and were used as received.

### Preparation and Characterization of Colloidal Suspensions

Nanocapsules (NC) and nanospheres (NS) from Eudragit S100<sup>®</sup> (EUD) were prepared by the nanoprecipitation method as described by Fessi and co-workers [16]. For NC preparation, the organic solution was consisted of the capric/caprylic mixture (3.3 mL), Span 60<sup>®</sup> (0.1532 g), the polymer (EUD S100<sup>®</sup>) (1.0 g) and acetone (267.0 mL). This organic phase was added under moderate magnetic stirring to an aqueous solution (533.0 mL) containing Tween 80<sup>®</sup> (0.1532 g). The magnetic stirring was maintained during 10 min. Thus, the acetone was eliminated and the aqueous phase concentrated by evaporation under reduced pressure (40 °C), then the final volume was adjusted to 100 mL, corresponding to a polymer concentration

of 10 mg.mL<sup>-1</sup>. The NS suspensions were prepared as described above for NC, omitting the capric/caprilic triglyceride mixture. The colloidal suspensions were characterized by pH measurements (Micronal, B-474, São Paulo, Brazil) and by particle size determination using photon correlation spectroscopy (PCS) after dilution of samples (500 times) with water (Milli-Q<sup>®</sup>). The scattered light was observed at an angle of 90° (Brookhaven Instruments, goniometer BI-200M/2.0 version, Holtsville, USA; BI9863 detection system; Laser He-Ne source 35 mW, 127 model,  $\lambda$ = 632.8 nm, Spectra Physics, Mountain View, USA).

#### Preparation of Nanoparticle-Coated Microparticles

To obtain the core of the microparticles (uncoated core), 50 mL of dexamethasone acetone solution (5.00 mg.mL<sup>-1</sup>) were added to Aerosil 200<sup>®</sup> (1.5 g). The acetone was removed under reduced pressure to obtain a solid product. This powder (the core) was maintained in a dessiccator at room temperature during 48 h. For the coating step, the core material (1.5 g) was carefully milled in a mortar for 10 min, and dispersed into 50 mL of the NS or NC aqueous suspension under magnetic stirring at room temperature. The mixture was fed into a mini-spray-dryer Büchi 190<sup>®</sup> (Flawil, Switzerland) with a two-component nozzle and co-current flow, according to the operational conditions showed in Table 1. The powders were called MP-NS and MP-NC, for samples obtained with the NS or NC suspensions, respectively.

These formulations were also prepared using polyethylene glycol 6000 (PEG 6000), as plasticizer. The PEG 6000 [20% (w/w) in relation to the polymer] was added to the nanoparticle suspensions (NC or NS) and maintained under magnetic stirring for 24 h, followed by spray-drying. The powders were called MP-NS-PEG and MP-NC-PEG, for samples obtained with the NS or NC suspensions, respectively.

## Characterization of Microparticles

### Determination of yield and encapsulation efficiency

The yields of the formulations were calculated by the sum of the weights of all components, discounting the content of water in the suspension. To determine the encapsulation efficiency, the powders (cores and nanocoated microparticles) were dispersed in acetonitrile during 60 min at room temperature, followed by the centrifugation of the dispersions. Thus, the supernatants were appropriately diluted with the mobile phase and filtered through an hydrophilic membrane (GVWP, 0.22  $\mu\text{m}$ , Millipore). The samples were analyzed by HPLC [17]. The chromatographic system consisted of a Lichrospher<sup>®</sup> column RP 18 (250 x 4 mm, Merck, Darmstadt, Germany) and a Perkin Elmer instrument (200 Series, Shelton, EUA). The mobile phase consisted of acetonitrile/water (55:45 % v/v) at a flow rate of 1.2 mL.min<sup>-1</sup>. The volume injected was 20  $\mu\text{l}$ . Dexamethasone was detected at 254 nm. The encapsulation efficiency of each formulation was calculated by the correlation of the theoretical and the experimental dexamethasone concentrations and expressed as percentage (%). The validation of the HPLC assay demonstrated that this methodology was linear ( $r^2 = 0.9995$ ) in the range of 3 – 15  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , precise (RSD: 1.79 % for repeatability and < 3.5 % for intermediate precision) and accurate within this range of concentration (3 – 15  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ). The specificity was tested in presence of the microparticles adjuvants and in different dissolution media (pH 5.0 and 7.4) and demonstrated that this factors did not alter the diclofenac assay [18, 19].

### Determination of Moisture Content

The moisture content was determined by the Karl-Fisher coulometric method (Mettler DL 37, Greifensee, Switzerland).

### Scanning Electron Microscopy

The uncoated core and nanocoated microparticles were examined under scanning electron microscopy (SEM) (Jeol Scanning Microscope, JSM-5800, Tokyo, Japan), at different magnifications between 1,000x and 90,000x. Samples were analyzed after they had been gold sputtered (Jeol Jee 4B SVG-IN, Tokyo, Japan).

### Atomic Force Microscopy

The surface morphology of the NP-coated microparticles was analyzed by atomic force microscopy (AFM) Nanoscope IV Bioscope<sup>TM</sup> (Digital Instruments, Veeco Instruments, Germany) in tapping mode using ultrasharp silicon cantilevers (NSC16/AIBS/15, Mikromasch Spain) with a spring constant of about 34 N/m and a resonance frequency of about 200 kHz. Scanning was performed at a scan speed of 0.4 Hz with a resolution of 512 x 512 pixels. Image were processed and analyzed using the Nanoscope 5 software (Digital Instruments, Veeco Instruments, Germany).

### Particles Size Distribution and Average Diameter

The particle size distribution was determined by laser diffractometry with a Beckman Coulter - Tornado (Beckman Instruments, USA) by dry dispersion. The mean diameter over the volume distribution  $d_{4,3}$  was used as a particle size distribution parameter.

### X-Ray Analyses

X-ray analyses were performed for the polymer, the drug (dexamethasone) and the microparticles. Diffraction powder patterns were obtained with a Siemens diffractometer (model D500) using Cu K $\alpha$  radiation at 35 kV.



### *In Vitro* Drug Release Studies

The *in vitro* drug release experiments were carried out using a flow-through cell technique. The apparatus is constituted by recycling flow-through cells (Desaga, Wiesloch, Germany), containing as a fluid inlet a bed of glass beads, and connected to a peristaltic pump (Desaga, Wiesloch, Germany). The flow rate was  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . The test was carried out using pH 7.4 phosphate buffer. The dissolution medium ( $37^\circ \pm 0.5 \text{ C}$ ) was placed in an external vessel, connected with the cell through the pump.

An exact amount of each powder (equivalent to 2 mg of dexamethasone) was placed in the cells for the release tests ( $n=3$ ). The samples were collected, at predetermined time intervals and filtered through a hydrophilic membrane (GVWP,  $0.22 \mu\text{m}$ , Millipore). The drug release/dissolved was assessed through HPLC analysis, according to the method described above.

Dexamethasone release kinetics were analyzed by mathematical equations. Table 2 presents the models tested (MicroMath Scientist<sup>®</sup> software, Salt Lake City, USA).

### Preparation of Caco-2 Monolayers

Caco-2 cells were grown in complete DMEM-20 solution at  $37^\circ \text{ C}$  in culture flasks in a humidified air ( $5\% \text{ CO}_2$  atmosphere). Cells were harvested with trypsin-EDTA and seeded onto polyester membrane filter inside Transwell cell culture chambers (Costar, Corning Inc., Corning, NY) at a density of  $6 \times 10^4$  cells/filter. The culture medium (0.5 ml in the insert and 1.5 ml in the well) was replaced every 48 h. Transepithelial electrical resistance was measured every second day before feeding to control growth of the Caco-2 cells. After 21 days of growth, the resistance reached an equilibrium value ( $\geq 350 \Omega\cdot\text{cm}^2$ ), which indicated the monolayers tight junctions had formed.

## Transport Studies

Apical to basolateral permeability of dexamethasone was measured using Hank's balanced salts solution (HBSS), as medium for the drug transport studies, after adjusting the pH 7.4 with HEPES. After 1 hour incubation of both sides of the monolayers with drug-free transport medium, the medium containing the drug or the microparticle suspension was introduced to the apical side (0.5 ml). Thereafter, to determine the initial concentration ( $C_0$ ), a sample of 100  $\mu\text{l}$  was taken from the apical side and sample aliquots (400  $\mu\text{l}$ ) were taken from the basolateral side at given time intervals (0, 20, 40, 60, 90, 120, 150, 180, 240 minutes). The volume of the basolateral solution was maintained by adding fresh transport medium. All experiments were performed at 37 °C. Cells were agitated on a orbital shaker (Schüttler MTS 4, IKA, Germany) at 100 rpm. The apical-to-basolateral permeability (apparent permeability coefficient,  $P_{app}$  ( $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ )) of each sample was calculated according to the following equation:

$$P_{app} = dQ / dt \times 1 / AC_0$$

where  $dQ/dt$  is the rate of appearance of the drugs on the basolateral side ( $\text{nmol s}^{-1}$ ),  $C_0$  is the initial concentration on the apical side (mM) and  $A$  is the surface area of the monolayer ( $\text{cm}^2$ ). Additionally, a study of dexamethasone transport across filters without the cells monolayers was performed.

## Transepithelial Electrical Resistance Studies

The transepithelial electrical resistance (TEER) measures the resistance to electric current across a layer of cells. TEER values above 300  $\Omega\cdot\text{cm}^2$  can be considered as a good parameter for the Caco-2 monolayers. TEER of the monolayers was checked routinely before and after the experiment by using an electrical voltohmmeter (EVOM) equipped with STX2 “chopstick” electrode (WPI, Germany), in order to accurately measure the effects of

nanoparticle-coated microparticles on TEER. At the start, all DMEM growth medium was removed and replaced with HBSS pH 7.4. Values were corrected for the background value contributed by the Transwell clear filters and assay buffer.

### Cytotoxicity Studies

In the cytotoxicity studies it was employed the method based on the release of the lactate deshydrogenase, a cytosolic enzyme, which presence in apical compartment is generally regarded as an evidence for cell membrane damage [20]. Caco-2 cell monolayers were cultured in complete DMEM-20 solution at 37° C in a humidified air (5% CO<sub>2</sub> atmosphere) on 96-well plates (Costar, Corning Inc., Corning, NY) at a density of 2 x 10<sup>4</sup> cells/well. The culture medium (200 µl) was replaced every 48 h. The cells were used after 1 week of grown. For the cytotoxicity studies, the cells were washed two times with KRB + 1% BSA pH 7.4 medium. Then, the monolayers were incubated with the appropriate test suspensions, at 10 different concentrations (0.025; 0.05; 0.1; 0.2; 0.4; 0.8; 1.6; 3.2; 6.4 and 12.8 mg of microparticles/ml). After 120 min of incubation at 37 °C, 50 µl of samples were withdrawn and analyzed for LDH content utilizing a testkit (Roche, Mannheim, Germany), which allows the visible-photometric determination (492 nm) of the formation of the formazan salt, in presence of the lactate, LDH and the catalyst (diaphorase). In parallel, it was carried out the control experiments with 0.1% Triton X-100 (positive control) and with KRB + 1% BSA pH 7.4 medium (negative control).

### Analytical Methods

The concentration of dexamethasone in the sample solutions from the transport studies was determined using a reversed-phase (Merck Lichrospher RP 18 column, Merck, Germany) high

performance liquid chromatography system consisting of a L6220 Intelligent Pump, a L-4259 UV/Vis Detector, a AS 2000A Autosampler and a D-6000 Interface (Merck Hitachi, Germany). The mobile phase consisted of acetonitrile/water (55:45 % v/v) at a flow rate of 1.0 mL.min<sup>-1</sup>. The volume injected was 20 µl. Dexamethasone was detected at 240 nm. The HPLC method was validated according to the following characteristics [18,19]: linearity ( $y = 16541x - 636.95$ ,  $n = 3$ ,  $R^2 = 0.9999$ ), range (0.1 – 5.0 µg.ml<sup>-1</sup>), precision (repeatability: 0.24 – 0.53 %; intermediate precision: 0.54 – 1.07 %), accuracy (99.07 – 101.46 %) and quantification limit (0.08 µg.ml<sup>-1</sup>).

#### Statistical analysis

One-way analysis of variance was employed in the comparison of the experimental data. Post-hoc multiple comparisons were done by Tukey's test for significance at p-values less than 0.05.

## Results and Discussion

### Nanoparticle-coated microparticles preparation

The polymeric nanoparticle suspensions were prepared by nanoprecipitation of Eudragit S100<sup>®</sup> using a capric/caprylic acid mixture as oily phase in the case of nanocapsules (NC), and omitting it in the case of nanospheres (NS). These colloidal suspensions, NC and -NS, presented acid pH values ( $3.61 \pm 0.05$  and  $3.60 \pm 0.01$ , respectively), and particle sizes of  $119 \pm 1$  nm and  $67 \pm 9$  nm, respectively. After the preparation, the polymeric nanoparticles were used as aqueous coating suspension to prepare by spray-drying the dexamethasone-loaded microparticle powders.

The process yields of the preparation of microparticles are presented in Table 3. Excepting for the uncoated core, all the MP formulations presented a yield between 39 and 67 %. These

values are adequate considering the low quantity of materials used for the preparation of each batch of microparticles [21] and they are in agreement with the diclofenac-loaded nanocoated microparticles, reported in our previous work [15]. These yield values can be explained by the adhesion to the chamber walls and the loss of the smallest particles through the exhaust of the spray dryer apparatus [21]. The presence of the plasticizer (PEG 6000) increased ( $p < 0.05$ ) the yields of the microparticles prepared with the NS suspension as coating material (MP-NS:  $49 \pm 2$  % and MP-NS-PEG:  $67 \pm 4$  %). Even this significative influence has not been detected for the NC-coated microparticles ( $p > 0.05$ ), a tendency for the increase of the yield could be verified in case of the presence of the plasticizer (MP-NC:  $39 \pm 6$  % and MP-NC-PEG:  $49 \pm 7$  %).

In relation to the encapsulation efficiencies, the uncoated core presented a drug content of  $93.45 \pm 2.46$  % of the initial drug loaded. The microparticles presented these values between 101 and 116 %. The plasticizer did not influence these values ( $p > 0.05$ ), according to the results presented in Table 3 (MP-NS:  $104.60 \pm 4.75$  and MP-NS-PEG:  $101.04 \pm 3.27$ ; MP-NC:  $116.46 \pm 3.31$  and MP-NC-PEG:  $114.92 \pm 3.33$ ). On the other hand, the type of the nanoparticle suspension (NS or NC) used as the coating material shows significant influence on the encapsulation efficiency. The NC-coated microparticles presented values between 114 and 117 %, independently of the presence of the plasticizer. These erratic values above 110 % were also reported to the diclofenac-loaded nanocoated microparticles prepared with nanocapsule suspension and in presence of triacetin [15]. These values can be avoided by the optimization of the spray drying conditions.

Regarding the determination of the particle size (Table 3), except the MP-NS-PEG formulation, all formulations presented bigger particle size than the uncoated core. All formulations presented a mean particle size in the range of 20 to 55  $\mu\text{m}$ .

In addition, all formulations presented a moisture content below 2.00 % (0.88 % – 1.90 %), which demonstrates that the employed spray-drying parameters were able to obtain a satisfactory drying of these formulations. The presence of the plasticizer (PEG) did not demonstrate any influence on this parameter (Table 3).

### Morphological Analysis

The morphological analysis of the uncoated core showed irregular shaped microparticles (Figure 1a) presenting at a higher magnification rugged surfaces with the presence of some cavities (Figure 1b). The raw silicon dioxide presents similar aspect to the uncoated core. On the other hand, the morphological analyses showed spheroidal shape microparticles for the nanocoated microparticles – MP-NS and MP-NC (Figure 1c and 1e). At higher magnification, the nanocoated microparticles presented nanostructures with 60-70 nm and 170-200 nm, for MP-NS (Figure 1d) and MP-NC (Figure 1f), respectively. A similar morphological observation was reported in our previous work designed to develop diclofenac-loaded nanocoated microparticles [15]. The morphological analyses of the nanocoated microparticles containing the plasticizer (MP-NS-PEG and MP-NC-PEG) showed similar characteristics in comparison to the previous powders prepared in the absence of the plasticizer. In addition, the presence of the nanostructures adsorbed on the surface of the microparticles could also be observed by atomic force microscopy, as showed in the Figure 2.

In order to establish the physical state of the drug in the formulations, X-ray analyses were performed. Figure 3 shows the X-ray diffraction patterns for the dexamethasone (A) and the polymer Eudragit S100<sup>®</sup> (B). The diffractograms from C to F are the experimental results from the different microparticle samples. Diffraction peaks can be seen in all the dexamethasone-loaded microparticles (C-F) that corresponds to the pattern of the dexamethasone (A). These peaks are superimposed to the amorphous silica pattern, that has a

very broad diffraction line at  $2\theta \approx 22^\circ$ . These results demonstrate the presence of dexamethasone in all formulations as its crystal form. Also, the same results show that the spray-drying process did not alter the crystal form of dexamethasone.

### *In Vitro* Drug Release

In order to compare the *in vitro* drug release profiles from the microparticles with the drug permeation profile across Caco-2 cells monolayers, experiments were carried out during 120 minutes using phosphate buffer at 7.4, as medium (Figure 4). The uncoated core presented a dexamethasone release of  $62 \pm 7\%$  after 120 min. The nanoparticle-coated microparticles presented different values according to the type of nanoparticle used in the coating process. NC-coated microparticles presented a release of  $70 \pm 3\%$  and  $71 \pm 3\%$ , for MP-NC and MP-NC-PEG respectively, after 60 min, while NS-coated microparticles presented drug releases at this time of  $82 \pm 2\%$  and  $78 \pm 3\%$ , for MP-NS and MP-NS-PEG, respectively. These results can be explained due to the presence of the oily phase in the nanocapsules leading to a more lipophilic nature of the NC-coated formulations in relation to the others. Its important to observe that all the nanoparticle-coated formulations presented lower standard deviations values than the uncoated core.

Mathematical modeling was used to analyze the drug release profiles (Table 2). The selection of model was based on the best correlation coefficient, the best model selection criteria (MSC) and the best graphic adjustment. The best fitting was the biexponential equation for all the formulations (uncoated core:  $r = 0.9994$ , MSC = 6.12; MP-NC:  $r = 0.9997$ , MSC = 6.71; MP-NS:  $r = 0.9998$ , MSC = 7.18; MP-NC-PEG:  $r = 0.9997$ , MSC = 6.72; and MP-NS-PEG:  $r = 0.9983$ , MSC = 5.09). The burst release rate constants were  $k = 0.0127 \text{ min}^{-1}$ ,  $k = 0.0289 \text{ min}^{-1}$ ,  $k = 0.0198 \text{ min}^{-1}$ ,  $k = 0.0360 \text{ min}^{-1}$  and  $k = 0.0233 \text{ min}^{-1}$ , respectively. Otherwise, the slow release rate constants for the same formulations were  $k' = 2.16 \times 10^{-18} \text{ min}^{-1}$ ,  $k' = 0.0041$

$\text{min}^{-1}$ ,  $k' = 9.41 \times 10^{-18} \text{ min}^{-1}$ ,  $k' = 0.0073 \text{ min}^{-1}$  and  $k' = 1.49 \times 10^{-18} \text{ min}^{-1}$ , respectively.

Although the NC-coated formulations presented the higher  $k$  values for the burst release phase it can be observed that the percentages of drug that contributed for this phase (A parameter, Table 1) were lower for these formulations (60 % and 34 % for MP-NC and MP-NC-PEG, respectively) than for the other formulations (79 %, 96% and 91% for uncoated core, MP-NS and MP-NS-PEG, respectively).

### Caco-2 Cells Transport Studies

The apical to basolateral transport of dexamethasone free solution and the microparticles suspensions across de Caco-2 cell monolayers showed the best linear fit over the first 120 minutes of the experiment and  $P_{\text{app}}$  values were calculated from this period of time. In a first experiment was investigated the transport of dexamethasone solution across filters with and without cells monolayers in HBSS pH 7.4 (Figure 5). It can be observed that the Caco-2 cell monolayer was a barrier to dexamethasone transport ( $P_{\text{app}} = 2.2389 \pm 0.2389$  and  $0.8521 \pm 0.0364 \text{ cm.s}^{-1} \times 10^5$ , for filters without and with cells, respectively).  $P_{\text{app}}$  value of  $1.21 \pm 0.05 \text{ cm.s}^{-1} \times 10^5$ , for dexamethasone in HBSS supplemented with 25 mM glucose solution in pH 7.4 [3] and of  $1.14 \pm 0.09 \text{ cm.s}^{-1} \times 10^5$  in Krebs-Hensleit physiological solution [22] were reported in the literature.

Figure 6 shows the results of the transport studies of dexamethasone from nanoparticle-coated microparticles across the Caco-2 cells monolayers. It can be observed differences among the  $P_{\text{app}}$  of dexamethasone from the free drug solution and the microparticle formulations, except in the case of the MP-NS and MP-NS-PEG formulations. The other formulations (uncoated core, MP-NC and MP-NC-PEG) presented a  $P_{\text{app}}$  value significantly lower ( $p \leq 0.05$ ) compared to the  $P_{\text{app}}$  value of the free dexamethasone solution. These results are in agreement with previous report for famotidine-loaded microparticles [7] and with the results obtained in



the *in vitro* drug release studies, where the same formulations (uncoated core, MP-NC and MP-NC-PEG) presented the lower percentage of the drug released after 120 minutes. As in the *in vitro* drug release studies, we could observe the influence of the type of the coating material (NS or NC) on the transport of dexamethasone across Caco-2 cell monolayers. The NC-coated microparticles presented a lower  $P_{app}$  value (MP-NC:  $0.6356 \pm 0.0282 \text{ cm.s}^{-1} \times 10^5$ ) compared to the NS-coated microparticles (MP-NS:  $0.8314 \pm 0.1053 \text{ cm.s}^{-1} \times 10^5$ ). Additionally, it can be observed a statistically difference ( $p \leq 0.05$ ) between the  $P_{app}$  values obtained from the MP-NC-PEG ( $0.4838 \pm 0.0301 \text{ cm.s}^{-1} \times 10^5$ ) and all other formulations (MP-NC:  $0.6356 \pm 0.0282 \text{ cm/s} \times 10^5$ ; MP-NS:  $0.8314 \pm 0.1053 \text{ cm.s}^{-1} \times 10^5$ ; MP-NS-PEG:  $0.7247 \pm 0.0482 \text{ cm.s}^{-1} \times 10^5$ ). This result demonstrates that the presence of the plasticizer in the preparation of NC-coated formulation (MP-NC-PEG) is essential for the significant delay in the absorption of dexamethasone from these microparticles across Caco-2 cell lines. It must be emphasized that the *in vitro* transport study not consider the delay of the gastrointestinal transit of the microparticles, as showed in previous works in the literature [11,14] and this delay could increases the advantages of the encapsulation of dexamethasone in these nanocoated-microparticles to retard its absorption.

#### Transepithelial Electrical Resistance and Cytotoxicity Studies

The TEER of the monolayers was checked routinely before and after the experiment. Considering TEER values above  $300 \Omega.\text{cm}^2$  as a good parameter for the Caco-2 cells monolayers, the results demonstrated that all nanoparticle-coated microparticles did not affect TEER over 120 minutes. Particle exposure did not alter TEER in Caco-2 suggesting that the microparticles are non-toxic to the cells, and it further indicates that the drug absorption by the paracellular pathway can not be significant under these conditions. In agreement with

these results, the cytotoxicity indexes were below 5 % for all the microparticle formulations, at all tested concentrations (0.025 – 12.8 mg/ml), also demonstrating that these formulations are not toxic to the membrane of the Caco-2 cells, as expected, considering the excipients employed in their preparation.

#### Absorption-Release Studies Correlation

From the results discussed above, it can be observed that the *in vitro* drug release and the permeation studies lead to similar results. The type of the nanoparticle used in the coating step presented a significant influence on the drug release profile and also on the permeation across Caco-2 cell monolayers. NS-coated microparticles presented a higher percentage of drug released after 120 minutes of the experiment than the NC-coated microparticles. These results are in agreement with the results of the transport studies. The former presented a higher  $P_{app}$  value compared to the last. The higher percentage of drug release lead to the higher  $P_{app}$  value. This correlation can be observed in Figure 7, which shows the drug released (%) as a function of the cumulative mass transferred of dexamethasone (nMol) across Caco-2 cells. The exponential correlation shows that the permeation of the drug across the cells is related to the gradient of concentration of dexamethasone at the absorption site. Furthermore, this hypothesis can be confirmed by the correlation between the  $P_{app}$  and the percentage of drug that contributed for the burst phase of its release profile ( $A$  parameter) presented by the biexponential modelling. Figure 8 shows this correlation ( $r = 0.9091$ ) and suggest that the Caco-2 transport studies can be an important tool to predict the release characteristics of a drug from microparticulated systems.

## **Conclusion**

Dexamethasone-loaded nanoparticle-coated microparticles were successfully prepared by spray-drying. They showed good technological characteristics (process yields, encapsulation efficiency and moisture content) and the particle sizes were in the range of 20 to 55  $\mu\text{m}$ .

Nanoparticle-coating was demonstrated by the SEM and AFM analyses, that showed nanostructures adsorbed on the surface, with diameters similar to those showed by the original suspensions. In vitro drug release studies demonstrated the influence of the polymer coating layer in the drug release behaviour at pH 7.4. The NC-coated microparticles prepared in presence of a plasticizer (MP-NC-PEG) presented the lower percentual of drug related to the burst phase release. Transport studies across Caco-2 cells monolayers also demonstrated the capacity of these microparticles to retard/delay the absorption of dexamethasone across the Caco-2 cell lines depending on the type of the coating material. NC-coated microparticles presented lower  $P_{\text{app}}$  values compared to the free dexamethasone solution. MP-NC-PEG presented the more pronounced delay in the absorption of dexamethasone across Caco-2 cells. Finally, the results from the transport and release studies can be correlated indicating that the former can be a potential tool to predict the drug release of drugs from microparticulated systems. The nanoparticle-coated microparticles, mainly the NC-coated microparticles can represent a promising platform for the development of oral drug delivery systems.

## **Acknowledgments**

RCRB thanks CAPES for his research grant. The authors thank the financial support of FAPERGS, CNPq and Rede de Nanobiotecnologia/CNPq/MCT-Brazil.

## References

- [1] V. Pade, S. Stavchansky. Estimation of the relative contribution of the transcellular and paracellular pathway to the transport of passively absorbed drugs in the Caco-2 cell culture model, *Pharm. Res.* 14 (1997) 1210-1215.
- [2] P. Artursson, K. Palm, K. Luthman. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46 (2001) 27-43.
- [3] S. Yamashita, S., T. Furubayashi, M. Kataoka, T. Sakane, H. Sezaki, H. Tokuda. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells, *Eur. J. Pharm.Sci.* 10 (2000) 195-204.
- [4] B. Kriwet, T. Kissel. Poly(acrylic acid) microparticles widen the intercellular spaces of Caco-2 cell monolayers: An examination by confocal laser scanning microscopy, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 42 (1996) 233-240.
- [5] A. C. Foss, N. A. Peppas. Investigation of the cytotoxicity and insulin transport of acrylic-based copolymer protein delivery systems in contact with Caco-2 cultures, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57 (2004) 447-455.
- [6] J. E. Lopez, N. A. Peppas. Cellular evaluation of insulin transmucosal delivery, *J. Biomat. Sci-Polym E*, 15 (2004) 385-396.
- [7] Z. Degim, N. Unal, D. Essiz, U. Abbasoglu. Caco-2 cell cultures as a model for Famotidine absorption, *Drug Deliv.* 12 (2005) 27-33.
- [8] Z. L. Lu, J. H. Steenkamp, J. H. Hammah. Cross-linked polymer microparticles: Effect of N-trimethyl chitosan chloride on the release and permeation of ibuprofen, *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 31 (2005) 311-317.
- [9] S. Benita, 1996. *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications*, Marcel Dekker, New York, USA.

- [10] S. Lin, Y. Kao. Tablet formulation study of spray-dried sodium diclofenac enteric-coated microcapsules, *Pharm. Res.* 8 (1991) 919-924.
- [11] Y. Kawashima, T. Iwamoto, T. Niwa, H. Takeuchi, T. Hino. Uniform and improved bioavailability of newly developed rapid and sustained release suspensions of ibuprofen microspheres, *Int. J. Pharm.* 89 (1993) 9-17.
- [12] J.G. Hardy, S. S. Davis, R. Khosla, C. S. Robertson. Gastrointestinal transit of small tablets in patients with ulcerative colitis, *Int. J. Pharm.* 48 (1988) 79-82.
- [13] P. J. Watts, L. Barrow, K. P. Steed, C. G. Wilson, R. C. Spiller, C. D. Melia, . M. C. Davies. The transit rate of different-sized model dosage forms through the human colon and the effects of a lactulose-induced catharsis, *Int. J. Pharm.* 87 (1992) 215-221.
- [14] A. Lamprecht, U. Schäfer, C. M. Lehr. Size-dependent bioadhesion of micro- and nanoparticulate carriers to the inflamed colonic mucosa, *Pharm.Res.* 18 (2001) 788-793.
- [15] R. C. R. Beck, A. R. Pohlmann, S. S. Guterres. Nanoparticle-coated microparticles: preparation and characterization, *J. Microencapsulation* 21 (2004) 499-512.
- [16] H. Fessi, F. Puisieux, J.-Ph Devissaguet, Procédé de préparation des systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules, *European Patent*, 0, 274, 961, 1988.
- [17] R. C. R. Beck, S. S. Guterres, R. J. Freddo, C. B. Michalowski, I. Barcellos, J. A. Funck. Nanoparticles containing dexamethasone: Physicochemical properties and anti-inflammatory activity, *Acta Farm. Bonaerense* 22 (2003) 11-15.
- [18] Validation of Analytical Procedures: Methodology, ICH-Harmonised Tripartite Guideline, IFPMA, Geneva, Switzerland, 1996, pp. 1-8.
- [19] The United States Pharmacopoeia. 27 Ed., The United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, USA, 2003.

- [20] W. Kamm, A. Jonczyk, T. Jung, G. Luckenbach, P. Raddatz, T. Kissel. Evaluation of absorption enhancement for a potent cyclopeptidic  $\alpha_1\beta_3$ -antagonist in a human intestinal cell line (Caco-2), *Eur. J. Pharm. Sci.* 10 (2000) 205-214.
- [21] P. Giunchedi, M. L. Torres, L. Maggi, B. Conti, U. Conte. Cellulose acetate trimellitate microspheres containing NSAIDs, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 21 (1995) 315-330.
- [22] M. Leonard, M. Creed, C. Elizabeth, C., D. Brayden, A. W. Baird. Evaluation of the Caco-2 Monolayer as a Model Epithelium for Iontophoretic Transport, *Pharm. Res* 17 (2000) 1181-1188.

## Figure Captions

Figure 1. SEM micrographs of dexamethasone-loaded nanoparticle-coated microparticles: (a) MP-NS (132  $\mu\text{m}$ ); (b) MP-NS (1.39  $\mu\text{m}$ ); (c) MP-NC (132  $\mu\text{m}$ ) and (d) MP-NC (1.39  $\mu\text{m}$ ).

Figure 2. AFM image showing the surface topography of MP-NC-PEG (2  $\mu\text{m}$  x 2  $\mu\text{m}$  image).

Figure 3. X-ray diffraction pattern of: (A) dexamethasone; (B) Eudragit S100<sup>®</sup>; (C) uncoated core; (D) MP-NC; (E) MP-NC-PEG; (F) MP-NS; (G) MP-NS-PEG.

Figure 4. In vitro dexamethasone release profiles at pH 7.4.

Figure 5. Dexamethasone transport (0.1  $\mu\text{M}$ ) across filters with or without Caco-2 cells monolayers from a dexamethasone solution in HBSS pH 7.4 (Mean  $\pm$  sd, n = 6 or 3, for filters with or without cells, respectively).

Figure 6. Permeability ( $P_{\text{app}}$ ) of dexamethasone from a dexamethasone solution (0.1  $\mu\text{M}$ ) and from microparticle suspensions across Caco-2 cells monolayers (Mean  $\pm$  sd, n = 6); Means with the same letter are not significantly different (Anova, Tukey test,  $p \leq 0.05$ ).

Figure 7. Cumulative mass transferred of dexamethasone (nMol) as a function of the percentage of dexamethasone released (20, 40, 60 and 120 minutes).

Figure 8. Permeability coefficients ( $P_{\text{app}}$ ) of dexamethasone across Caco-2 monolayers as a function of the A parameter calculated from the biexponential fit of release data.

Table 1. Operational conditions to prepare nanoparticle-coated microparticles using a Mini Spray-Dryer Büchi 190<sup>®</sup> equipment.

Parameter	Condition
Feed rate	3.0 mL.min <sup>-1</sup>
Air flow rate	500 NL.h <sup>-1</sup>
Atomizing air pressure	200 kPa
Inlet temperature	170 °C ± 4 °C
Outlet temperature	110 °C ± 4 °C
Nozzle diameter	0.7 mm



Table 2. Mathematical models used to compare the dissolution profiles.

Method	Equation <sup>a,b,c</sup>
Zero-order	% diss = $kt$
First-order	% diss = $100(1 - e^{-kt})$
Biexponential	% diss = $100[1 - (A \cdot e^{-k \cdot t} + B \cdot e^{-k' \cdot t})]$
Weibull	% dissol = $100 [1 - e^{-(t/T_d)^\beta}]$
Higuchi	% dissol = $kt^{0.5}$

<sup>a</sup> % *diss*: percentage dissolved at time  $t$ .

<sup>b</sup>  $k$  and  $k'$ : dissolution rate constants.

<sup>c</sup>  $T_d$ : time at which 63.2% of the material is dissolved;  $\beta$ : shape parameter.

Table 3. Characteristics of the dexamethasone-loaded NP-coated microparticles.

Formulation	Yield (%) (Mean $\pm$ SD)	Encapsulation efficiency (%) (Mean $\pm$ SD)	Moisture (% $\pm$ SD)	Particle size ( $\mu\text{m}$ ) $d_{4.3}$ ( $d_{0.1} - d_{0.9}$ )
Uncoated core	100 <sup>c</sup>	93.45 $\pm$ 2.46 <sup>a</sup>	1.49 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	22.32 (1.16-74.59)
MP-NS	49 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	104.60 $\pm$ 4.75 <sup>a,b</sup>	1.90 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	41.10 (1.73-94.27)
MP-NC	39 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	116.46 $\pm$ 3.31 <sup>c</sup>	0.88 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	52.71 (3.27-161.3)
MP-NS-PEG	67 $\pm$ 4 <sup>b</sup>	101.04 $\pm$ 3.27 <sup>a</sup>	1.01 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	20.31 (1.56-59.19)
MP-NC-PEG	49 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	114.92 $\pm$ 3.33 <sup>c</sup>	1.85 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	51.54 (3.02-166.60)

Means, in column, with the same letter are not significantly different (ANOVA, Tukey test,  $p \leq 0.05$ ).

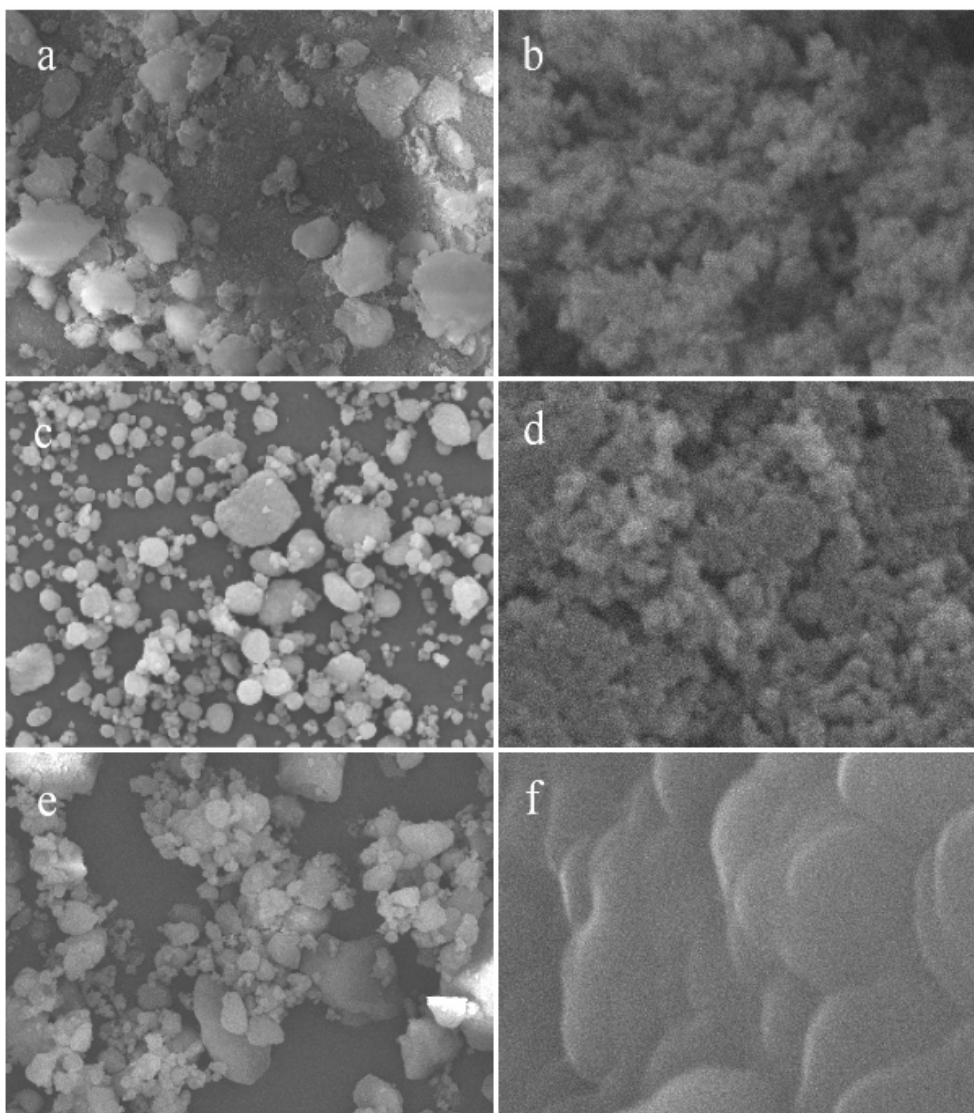


Figure 1. SEM micrographs of dexamethasone-loaded microparticles: (a) uncoated core (132  $\mu\text{m}$ ); (b) uncoated core (1.39  $\mu\text{m}$ ); (c) MP-NS (132  $\mu\text{m}$ ); (d) MP-NS (1.39  $\mu\text{m}$ ); (e) MP-NC (132  $\mu\text{m}$ ) and (f) MP-NC (1.39  $\mu\text{m}$ ).

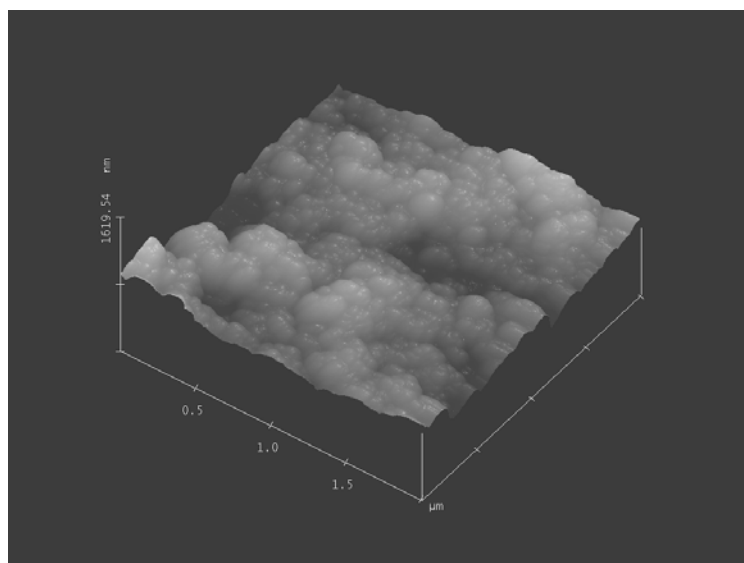


Figure 2. AFM image showing the surface topography of MP-NC-PEG (2 μm x 2 μm image).

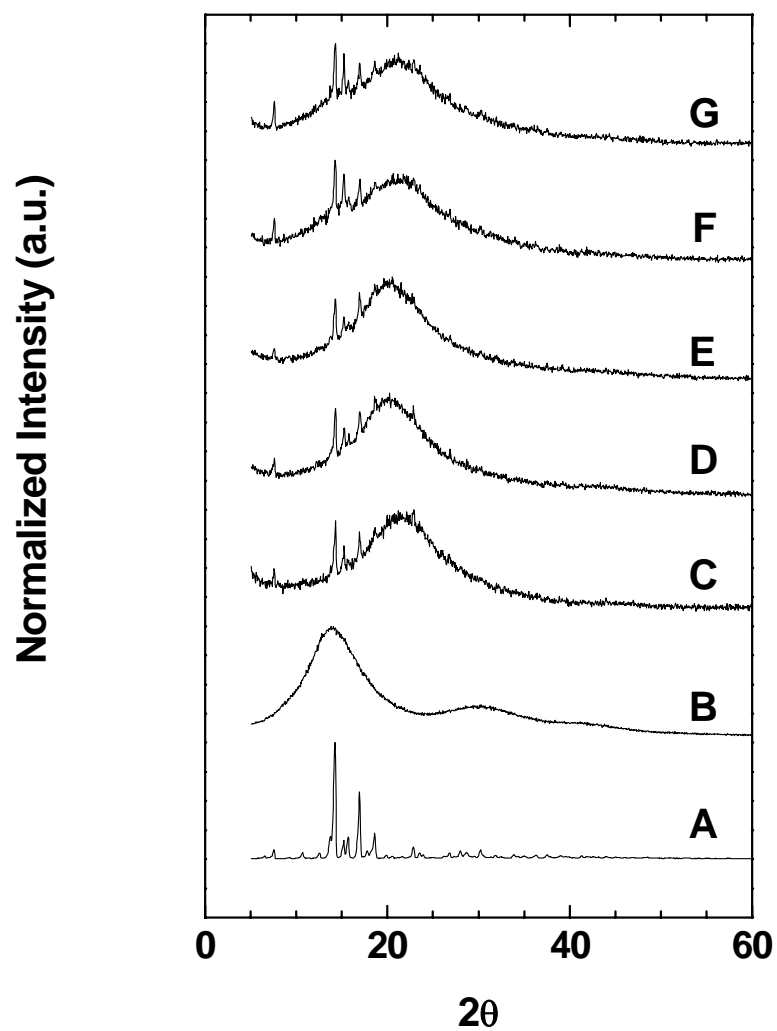


Figure 3. X-ray diffraction pattern of: (A) dexamethasone; (B) Eudragit S100<sup>®</sup>; (C) uncoated core; (D) MP-NC; (E) MP-NC-PEG; (F) MP-NS; (G) MP-NS-PEG.

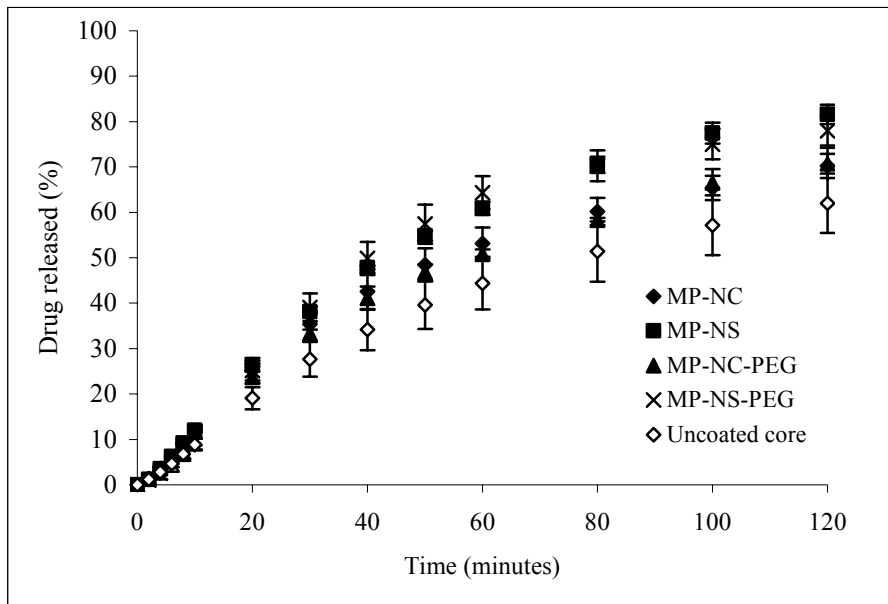


Figure 4. In vitro dexamethasone release profiles at pH 7.4.

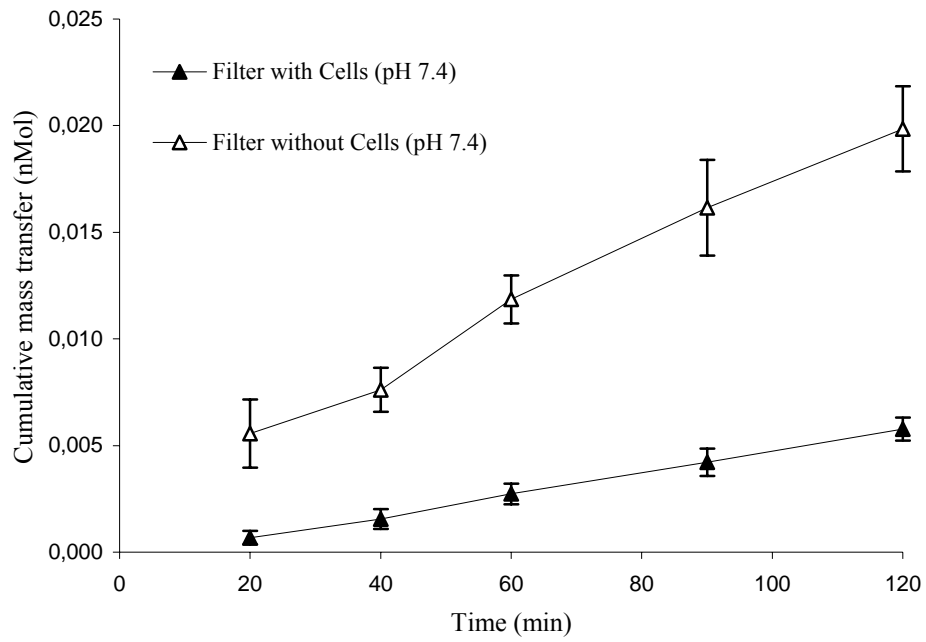


Figure 5. Dexamethasone transport (0.1  $\mu$ M) across filters with or without Caco-2 cells monolayers from a dexamethasone solution in HBSS pH 7.4 (Mean  $\pm$  sd, n = 6 or 3, for filters with or without cells, respectively).

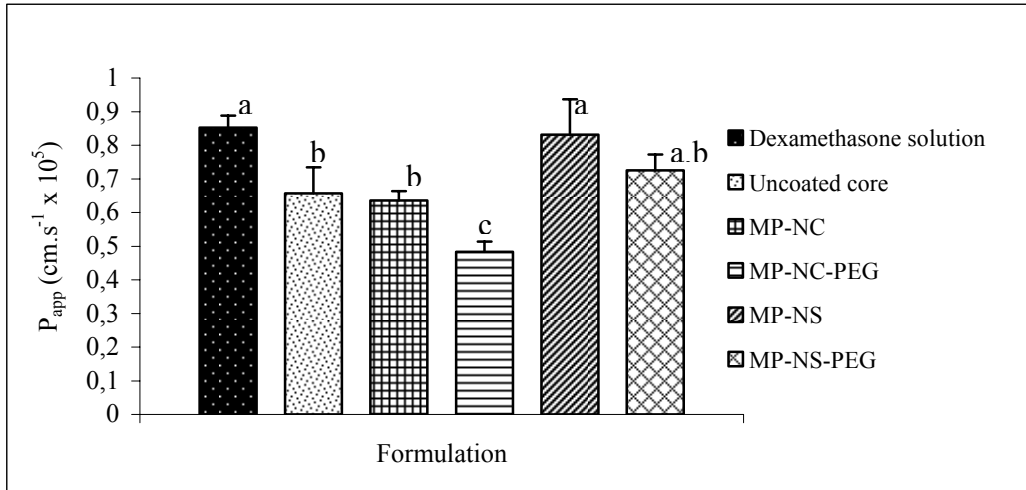


Figure 6. Permeability ( $P_{app}$ ) of dexamethasone from a dexamethasone solution (0.1  $\mu\text{M}$ ) and from microparticle suspensions across Caco-2 cells monolayers (Mean  $\pm$  sd, n = 6); Means with the same letter are not significantly different (Anova, Tukey test,  $p \leq 0.05$ ).



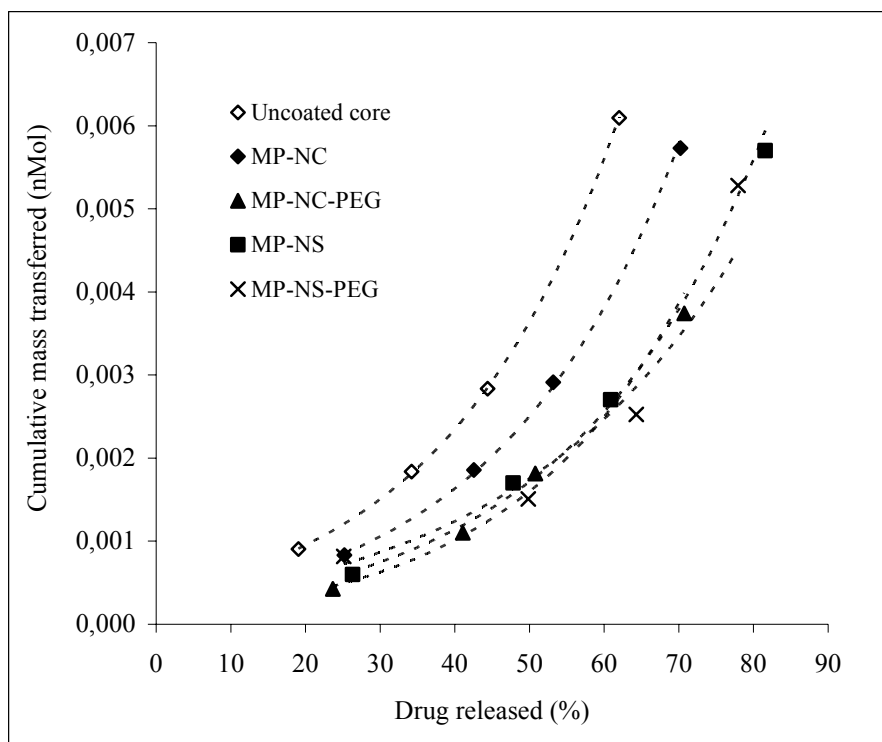


Figure 7. Cumulative mass transferred of dexamethasone (nMol) as a function of the percentual of dexamethasone released (20, 40, 60 and 120 minutes).

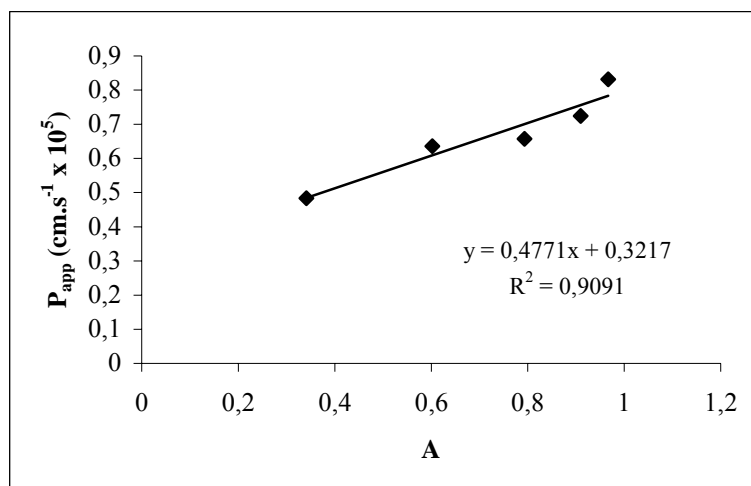


Figure 8. Permeability coefficients ( $P_{app}$ ) of dexamethasone across Caco-2 monolayers as a function of the A parameter calculated from the biexponential fit of release data.

## **DISCUSSÃO GERAL**

---

---



A nanotecnologia, uma ciência transdisciplinar, tem se destacado nos últimos anos em diversas áreas científicas e tecnológicas. No âmbito farmacêutico, estes estudos têm sido focalizados principalmente no desenvolvimento de sistemas carreadores de fármacos (vetores farmacêuticos), como os lipossomas, as nanoemulsões, as nanopartículas poliméricas e as nanopartículas de lipídeo sólido (Schaffazick *et al.*, 2003a; Ravi Kumar *et al.*, 2004).

Os sistemas coloidais poliméricos também têm sido estudados com outros objetivos, como o desenvolvimento de sistemas para administração oftálmica de fármacos, aumento na biodisponibilidade após administração oral, redução na toxicidade gastrointestinal de antiinflamatórios não-esteróides e como sistemas para liberação intrapulmonar e intranasal de fármacos, entre outros (Couvreur *et al.*, 1995; Schaffazick *et al.*, 2003a)

Diante destes aspectos, este projeto foi desenvolvido no sentido de buscar uma nova aplicação para os sistemas coloidais poliméricos (nanopartículas), estudando-se a possibilidade do seu emprego como material de revestimento na preparação de micropartículas através da secagem por aspersão, as quais foram denominadas micropartículas nanorrevestidas.

O estudo foi baseado em trabalhos anteriores deste grupo de pesquisa envolvendo a secagem por aspersão de nanopartículas poliméricas, com o objetivo de se obter produtos secos a partir das suspensões aquosas (Müller *et al.*, 2000; Guterres *et al.*, 2001; Müller *et al.* 2001; Raffin *et al.*, 2003). Estes estudos demonstraram resultados promissores em relação às propriedades dos pós obtidos e às avaliações *in vivo* (tolerância gastrointestinal e farmacocinética preliminar). Além disso, a observação dos produtos secos obtidos, através de microscopia eletrônica de varredura, demonstrava a presença de nanoestruturas adsorvidas sobre a superfície do dióxido de silício coloidal, empregado como adjuvante de secagem.

Frente a esta observação e aos resultados mencionados, surgiu a hipótese de trabalho de utilização destes materiais como sistema de revestimento. O

desenvolvimento desse sistema apresentava vantagens como a obtenção de um sistema microparticulado, a utilização de polímeros insolúveis em meio aquoso, evitando a utilização de solventes tóxicos e/ou explosivos no processo de revestimento, e a potencialidade de obtenção de um nanorrevestimento controlado, que poderia estar associado a uma menor variação no perfil de liberação do fármaco. Além das vantagens citadas, torna-se importante mencionar que a utilização desta técnica permitiria a obtenção de produtos secos com uma concentração final de fármaco superior àquelas obtidas nos trabalhos anteriores do grupo, aliada a uma concentração inferior de tensoativos, viabilizando uma maior facilidade na conversão destas micropartículas em formas farmacêuticas derivadas.

Inicialmente, foram necessários inúmeros testes pilotos para o ajuste da formulação, incluindo a redução no teor de tensoativos de 0,77 % (m/v) para 0,15 % (m/v), na preparação dos sistemas coloidais. Esta redução apresentou uma grande vantagem em relação ao sistema de secagem anterior (fármaco associado às nanoestruturas), que apresentava uma dificuldade na conversão dos pós em comprimidos devido às grandes quantidades de tensoativos. Após o ajuste inicial da formulação, foi desenvolvida a primeira fase do projeto (Capítulo 1) constituída pelo desenvolvimento da metodologia propriamente dita, pelo estudo da influência dos fatores do processo de secagem por aspensão sobre as características das micropartículas obtidas e o estudo do potencial destes novos sistemas na proteção da mucosa gástrica frente à toxicidade dos antiinflamatórios não-esteróides.

Os resultados obtidos nesta fase do trabalho demonstraram a aplicabilidade das nanopartículas poliméricas no desenvolvimento destes sistemas microparticulados, apontando características diferentes dos materiais, de acordo com o sistema nanoestruturado utilizado como material de revestimento (nanocápsulas ou nanoesferas). Na avaliação dos fatores que influenciam no processo de secagem, estas diferenças tornaram-se evidentes, pois a influência exercida pelos parâmetros estudados (temperatura e fluxo de alimentação) dependeu diretamente do material nanoestruturado utilizado no processo de revestimento. Principalmente, no caso das

nanocápsulas, observou-se a necessidade deste tipo de estudo para a otimização do processo, uma vez que o ajuste das condições permitiu a obtenção de micropartículas com boas características de taxa de encapsulação e rendimento, embora o teor de umidade final não tenha sofrido influência destes parâmetros. Em paralelo, a análise morfológica através de microscopia eletrônica de varredura permitiu a observação das nanoestruturas adsorvidas na superfície do núcleo orgânico-inorgânico, cujo tamanho está diretamente relacionado ao tamanho das nanopartículas na suspensão original.

Na seqüência, foram realizados os estudos de liberação *in vitro* do fármaco a partir das micropartículas. Os resultados evidenciaram a potencialidade destes sistemas em modificar a liberação de fármacos, demonstrada através das análises realizadas em relação ao controle (mistura física). Além disso, as diferenças encontradas entre os perfis de liberação a partir de sistemas revestidos por nanocápsulas ou nanoesferas demonstram a capacidade de desenvolvimento de sistemas compostos, de acordo com o perfil de liberação desejado. Outra vantagem do sistema pode ser apontada através da menor variação de liberação entre lotes diferentes de micropartículas nanorrevestidas, quando comparada à liberação do núcleo orgânico-inorgânico sem revestimento.

Com a finalidade de complementar esta primeira fase do trabalho, foi realizado o estudo da tolerância gastrointestinal em ratos, para avaliar a capacidade de proteção destes sistemas frente à toxicidade gastrointestinal do diclofenaco. Os resultados demonstraram a proteção destes efeitos deletérios a partir das micropartículas preparadas utilizando nanocápsulas poliméricas, concordando com os resultados anteriores do grupo. As micropartículas preparadas a partir de suspensões de nanoesferas não apresentaram o mesmo efeito protetor, provavelmente devido a um rearranjo no sistema ou a maior porosidade das nanoesferas, formadas unicamente por uma matriz polimérica, sem a presença do componente oleoso.

Na etapa seguinte (Capítulo 2), foi estudada a aplicação da técnica desenvolvida na preparação dos sistemas microparticulados utilizando um fármaco modelo hidrofílico ou lipofílico. A seleção do diclofenaco como fármaco modelo hidro e

lipofílico foi oportuna, pois minimizou a influência do tipo de fármaco empregado em relação a outros estudos encontrados na literatura, que apresentam modelos hidrofílicos e lipofílicos com esqueletos químicos diferentes. Além disso, foi estudada nesta fase do trabalho a influência da adição de um plastificante hidrofóbico (triacetina) à formulação.

Para a preparação das micropartículas contendo fármacos de solubilidade diferentes, fez-se necessária a preparação dos núcleos utilizando metodologias diferenciadas. Para fármacos lipofílicos, empregou-se a técnica de evaporação do solvente; enquanto que para fármacos hidrofílicos a preparação do núcleo foi realizada através da secagem por aspersão. Os resultados demonstraram a possibilidade de se preparar com sucesso os diferentes sistemas (solubilidade do fármaco e presença/ausência de plastificante), com variações nas características de rendimento e taxa de encapsulação. As análises morfológicas demonstraram a presença das nanoestruturas adsorvidas sobre o núcleo orgânico-inorgânico, independente da composição da formulação. A liberação *in vitro* apresentou perfis de liberação diferenciados, de acordo com a formulação (tipo de nanoestrutura adsorvida, natureza do fármaco, presença ou ausência do plastificante), demonstrando a possibilidade de utilização de fármacos com diferentes características de solubilidade na obtenção de sistemas farmacêuticos de liberação modificada.

Ainda nesta fase, foram realizados estudos através de microscopia eletrônica de varredura após a redispersão destas micropartículas em água e tampão pH 7,4. A seleção dos meios foi baseada na solubilidade pH-dependente do polímero. Os resultados obtidos após a redispersão em água, demonstraram a presença das nanopartículas na superfície do núcleo após 1 h de experimento, enquanto que após 1 h da redispersão em tampão pH 7,4 as nanoestruturas já apresentavam sinais de dissolução, não sendo mais possível a observação de seus limites. Para excluir a hipótese de estar ocorrendo uma desorção das nanoestruturas da superfície do núcleo, foi realizado um experimento adicional empregando micropartículas preparadas com nanopartículas de poli( $\epsilon$ -caprolactona), um polímero insolúvel em água, independente



da faixa de pH. Para esta formulação, a análise por microscopia eletrônica de varredura demonstrou a presença de nanoestruturas intactas na superfície do núcleo, comprovando que o resultado obtido com o Eudragit<sup>®</sup> era devido à dissolução do polímero. Este resultado mostra-se importante pois reforça a potencialidade do emprego destes sistemas como alternativa no revestimento de formas farmacêuticas microparticuladas.

Após estes estudos iniciais, quanto ao desenvolvimento e à aplicabilidade da técnica, os trabalhos foram focalizados na melhor compreensão e elucidação destes sistemas, através de um conjunto de técnicas que permitiram a caracterização morfológica das formulações em estudo. Desta forma, as micropartículas revestidas a partir de suspensões de nanoesferas foram caracterizadas através da determinação da área superficial, volume e distribuição de poros, tamanho de micropartículas, através das análises morfológicas por microscopia eletrônica de varredura e microscopia óptica e de análises através de difração de raios-X (Capítulo 3). Esta etapa do estudo permitiu a confirmação do revestimento observado através de microscopia eletrônica de varredura, evidenciado pelo conjunto das técnicas de determinação de área superficial, volume de poros e tamanho de partículas. Através da análise por microscopia óptica foi possível a observação de cristais presentes na formulação, de acordo com a solubilidade do fármaco modelo e do método de preparação do núcleo (evaporação do solvente ou secagem por aspersão). É importante ressaltar que a visualização destes cristais por microscopia eletrônica de varredura não foi possível, pois estes encontram-se na sua maior parte encapsulados dentro das micropartículas. Ainda, a análise por difração de raios-X confirmou a identidade dos cristais (diclofenaco ácido), visualizados através da microscopia óptica. É importante ressaltar que esta comparação também pode explicar a menor velocidade de liberação do diclofenaco a partir das micropartículas revestidas com nanoesferas, observada nos perfis de liberação *in vitro* para estas formulações (Capítulo 2).

Paralelamente, foram realizados os estudos de caracterização morfológica das micropartículas obtidas a partir do revestimento com suspensões de nanocápsulas

poliméricas (Capítulo 4). Através da análise dos resultados anteriores, pode-se observar que diferenças na composição do material de revestimento afetavam diretamente as características dos produtos finais, tais como taxa de encapsulação, tamanho de partícula e principalmente, perfil de liberação *in vitro*. Esta diferença provavelmente está baseada em diferenças evidentes entre suspensões de nanoesferas ou nanocápsulas, como a presença de um componente oleoso e a diferença no tamanho das nanopartículas.

A redução da área superficial e do volume de poros apresentadas pelas formulações preparadas a partir de suspensões de nanocápsulas, em relação ao núcleo não revestido, acompanharam a observação das nanoestruturas claramente evidenciadas através de microscopia eletrônica de varredura. Cabe ressaltar porém, que a redução na área superficial destas micropartículas foi substancialmente incrementada em relação àquelas obtidas a partir de nanoesferas, o que pode ser explicado pela menor porosidade destes sistemas nanoestruturados pela presença de um componente oleoso. Em relação às análises microscópicas não foi observada a presença de cristais nas micropartículas nanorrevestidas, independente da solubilidade do fármaco. Apesar disso, as análises por difração de raios-X demonstraram a presença de estruturas cristalinas de diclofenaco ácido em todas as micropartículas nanorrevestidas. A dificuldade de visualização destes cristais através de microscopia óptica, ao contrário do observado para as formulações preparadas a partir de nanoesferas, pode ser explicada pelo tamanho muito reduzido destes, limitando a sua observação. É importante ressaltar que esta hipótese quanto ao tamanho de cristais corrobora com a menor velocidade de liberação do diclofenaco a partir das micropartículas revestidas com nanoesferas, observada nos perfis de liberação *in vitro* para estas formulações (Capítulo 2).

Paralelamente, a integridade das nanoestruturas adsorvidas na superfície das micropartículas, após a aplicação de uma força de compressão, foi demonstrada através de observações morfológicas através microscopia eletrônica de varredura, que

demonstraram a manutenção das nanoestruturas intactas após a aplicação da força de compressão.

Conforme comentado, nestes estudos pôde-se observar claramente a influência do tipo de material nanoestruturado (nanoesferas ou nanocápsulas) utilizado como revestimento nas características dos sistemas microparticulados obtidos. Diante deste aspecto, no Capítulo 5, foi estudado o emprego de um terceiro sistema nanoestruturado como material de revestimento, formado por uma dispersão do polímero (Eudragit S100<sup>®</sup>) em tampão fosfato pH 7.4. O método empregado na preparação das micropartículas foi idêntico aos trabalhos anteriores. Entretanto, a vantagem deste sistema é a não-utilização de solvente orgânico tanto na preparação do sistema nanoestruturado, quanto na etapa de revestimento das micropartículas.

Os resultados do trabalho apresentaram micropartículas com boas características de rendimento e taxa de encapsulação. O revestimento das micropartículas foi observado através de microscopia eletrônica de varredura e confirmado pela redução na área superficial das partículas e no volume de poros. As nanoestruturas observadas na superfície das micropartículas, através da microscopia eletrônica de varredura, apresentaram uma ampla distribuição de tamanho de partícula, concordando com os resultados obtidos para a suspensão original, que apresentava nanopartículas entre 50 e 400 nm. Além disso, a avaliação da tolerância gastrointestinal mostrou que o revestimento com este material nanoestruturado é capaz de reduzir significativamente ( $p \leq 0,05$ ) os efeitos tóxicos do diclofenaco sobre a mucosa gastrointestinal em relação à solução de diclofenaco, núcleo sem revestimento ou mistura física de dióxido de silício coloidal e diclofenaco. Comparando-se os perfis de liberação do fármaco em pH 5,0 e 7,4 a partir destas micropartículas àqueles obtidos para micropartículas revestidas a partir de suspensões de nanoesferas ou nanocápsulas (Capítulo 1) pode-se observar que mesmo com a presença dos tensoativos nas formulações, aquelas apresentam menor velocidade e/ou quantidade de fármaco liberado, o que evidencia a influência do tampão fosfato, empregado na preparação destas micropartículas, e portanto, do pH, sobre a liberação do fármaco a partir destes sistemas.

Na etapa seguinte (Capítulo 6), foi realizado o estudo da incorporação de um segundo modelo de fármaco, com característica hidrofóbica e solubilidade independente do pH, a dexametasona. O trabalho confirmou os resultados obtidos para as micropartículas contendo diclofenaco, tanto para os parâmetros tecnológicos, quanto para as características de liberação do fármaco, uma vez que o tipo de material de revestimento levou a pós com diferentes perfis de liberação. As micropartículas preparadas a partir de suspensões de nanocápsulas apresentaram uma liberação menor em relação àquelas preparadas a partir de suspensões de nanoesferas.

Além da caracterização físico-química das formulações, foi avaliada, nesta fase, a influência da microencapsulação da dexametasona sobre sua absorção através de monocamadas de células Caco-2, um modelo celular do epitélio intestinal e a capacidade de utilização deste modelo *in vitro* como alternativa para se prever o comportamento de liberação de fármacos a partir de sistemas microparticulados. O estudo foi realizado em cooperação com o grupo de pesquisa alemão, liderado pelo Prof. Dr. Claus-Michael Lehr, durante o estágio de doutorado realizado junto ao Departamento de Biofarmácia e Tecnologia Farmacêutica, da Universidade de Saarland (Saarbrücken, Alemanha).

A avaliação da interação das micropartículas com as células Caco-2 demonstrou o controle ou retardamento na absorção da dexametasona quanto incorporada às micropartículas, de acordo com o tipo de nanoestrutura utilizado como material de revestimento. Esses resultados corroboram com todos os resultados obtidos anteriormente, que já mostravam características físico-químicas e biológicas diferenciadas para micropartículas preparadas a partir de suspensões de nanoesferas ou nanocápsulas. Pela análise dos resultados de liberação *in vitro* e permeação através das monocamadas celulares foi possível ainda se estabelecer uma correlação entre os resultados obtidos a partir dos diferentes métodos, demonstrando a potencialidade do modelo de transporte *in vitro* como ferramenta para se prever as características de liberação de um fármaco a partir de sistemas microparticulados.

Além disso, os estudos de citotoxicidade e acompanhamento da resistência elétrica transepitelial demonstraram que estas micropartículas nanorrevestidas não apresentam toxicidade sobre essa linhagem celular e também não rompem as monocamadas celulares.



**CONCLUSÕES**

---

---





- ✓ A técnica desenvolvida na presente tese de doutorado apresentou-se como uma nova aplicação dos sistemas coloidais poliméricos (nanopartículas);
- ✓ Através de um desenho experimental foi possível estabelecer as condições de secagem para a obtenção de micropartículas nanorrevestidas com características satisfatórias de rendimento, taxa de encapsulação, tamanho de partícula e umidade (temperatura de entrada: 170 °C e fluxo de alimentação: 3,0 e 4,5 ml/min para micropartículas nanorrevestidas a partir de suspensões de nanocápsulas ou nanoesferas, respectivamente);
- ✓ O estudo da influência dos fatores de secagem foi fundamental para a obtenção de micropartículas homogeneamente revestidas utilizando-se suspensões de nanocápsulas como material de revestimento;
- ✓ A preparação destas micropartículas foi possível utilizando-se diferentes métodos, como a secagem por aspersão ou a combinação da evaporação do solvente e secagem por aspersão;
- ✓ Os métodos de preparação de micropartículas nanorrevestidas puderam ser aplicados a fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos;
- ✓ Os estudos de liberação *in vitro* demonstraram que a possibilidade de se obter micropartículas com diferentes perfis de liberação, de acordo com o material de revestimento (nanocápsulas, nanoesferas ou nanodispersão polimérica);
- ✓ Quando um modelo hidrofóbico (diclofenaco ácido ou dexametasona) foi empregado, o maior retardamento da sua liberação foi obtido utilizando-se suspensões de nanocápsulas em presença de um plastificante (triacetina ou poligol 6000) na preparação das micropartículas;

- ✓ Quando um modelo hidrofílico (diclofenaco sódico) foi empregado o melhor retardamento da liberação foi obtido utilizando-se a metodologia em duas etapas para a preparação das micropartículas;
- ✓ A forma das micropartículas (irregular, esférica ou esferoidal) dependeu diretamente das técnicas envolvidas na sua preparação (evaporação do solvente e/ou secagem por aspersão). Partículas esféricas foram obtidas pela preparação envolvendo somente a técnica da secagem por aspersão; enquanto que partículas irregulares ou esferoidais foram obtidas através da técnica de evaporação do solvente ou combinação de ambas, respectivamente;
- ✓ O nanorrevestimento foi avaliado utilizando-se técnicas de microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica, que permitiram a visualização de nanoestruturas adsorvidas à superfície das micropartículas, com diâmetros similares àqueles determinados nas suspensões originais (60 a 70 nm e 170-200 nm para formulações preparadas a partir de nanoesferas ou nanocápsulas, respectivamente);
- ✓ A observação das nanoestruturas na superfície das micropartículas foi acompanhada por uma redução em sua área superficial ( $40\text{-}50\text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$  e  $115\text{-}135\text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$  para micropartículas revestidas a partir de suspensões de nanocápsulas ou nanoesferas, respectivamente) em relação ao núcleo não revestido ( $150\text{-}160\text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ );
- ✓ A integridade das nanoestruturas na superfície das micropartículas foi avaliada pela aplicação de uma força de compressão, sugerindo a possibilidade de se estudar a conversão destas micropartículas em formas farmacêuticas derivadas, como comprimidos;
- ✓ Exceto para a formulação preparada com o diclofenaco sódico em duas etapas, utilizando uma suspensão de nanoesferas como material de revestimento, todas as demais formulações de micropartículas nanorrevestidas apresentaram a

presença do fármaco em sua forma cristalina, conforme determinado através das análises por difração de raios-X;

- ✓ Foi possível a preparação de micropartículas nanorrevestidas com boas características de rendimento e taxa de encapsulação, utilizando uma dispersão polimérica nanoestruturada como material de revestimento, evitando a utilização de solventes tóxicos ou explosivos durante o processo de secagem por aspersão;
- ✓ A vantagem biológica das micropartículas nanorrevestidas foi demonstrada pelo efeito protetor sobre a mucosa gastrointestinal, apresentado pelas micropartículas obtidas a partir de suspensões de nanocápsulas e da dispersão polimérica nanoestruturada, frente aos efeitos tóxicos do diclofenaco;
- ✓ Os estudos de interação das micropartículas nanorrevestidas com células Caco-2 demonstraram que, dependendo do tipo de material de revestimento nanoestruturado utilizado em sua preparação, é possível modificar o transporte de um fármaco através das monocamadas de células Caco-2;
- ✓ Assim como nos estudos de liberação *in vitro*, o tipo de revestimento nanoestruturado influenciou a absorção do fármaco através das células Caco-2. Formulações preparadas a partir de nanocápsulas apresentaram uma maior diminuição nos valores de permeabilidade em relação à solução aquosa do fármaco;
- ✓ As micropartículas nanorrevestidas não apresentaram citotoxicidade sobre as células Caco-2 nas concentrações testadas (0,025 a 12,8 mg/ml) e não alteram a resistência elétrica transepitelial, indicando que estas não rompem as monocamadas celulares;
- ✓ Os estudos de correlação entre dados obtidos da liberação *in vitro* do fármaco a partir das micropartículas nanorrevestidas e aqueles obtidos a partir dos estudos de transporte através das monocamadas celulares demonstraram que a

metodologia *in vitro* utilizando células epiteliais do intestino pode ser uma ferramenta importante para prever a liberação de fármacos a partir de sistemas microparticulados;

- ✓ Através da análise do conjunto de resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que as micropartículas nanorrevestidas representam uma estratégia promissora no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

---



ALLEMANN, E., GURNY, R., DOELKER, E. Drug-Loaded Nanoparticles - Preparation Methods and Drug Targeting Issues. **European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals**, Stuttgart, v. 39, n. 5, p. 173-191, 1993.

AL-OMRAN, M. F.; AL-SUWAYEH, S. A.; EL-HELW, A. M.; SALEH, S. I. Taste lasking of Diclofenac Sodium Using Microencapsulation. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 19, n. 1. p. 45-52, 2002.

ALVES, G. P.; SANTANA, M. H. A. Phospholipid Dry Powders Produced by Spray-Drying Processing: Strucutural, Thermodynamic and Physical Properties. **Powder Technology**, Amsterdam, v. 145, p. 139-148, 2004.

AMMOURY, N.; DUBRASQUET, M.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J-PH.; PUISIEUX, F.; BENITA, S. Indomethacin-Loaded Poly (D,L-Lactide) Nanocapsules: protection from Gastrointestinal Ulcerations and Anti-Inflammatory Activity Evaluation in Rats. **Clinical Materials**, Amsterdam, v. 13, p. 121-130, 1993.

ARICA, B.; ARICA, M. Y.; KAS, H. S.; HINCAL, A. A.; HASIRCI, V. In Vitro Studies of Enteric Coated Diclofenac Sodium-Carboxymethylcellulose Microspheres. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 13, n. 6, p. 689-699, 1996.

ARTURSSON P.; PALM, K.; LUTHMAN, K. Caco-2 Monolayers In Experimental And Theoretical Predictions Of Drug Transport. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 46, n. 1-3, p. 27-43, 2001.

AZECHI, Y; ISHIKAWA, K.; MIZUNO, N.; TAKAHASHI, K. Sustained Release of Diclofenac from Polymer-Containing Suppository and the Mechanism Involved. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 26, n. 11, p. 1177-1183, 2000.

BARAS, B.; BENOIT, M. A.; GILLARD, J. Influence of various technological parameters on the preparation of spray-dried poly(epsilon-caprolactone) microparticles containing a model antigen. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 17, n. 4, p. 485-49

BASAN, H.; GÜMÜSDERELİOĞLU, M.; ORBEY, T. Diclofenac Sodium Releasing pH-Sensitive Monolithic Devices. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 245, p. 191-198, 2002.

BASSANI, V. L. **Valorisation de formes galéniques végétales: desalcoolisation et concentration des solutions extractives sur membrane d'osmose inverse**. 1990. Tese (Doutorado em Farmácia)- Faculté de Pharmacie, Montpellier, 1990.

BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; FREDDO, R. J.; MICHALOWSKI, C. B.; BARCELLOS, I.; FUNCK, J. A. Nanoparticles Containing Dexamethasone: Physicochemical Properties and Anti-Inflammatory Activity. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 22, n. 1, p. 11-15, 2003.

BILLA, N.; YUEN, K.; PEH, K. Diclofenac Release from Eudragit-Containing Matrices and Effects of Thermal Treatment. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 24, n. 1, p. 45-50, 1998.

BILLON A.; BATAILLE, B.; CASSANAS, G.; JACOB, M. Development of Spray-Dried Acetaminophen Microparticles using Experimental Designs. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 203, n. 1-2, p. 159-68, 2000.

BLANCO M. D.; BERNARDO, M. V.; SASTRE, R. L.; OLMO, R.; MUNIZ, E.; TEIJON, J. M. Preparation of Bupivacaine-Loaded Poly(Epsilon-Caprolactone) Microspheres by Spray Drying: Drug Release Studies and Biocompatibility. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 55, n. 2, p. 229-236, 2003.

BODMEIER, R.; MCGINITY, R. W. The Preparation and Evaluation of Drug-containing Poly(D,L-lactide) Microspheres formed by the Solvent Evaporation Method. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 4, n. 6, p. 465-471, 1987.

BODMEIER, R.; CHEN, H. Preparation of Biodegradable Poly( $\pm$ )Lactide Microparticles using a Spray-Drying Technique. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 40, p. 754-757, 1988.

BROADHEAD, J.; EDMOND ROUAN, S. K.; RHODES, C. T. The Spray Drying of Pharmaceuticals. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 18, n. 11 e 12, p. 1169-1206, 1992.

CERDEIRA, A. M.; GOUCHA, P.; ALMEIDA, A. J. Hydroxypropyl Methylcellulose Phtalate Beads Containing a Model Non-Steroid Anti-Inflammatory Drug. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 164, p. 147-154, 1998.

CHANDRASEKAR, M. J. N.; RAVICHANDRAN, M.; NANJAN, M. J., SURESH, B. Synthesis and Evaluation of a Nonsteroidal Anti-inflammatory Polymeric Prodrug for Sustained and Site-Specific Delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 27, n. 9, p. 959-964, 2001.

CHASTEIGNER, S., FESSI, H., DEVISSAGUET, J-P, PUISIEUX, F. Comparative Study of the Association of Itraconazole with Colloidal Drug Carriers. **Drug Development Research**, v. 38, p. 125-133, 1996a.



CHASTEIGNER, S.; CAVÉ, G.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J.Ph.; PUISIEUX, F. Freeze-Drying of Itraconazole-Loaded Nanosphere Suspensions : A Feasibility Study. **Drug Development Research**, v. 38, p. 116-124, 1996b.

CHAWLA, V.; TIWARY, A. K.; GUPTA, S. Characterization of Polyvinylalcohol Microspheres of Diclofenac Sodium: Application of Statistical Design. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 26, n. 6, p. 675-680, 2000.

CIOLLI, V.; PUTZOLU, S.; ROSSI, V.; BARCELLONA, P. S.; CORRADINO, C. The Role of Direct Tissue Contact in the Production of Gastrointestinal Ulcers by Anti-Inflammatory Drugs in Rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 50, p. 283-289, 1979.

COLUMBANO A.; BUCKTON, G.; WIKLEY, P. Characterisation of Surface Modified Salbutamol Sulphate-Alkylpolyglycoside Microparticles Prepared by Spray Drying. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 253, n. 1-2, p. 61-70, 2003.

CONFORTI. A.; DONINI, M.; BROCCO, G.; SOLDATO, P. D.; BENONI, G.; CUZZOLIN, L. Acute Anti-Inflammatory Activity and Gastrointestinal Tolerability of Diclofenac and Nitrofenac. **Agents Actions**, Basel, v. 40, p. 176-180, 1993.

CONTE, U.; CONTI, B.; GIUNCHEDI, P.; MAGGI, L. Spray Dried Polylactide Microsphere Preparation: Influence of the Technological Parameters. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 20, n. 3, p. 235-258, 1994.

CORTESI, R.; MENEGATTI, E.; ESPOSITO, E. Spray-drying production of trypsin-containing microparticles. **STP Pharma Sciences**, Paris, v. 13, n. 5, p. 329-334, 2003.

COUVREUR, P., DUBERNET, C., PUISIEUX, F. Controlled Drug Delivery with Nanoparticles: Current Possibilities and Future Trends. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 41, n. 1, p. 2-13, 1995.

COUVREUR P.; BARRATT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule Technology: A Review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, New York, v. 19, n. 2, p. 99-134, 2002.

CYPES S. H.; SALTZMAN, W. M.; GIANNELIS, E. P. Organosilicate-Polymer Drug Delivery Systems: Controlled Release and Enhanced Mechanical Properties. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 90, n. 2, p. 163-169, 2003.

DANGPRASIRT, P.; RITTHIDEJ, G. C. Development of Diclofenac Sodium Controlled-Release Solid Dispersions by Spray-Drying using Optimization Strategy .1. Powder Formulation. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 21, n. 20, p. 2323-2337 (1995).

DANGPRASIRT, P.; PONWAI, S. Development of Diclofenac Sodium Controlled release Solid Dispersion Powders and Capsules by Freeze Drying Technique using Ethylcellulose and Chitosan as Carriers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 24, n. 10, p. 947-953 (1998).

DANGPRASIRT, P.; RITTHIDEJ, G. C. Development of Diclofenac Sodium Controlled Release Solid Dispersion Tablet using Optimization Strategy. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 23, n. 8, p. 843-848, 1997.

DE JAEGHERE F.; ALLEMANN, E.; CERNY, R.; GALLI, B.; STEULET, A. F.; MULLER, I.; SCHUTZ, H.; DOELKER, E.; GURNY, R. Ph-Dependent Dissolving Nano- and Microparticles for Improved Peroral Delivery of a highly Lipophilic Compound In Dogs. **AAPS PharmSciences**, Alexandria, v. 3, n. 1, p. E8, 2001.

DE LABOURET, A.; THIOUNE, O.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J.P.; PUISIEUX, F. Application of an Original Process for Obtaining Colloidal Dispersions of some Coating Polymers. Preparation, Characterization, Industrial Scale-Up. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 21, n. 2, p. 229-241, 1995.

DE SOUZA T. P.; GONZALEZ ORTEGA, G.; BASSANI, V. L.; PETROVICK, P. R. Avaliação da viabilidade da compressão direta de formulações contendo alto teor de produto seco nebulizado de *Maytenus ilicifolia*. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 19, n. 2, p. 91-98, 2000.

DE SOUZA T. P.; BASSANI, V. L.; GONZALEZ ORTEGA, G.; DALLA COSTA, T. C.; PETROVICK, P. R. Influence of Adjuvants on the Dissolution Profile of Tablets Containing High Doses of Spray-Dried Extract of *Maytenus Illicifolia*. **Pharmazie**, Berlin, v. 56, n. 9, p. 730-733, 2001.

DEF 2001/02. Dicionário de Especialidades Farmacêuticas. 30ª Ed. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 2001.

DELGADO A.; LAVELLE, E. C.; HARTSHORNE, M.; DAVIS, S. S. PLG Microparticles Stabilised using Enteric Coating Polymers as Oral Vaccine Delivery Systems. **Vaccine**, Kidlington, v. 17, n. 22, p. 2927-2938, 1999.

DILOVA V.; SHISHKOVA, V. Albumin Microspheres as a Drug Delivery System for Dexamethasone: Pharmaceutical and Pharmacokinetic Aspects. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 45, n. 11, p. 987-989, 1993.

EINMAHL S.; ZIGNANI, M.; VARESIO, E.; HELLER, J.; VEUTHEY, J. L.; TABATABAY, C.; GURNY, R. Concomitant and Controlled Release of Dexamethasone and 5-Fluorouracil from Poly(Ortho Ester). **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 185, n. 2, p. 189-198, 1999.

EL-KAMEL, A. H.; SOKAR, M. S.; AL GAMAL, S. S.; NAGGAR, V. F. Preparation and Evaluation of Ketoprofen Floating Oral Delivery System. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 220, p. 13-21, 2001.

EL-SAYED, Y.; SULEIMAN, M. S.; HASAN, M.; NAJIB, N.; MUTTI, H.; ABDULHAMMED, M. Comparative Bioavailability and in Vitro Characterization of two Brands of Diclofenac Sodium Enteric-Coated Tablets. **International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy and Toxicology**, Munich, v. 26, n. 10, p. 487-491, 1988.

ESPOSITO E.; CERVELLATI, F.; MENEGATTI, E.; NASTRUZZI, C.; CORTESI, R. Spray Dried Eudragit Microparticles as Encapsulation Devices for Vitamin C. **International Journal of Pharmacy**, Amsterdam, v. 242, n. 1-2, p. 329-334, 2002.

FAIGLE J. W.; BOTTCHE, I.; GODBILLON, J.; KRIEMLER, H. P.; SCHLUMPF, E.; SCHNEIDER, W.; SCHWEIZER, A.; STIERLIN, H.; WINKLER, T. A New Metabolite of Diclofenac Sodium in Human Plasma. **Xenobiotica**, London, v. 18, n. 10, p. 1191-1197, 1988.

FARA, J. W.; MYRBACK, R. E. Formulation and Dosage Form design in Drug-Induced Topical irritation of the Gastrointestinal Tract. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 7, n. 6, p. 616-620, 1990.

FATTAL E.; PECQUET, S.; COUVREUR, P.; ANDREMONT, A. Biodegradable Microparticles for the Mucosal Delivery of Antibacterial and Dietary Antigens. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 242, n. 1-2, p. 15-24, 2002.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.PH. Procédé de préparation des systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules. **European Patent**, 0274961 A1, 1988.

FIEGEL, J.; FU, H.; HANES, J. Poly(ether-anhydride) Dry Powder Aerosols for Sustained Drug Delivery in the Lungs. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 96, n. 3, p. 411-423, 2004.

FRANSSEN, O.; HENNINK, W. E. A Novel Preparation Method for Polymeric Microparticles without the use of Organic Solvents. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 168, p. 1-7, 1998.

FREITAS, C.; MÜLLER, R. H. Spray-Drying of Solid Lipid Nanoparticles (SLN<sup>TM</sup>). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 46, p. 145-151, 1998.

GAVINI E.; CHETONI, P.; COSSU, M.; ALVAREZ, M. G.; SAETTONE, M. F.; GIUNCHEDI, P. PLGA Microspheres for the Ocular Delivery of a Peptide Drug, Vancomycin using Emulsification/Spray-Drying as the Preparation Method: In Vitro/In Vivo Studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 57, n. 2, p. 207-12, 2004.

GENTA I.; CONTI, B.; PERUGINI, P.; PAVANETTO, F.; SPADARO, A.; PUGLISI, G. Bioadhesive Microspheres for Ophthalmic Administration of Acyclovir. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 49, n. 8, p. 737-42, 1997.

GHASSABIAN, S.; EHTEZAZI, T.; FORUTAN, S. M.; MORTAZAVI, S. A. Dexamethasone-Loaded Magnetic Albumin Microspheres: Preparation and in Vitro Release. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 130, p. 49-55, 1996.

GILMAN, A. G.; RALL, T. W.; NIES, A. S.; TAYLOR, P. (Eds.). **Goodman & Gilman As bases farmacológicas da terapêutica**. 8<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1996.

GIUNCHEDI, P.; TORRE, M. L.; MAGGI, L.; CONTI, B.; CONTE, U. Cellulose Acetate Trimellitate Microspheres Containing NSAIDs. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 21, n. 3, p. 315-330, 1995.

GIUNCHEDI, P.; ONTI, B.; GENTA, I.; CONTE, U.; PUGLISI, G. Emulsion Spray-Drying for the Preparation of Albumin-Loaded PLGA Microspheres. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 27, n. 7, p. 745-750, 2001.

GOHEL, M. C.; AMIN, A. F. Formulation Optimization of Controlled release Diclofenac Sodium Microspheres using Factorial Design. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 51, p. 115-122, 1998.

GOLDBACH, P.; BROCHART, H.; STAMM, A. Spray-Drying of Liposomes for a Pulmonary Administration. I. Chemical Stability of Phospholipids. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 19, n. 19, p. 2611-2622, 1993a.

GOLDBACH, P.; BROCHART, H.; STAMM, A. Spray-Drying of Liposomes for a Pulmonary Administration. I. Retention of Encapsulated Materials. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 19, n. 19, p. 2626-2636, 1993b.

GONZALEZ-RODRIGUEZ M. L.; MAESTRELLI, F.; MURA, P.; RABASCO, A. M. In Vitro Release of Sodium Diclofenac from a Central Core Matrix Tablet Aimed for Colonic Drug Delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 20, n. 1, p. 125-131, 2003.

GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; BARRAT, G.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-PH. Poly (D,L-Lactide) Nanocapsules Containing Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: Gastrointestinal Tolerance Following Intravenous and Oral Administration. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 12, n. 10, p. 1-3, 1995.

GUTERRES, S. S.; MÜLLER, C. R., MICHALOWSKI, C. B.; POHLMANN, A. R.; DALLA COSTA, T. Gastro-intestinal Tolerance Following Oral Administration of Spray-Dried Diclofenac-Loaded Nanocapsules and Nanospheres. **STP. Pharma Sciences**, Paris, v. 11, n. 3, p. 229-233, 2001.

HASAN, M.; NAJIB, N.; SULEIMAN, M.; EL-SAYED, Y.; ABDEL-HAMID, M. In Vitro and In Vivo Evaluation of Sustained-Release and Enteric-Coated Microcapsules of Diclofenac Sodium. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 18, n. 18, p. 1981-1988, 1992.

HE, P.; DAVIS, S. S.; ILLUM, L. Chitosan Microspheres Prepared by Spray Drying. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 187, p. 53-65, 1999.

HERRERO-VANRELL R.; REFOJO, M. F. Biodegradable Microspheres For Vitreoretinal Drug Delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 52, n. 1, p. 5-16, 2001.

HICKEY T.; KREUTZER, D.; BURGESS, D. J.; MOUSSY, F. Dexamethasone/PLGA Microspheres For Continuous Delivery of an Anti-Inflammatory Drug for Implantable Medical Devices. **Biomaterials**, Guildford, v. 23, n. 7, p. 1649-1656, 2002.

HOMBREIRO-PEREZ, M.; ZINUTTE, C.; LAMPRECHT, A.; UBRICH, N.; ASATIER, A.; HOFFMAN, M.; BODMEIER, R.; MAINCENT, P. The Preparation and Evaluation of Poli( $\epsilon$ -Caprolactone) Microparticles Containing both a Lipophilic and a Hydrophilic Drug. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 65, p. 429-438, 2000.

HOMBREIRO-PEREZ M.; SIEPMANN, J.; ZINUTTI, C.; LAMPRECHT, A.; UBRICH, N.; HOFFMAN, M.; BODMEIER, R.; MAINCENT, P. Non-Degradable Microparticles Containing a Hydrophilic and/or a Lipophilic Drug: Preparation, Characterization and Drug Release Modeling. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 88, n. 3, p. 413-28, 2003.

HOSNY, E. A.; EL-MAHROUK, G. M.; GOUDA, M. W. Formulation and in Vitro and in Vivo Availability of Diclofenac Sodium Enteric-Coated Beads. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 24, n. 7, p. 661-666, 1998.

ICHIKAWA, H.; FUKUMORI, Y.; ADEYEYE. Design of Prolonged-Release Microcapsules Containing Diclofenac Sodium for Oral Suspensions and their Preparation by the Wurster Process. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 156, p. 37-48, 1997.

INSEL, P. A. Substâncias analgésicas-antipiréticas e antiinflamatórias; drogas empregadas no tratamento da artrite reumatóide e da gota. In: GILMAN, A. G. ; RALL, T. W.; NIES, A. S.; TAYLOR, P. (Eds.). **Goodman & Gilman As bases farmacológicas da terapêutica**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1990. Cap. 26, p. 421-448.

JAIN, R.; SHAH, N. H.; MALICK, A. W.; RHODES, C. Controlled Drug Delivery by Biodegradable Poly(Ester) Devices: Different preparative Approaches. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 24, n. 8, p. 703-727, 1998.

JOHN, V. A. The Pharmacokinetics and metabolism of Diclofenac Sodium (Voltarol®) in Animals and Man. **Rheumatology and Rehabilitation**, London, v. 2, supl. 2, p. 22-35, 1979.

KAKISH H. F.; TASHTOUSH, B.; IBRAHIM, H. G.; NAJIB, N. M. A novel Approach for the Preparation of highly Loaded Polymeric Controlled Release Dosage Forms of Diltiazem HCl and Diclofenac Sodium. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 54, n. 1, p. 75-81, 2002.

KAWASHIMA, Y.; IWAMOTO, T.; NIWA, T.; TAKEUCHI, H; HINO, T. Uniform and Improved Bioavailability of newly Developed Rapid and Sustained Release Suspensions of Ibuprofen Microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 89, p. 9-17, 1993.

KENYON C. J.; NARDI, R. V.; WONG, D.; HOOPER, G.; WILDING, I. R.; FRIEND, D. R. Colonic Delivery of Dexamethasone: A Pharmacoscintigraphic Evaluation. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 205-213, 1997.

KIBBE, A. H. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. London: Pharmaceutical Press, 2000.

KORTESUO, P.; AHOLA, M.; KANGAS, M.; JOKINEN, M.; LEINO, T.; VUORILEHTO, L.; LAAKSO, S.; KIESVAARA, J.; YLI-URPO, A.; MARVOLA, M. Effect of Synthesis Parameters of the Sol-gel-processed Spray-dried Silica Gel Microparticles on the Release Rate of Dexmedetomidine. **Biomaterials**, Guildford, v. 23, p. 2795—2801, 2002.

KOUROUNAKIS, P. N.; TSIAKITZIS, K.; KOUROUNAKIS, A. P.; GALANAKIS, D. Reduction of Gastrointestinal Toxicity of NSAIDs via Molecular Modifications Leading to Antioxidant Anti-Inflammatory Drugs. **Toxicology**, Amsterdam, v. 144, p. 205-210, 2000.

KREUTER, J.; HARTMANN, H. R. Comparative Study of the Cytostatic Effects and the Tissue Distribution of 5-Fluorouracil in a Free Form and Bound to Polybutylcyanoacrylate Nanoparticles in Sarcoma 180-Bearing Mice. **Oncology**, Basel, n. 40, p. 363-366, 1983.

KRISTMUNDSDÓTTIR, T.; GUDMUNDSSON, O. S.; INGVARSDÓTTIR, K. Release of Diltiazem from Eudragit Microparticles Prepared by Spray-Drying. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 137, p. 159-165, 1996.

KURKURI M. D.; AMINABHAVI, T. M. Poly(Vinyl Alcohol) and Poly(Acrylic Acid) Sequential Interpenetrating Network pH-Sensitive Microspheres for the Delivery of Diclofenac Sodium to the Intestine. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 96, n. 1, p. 9-20, 2004.

LACASSE F. X.; FILION, M. C.; PHILLIPS, N. C.; ESCHER, E.; MCMULLEN, J. N.; HILDGEN, P. Influence of Surface Properties at Biodegradable Microsphere Surfaces: Effects on Plasma Protein Adsorption and Phagocytosis. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 15, n. 2, p. 312-7, 1998.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANING, J. L. **The Theory and Practice of Industrial Pharmacy**. 3<sup>th</sup> ed., Philadelphia : Lea & Febiger, 1986.

LAMPRECHT, A.; TORRES, H. R.; SCHÄFER, U.; LEHR, C.-M. Biodegradable Microparticles as a Two-Drug Controlled Release Formulation: a Potential Treatment of Inflammatory Bowel Disease. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 69, p. 445-454, 2000a.

LAMPRECHT, A.; SCHÄFER, U. F.; LEHR, C.-M. Characterization of Microcapsules by Confocal Laser Scanning Microscopy: Structure, Capsule Wall Composition and Encapsulation Rate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 49, p. 1-9, 2000b.

LAMPRECHT, A.; SCHÄFER, U. F.; LEHR, C.-M. Visualization and Quantification of Polymer Distribution in Microcapsules by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 196, p. 223-226, 2000c.

LAMPRECHT, A.; SCHÄFER, U.; LEHR, C.-M. Size-Dependent Bioadhesion of Micro- and Nanoparticulate Carriers to the Inflamed Colonic Mucosa. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 18, n. 6, p. 788-793, 2001.

LAMPRECHT A.; YAMAMOTO, H.; TAKEUCHI, H.; KAWASHIMA, Y. Design of pH-Sensitive Microspheres for the Colonic Delivery of the Immunosuppressive Drug Tacrolimus. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 58, n. 1, p. 37-43, 2004.

LEE J. H.; PARK, T. G.; CHOI, H. K. Effect of Formulation and Processing Variables on the Characteristics of Microspheres for Water-soluble Drugs prepared by W/O/O Double Emulsion Solvent Diffusion Method. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 196, n. 1, p. 75-83, 2000.

LEE, J. Drug Nano- and Microparticles Processed into Solid Dosage Forms: Physical Properties **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 92, n. 10, p. 2057-2068, 2003.

LEOPOLD C. S.; FRIEND, D. R. In Vivo Pharmacokinetic Study for the Assessment of Poly(L-Aspartic Acid) as a Drug Carrier for Colon-Specific Drug Delivery. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, New York, v. 23, n. 4, p. 397-406, 1995.

LEWIS, L., BONI, R. L.; ADEYEYE, C. M. The Physical and Chemical Stability of Suspensions of Sustained-Release Diclofenac Microspheres. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 15, n. 5, p. 555-567, 1998.

LIN, S.; KAO, Y. Tablet Formulation Study of Spray-Dried Sodium Diclofenac Enteric-Coated Microcapsules. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 8, n. 7, p. 919-924, 1991.



LIN, S.-Z.; WOUESSIDJEW, D.; POELMAN, M.-C., DUCHÊNE, D. In Vivo Evaluation of Indomethacin/Cyclodextrin complexes. Gastrointestinal Tolerance and Dermal Anti-Inflammatory Activity. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 106, p. 63-67, 1994.

LIU J.; CHAN, S. Y.; HO, P. C. Polymer-Coated Microparticles for the Sustained Release of Nitrofurantoin. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 54, n. 9, p. 1205-1212, 2002.

LIVERSIDGE, G. G.; CONZENTINO, P. Drug Particle Size Reduction for Decreasing Gastric Irritancy and Enhancing Absorption of Naproxen in Rats. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 125, p. 309-313, 1995.

LO Y. L.; TSAI, J. C.; KUO, J. H. Liposomes And Disaccharides as Carriers in Spray-dried Powder Formulations of Superoxide Dismutase. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 94, n. 2-3, p. 259-272, 2004.

LUZZI L. A.; ZOGGIO, M. A.; MAULDING, H. V. Preparation and Evaluation of the Prolonged Release Properties of Nylon Microcapsules. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 59, n. 3, p. 338-341, 1970.

McLEOD, A. D.; FRIEND, D. R.; TOZER, T. N. Synthesis and Chemical Stability of Glucocorticoid-Dextran Esters: Potential Prodrugs for Colon-Specific Delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 92, p. 105-114, 1993.

MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticle Characterization: A Comprehensive Physicochemical Approach. **STP Pharma Sciences**, Paris, v. 1, n. 4, p. 221-241, 1991.

MARTINDALE, **The Extra Pharmacopoeia**, 31<sup>th</sup> ed. New York: Marcel Dekker, 1996.

MORISHITA M.; GOTO, T.; PEPPAS, N. A.; JOSEPH, J. I.; TORJMAN, M. C.; MUNSICK, C.; NAKAMURA, K.; YAMAGATA, T.; TAKAYAMA, K.; LOWMAN, A. M. Mucosal Insulin Delivery Systems Based on Complexation Polymer Hydrogels: Effect of Particle Size on Insulin Enteral Absorption. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 97, n. 1, p. 115-124, 2004.

MÜLLER, C. R.; BASSANI, V. L.; POHLMANN, A. R.; MICHALOWSKI, C. B.; PETROVICK, P. R.; GUTERRES, S. S. Preparation and Characterization of Spray-Dried Polymeric Nanocapsules. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 26, n. 3, p. 343-347, 2000.

MÜLLER, C. R.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R., FREITAS, L. DE LUCCA, PESCE DA SILVEIRA, N.; DALLA COSTA, T.; GUTERRES, S. S. Spray-Dried Diclofenac-Loaded Poly-( $\epsilon$ -Caprolactone) Nanocapsules and Nanospheres. Preparation and Physicochemical Characterization. **Pharmazie**, Berlin, v. 56, n. 11, p. 864-867, 2001.

MÜLLER, C. R.. **Produtos secos por aspersão a partir de suspensões de nanocápsulas contendo diclofenaco: caracterização físico-química e avaliação da viabilidade tecnológica de preparação de formas farmacêuticas sólidas derivadas**. 2003. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)-Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

MÜLLER, C. R.; HAAS, S. E.; BASSANI, V. L.; PERALBA, M. C. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Degradação e estabilização do diclofenaco em nanocápsulas poliméricas. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 555-560, 2004.

MURAKAMI, H.; KOBAYASHI, M.; TAKEUCHI, H.; KAWASHIMA, Y. Utilization of Poly(DL-Lactide-co-Glycolide) Nanoparticles for Preparation of Mini-Depot Tablets by Direct Compression. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 67, p. 29-36, 2000.

MUZZIO, F. J.; SHINBROT, T.; GLASSER, B. J. Powder Technology in the Pharmaceutical Industry: The Need to Catch up Fast. **Powder Technology**, Amsterdam, v. 124, p. 1-7, 2002.

NAKASE H.; OKAZAKI, K.; TABATA, Y.; UOSE, S.; OHANA, M.; UCHIDA, K.; MATSUSHIMA, Y.; KAWANAMI, C.; OSHIMA, C.; IKADA, Y.; CHIBA, T. Development of an Oral Drug Delivery System Targeting Immune-Regulating Cells in Experimental Inflammatory Bowel Disease: A new Therapeutic Strategy. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapy**, Baltimore, v. 292, n. 1, p. 15-21, 2000.

NOKHODCHI, A.; FARID, DJ.; NAJAFI, M.; ADRANGUI, M. Studies on Controlled-release Formulations of Diclofenac Sodium. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 23, n. 11, p., 1019-1023, 1997.

O'CONNOR, K. M.; CORRIGAN, O. I. Preparation and Characterization of a :Range of Diclofenac Salts. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 226, p. 163-179, 2001.

OBACH, E. S. **Avaliação dos perfis de liberação in vitro e da toxicidade gastrointestinal in vivo de indometacina a partir de nebulizados de nanopartículas.** 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

OBERLE, R. L.; DAS, H.; WONG, S. L.; CHAN, K. K. H.; SAWCHUK, R. J. Pharmacokinetics and Metabolism of Diclofenac Sodium in Yucatan Miniature Pigs. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 11, n. 5, p. 698-703, 1994.

ONEDA, F.; RÉ, M. I. The Effect of Formulation Variables on the Dissolution and Physical Properties of Spray-dried Microspheres Containing Organic Salts. **Powder Technology**, Amsterdam, v. 130, p. 377-384, 2003.

ORIENTI, I.; CHERCHIARA, T.; LUPPI, B.; BIGUCCI, F.; ZUCCARI, G.; ZECCHI, V. Influence of Different Chitosan Salts on the Release of Sodium Diclofenac in Colon-specific Delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 238, p. 51-59, 2002.

OSNES M.; LARSEN, S.; EIDSAUNET, W.; THOM, E. Effect of Diclofenac and Naproxen on Gastroduodenal Mucosa. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, St. Louis, v. 26, n. 3, p. 399-405, 1979.

OTEROESPINAR, F.J.; ANGUIANOIGEA, S.; GARCIA GONZALEZ, N.; VILAJATO, J. L.; BLANCOMENDEZ, J. Oral Bioavailability of Naproxen-Beta-Cyclodextrin Inclusion Compound. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 75, p. 37-44, 1991.

PALMIERI, G. F.; WEHRLE, P.; STAMM, A. Evaluation of Spray-Drying as a Method to Prepare Microparticles for Controlled Drug Release. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 20, n. 18, p. 2859-2879, 1994.

PALMIERI, G. F.; BONACUCINA, G.; DI MARTINO, P.; MARTELLI, S. Spray-Drying as a Method for Microparticulate Controlled Release Systems Preparation: Advantages and Limits. I. Water-Soluble Drugs. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 27, n. 3, p. 195-204, 2001.

PALMIERI G. F.; BONACUCINA, G.; DI MARTINO, P.; MARTELLI, S. Gastro-Resistant Microspheres Containing Ketoprofen. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 19, n. 1, p. 111-119, 2002.

PALOMO, M. E.; BALLESTEROS, M. P.; FRUTOS, P. Diclofenac Sodium Microcapsules: In Vitro Testing Considerations. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 23, n. 3, p. 273-283, 1997.

PAVANETTO F.; GENTA, I.; GIUNCHEDI, P.; CONTI, B.; CONTE, U. Spray-Dried Albumin Microspheres for the Intra-Articular Delivery of Dexamethasone. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 11, n. 4, p. 445-54, 1994.

PINTO, J. F.; MÜLLER, R. H. Pellets as Carriers of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for Oral Administration of drugs. **Pharmazie**, Berlin, v. 54, n. 7, p. 506-509, 1999.

POHLMANN A. R.; WEISS, V.; MERTINS, O.; PESCE DA SILVEIRA, N.; GUTERRES, S. S. Spray-Dried Indomethacin-Loaded Polyester Nanocapsules and Nanospheres: Development, Stability Evaluation and Nanostructure Models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 16, n. 4-5, p. 305-312, 2002.

POHLMANN, A. R.; SOARES, L. U., CRUZ, L.; PESCE DA SILVEIRA, N., GUTERRES, S. S. Alkaline Hydrolysis as a Tool to Determine the Association Form of Indomethacin in Nanocapsules Prepared with Poli( $\epsilon$ -Caprolactone). **Current Drug Delivery**, Brisbane, n. 1, v. 2, p. 103-111, 2004.

RAFFIN, R. P.; OBACH, E. S.; MEZZALIRA, G.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Nanocápsulas poliméricas secas contendo indometacina: Estudo de formulação e de tolerância gastrointestinal em ratos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 22, n. 2, p. 163-172, 2003.

RAINSFORD K. D.; WILLIS, C. Relationship of Gastric Mucosal Damage Induced in Pigs by Antiinflammatory Drugs to their Effects on Prostaglandin Production. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 27, n. 7, p. 624-635, 1982.

RAINSFORD, K. D. Mechanisms of Gastrointestinal Toxicity of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, Oslo, v. 24, suppl. 163, p. 9-16, 1989.

RAO, Y. M.; VENI, J. K.; JAYASAGAR, G. Formulation and Evaluation of Diclofenac Sodium using Hydrophilic Matrices. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 27, n. 8, p. 759-766, 2001.

RAVI KUMAR, M. N. V.; SAMETI, M.; KNEUER, C.; LAMPRECHT, A.; LEHR, C.-M. Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery and Gene Delivery. **Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology**, Stevenson Ranch, v. 9, p. 1-19, 2004.

RAZ, I.; HUSSEIN, Z.; SAMARA, E.; BEM-DAVID, J. Comparative Pharmacokinetic Analysis of a Novel Sustained-Release Dosage Form of Diclofenac Sodium in Healthy Subjects. **International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy and Toxicology**, Munich, v. 26, n. 5, p. 246-248, 1988.

RODRÍGUEZ, M.; VILA-JATO, J. L.; TORRES, D. Design of a new Multiparticulate System for Potential Site-Specific and Controlled Drug Delivery to the Colonic Region. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 55, p. 67-77, 1998.

ROY, D.; GUILLON, X.; LESCURE, F.; COUVREUR, P.; BRU, N.; BRETON, P. On Shelf Stability of Freeze-Dried Poly(Methylidene Malonate 2.1.1) Nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 148, p. 165-175, 1997.

SAEZ, M.; GUZMÁN, M.; MOLPECERES, J.; ABERTURAS, M. R. Freeze-Drying of Polycaprolactone and Poly(D,L-Lactic-Glycolic) Nanoparticles induce minor Particle Size Changes affecting the Oral Pharmacokinetics of Loaded Drugs. **Europeans Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 50, n. 3, p. 379-387, 2000.

SAJEEV C.; VINAY, G.; ARCHNA, R.; SAHA, R. N. Oral Controlled Release Formulation of Diclofenac Sodium by Microencapsulation with Ethyl Cellulose. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 19, n. 6, p. 753-760, 2002.

SARAVANAN M.; BHASKAR, K.; MAHARAJAN, G.; PILLAI, K. S. Ultrasonically Controlled Release and Targeted Delivery of Diclofenac Sodium via Gelatin Magnetic Microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 283, n. 1-2, p. 71-82, 2004.

SATTURWAR P. M.; MANDAOGADE, P. M.; DORLE, A. K. A Novel Method for Preparation of Eudragit RL Microcapsules. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 19, n. 4, p. 407-413, 2002.

SCHAFFAZICK S. R.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. L.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 5, p. 726-737, 2003a.

SCHAFFAZICK S. R.; POHLMANN, A. R.; DALLA-COSTA, T.; GUTERRES, S. S. Freeze-Drying Polymeric Colloidal Suspensions: Nanocapsules, Nanospheres and Nanodispersion. A Comparative Study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 56, n. 3, p. 501-505, 2003b.

SCHIMMER, B.P.; PARKER, K.L. Hormônio adreno-corticotrófico: esteróides adrenocorticais e seus análogos sintéticos: inibidores da síntese e das ações dos hormônios adrenocorticais. In: GILMAN, A. G. ; RALL, T. W.; NIES, A. S.; TAYLOR, P. (Eds.). **Goodman & Gilman As bases farmacológicas da terapêutica**. 9ª ed. Santiago: Imprensa Universitária. 1996.

SCHMIDT, C.; BODMEIER, R. Incorporation of Polymeric Nanoparticles into Solid Dosage Forms. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 57, p. 115-125, 1999.

SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. Freeze-Drying of Drug-Free and Drug-Loaded Solid Lipid Nanoparticles (SLN). **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 157, p. 171-179, 1997.

SENNA, E. L.; PETROVICK, P. R.; ORTEGA, G. G.; BASSANI, V. L. Preparation and Characterization of Spray-dried Powders from *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. extracts. **Phytotherapy Research**, London, v. 11, n. 2, p. 123-127, 1997.

SHAIKH, N. H.; DE YANES, S. E.; SHUKLA, A. J.; BLOCK, L. H.; COLLINS, C. C.; PRICE, J. C. Effect of Different Binders on Release Characteristics of Theophylline from Compressed Microspheres. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 17, n. 6, p. 793-804, 1991.

SHAM, J. O.-H.; ZHANG, Y.; FINLAY, W. H.; ROA, W. H.; LÖBENBERG, R. Formulation and Characterization of Spray-Dried Powders Containing Nanoparticles for Aerosol Delivery to the Lung. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 269, p. 457-467, 2004.

SOARES, L. A. L. **Padronização de extrato aquoso e desenvolvimento de produto seco por aspersão de *Phyllanthus niruri* L. – Euphorbiaceae (quebra-pedra)**. 1997. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.

SOHNGEN, E. C.; GODIN-OSTRO, E.; FIELDER, F. G.; GINSBERG, R. S.; SLUSHER, M. A.; WEINER, A. L. Encapsulation of Indomethacin in Liposomes provides Protection against both Gastric and Intestinal Ulceration when Orally Administered to Rats. **Arthritis and Rheumatism**, Atlanta, v. 31, n. 3, p. 414-422, 1988.

SOMMERFELD, P.; SCHROEDER, U.; SABEL, B. A. Long-Term Stability of PIBCA Nanoparticle Suspensions Suggests Clinical Usefulness. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 155, p. 201-207, 1997.

STIERLIN, H.; FAIGLE, J. W.; SALLMANN, A.; KÜNG, W.; RICHTER, W. J.; KRIEMLER, H. P.; ALT, O.; WINKLER, T. Biotransformation of Diclofenac Sodium (Voltaren®) in Animals and in Man I. Isolation and Identification of Principal Metabolites. **Xenobiotica**, London, v. 9, n. 10, p. 601-610, 1979.

TAKENAKA, H.; KAWASHIMA, Y.; LIN, S. Preparation of Enteric-Coated Microcapsules for Tableting by Spray-Drying Technique and In Vitro Simulation of Drug Release from the Tablet in GI Tract. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 69, n. 12, 1980.

TEIXEIRA, H. F. **Avaliação da influência de adjuvantes farmacêuticos sobre características físicas, químicas, tecnológicas e farmacológicas de extratos secos nebulizados de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae – marcela**. 1996. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

THIES, C. A Survey of Microencapsulation Processes. In: BENITA, S. **Microencapsulation: Methods and Industrial Applications**. 10<sup>th</sup> ed. New York: Marcel Dekker, 1996. Cap. 1, p. 1-19.

THIOUNE, O.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J.P.; PUISIEUX, F. Preparation of Pseudolatex by Nanoprecipitation: Influence of the Solvent Nature on Intrinsic Viscosity and Interaction Constant. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 146, p. 233-238, 1997.

TIRKKONEN, S.; URTTI, A.; PARONEN, P. Buffer Controlled Release of Indomethacin from Ethylcellulose Microcapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 124, p. 219-229, 1995.

TORRES, D.; GARCÍA-ENCINA, G.; SEIJO, B.; VILA JATO, J. L. Formulation and In Vitro Evaluation of HPMCP-Microencapsulated Drug-Resin Complexes for Sustained Release of Diclofenac. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 121, p. 239-243, 1995.

TOZER T. N.; RIGOD, J.; MCLEOD, A. D.; GUNGON, R.; HOAG, M. K.; FRIEND, D. R. Colon-Specific Delivery of Dexamethasone from a Glucoside Prodrug in the Guinea Pig. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 8, n. 4, p. 445-454, 1991.

TUNCAY, M., CALIS, S.; KAS, H. S.; ERCAN, M. T.; PEKSOY, I.; HINCAL, A. A. Diclofenac Sodium Incorporated PLGA (50:50) Microspheres: Formulation Considerations and in Vitro/in Vivo Evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 195, p. 179-188, 2000.

VAITHIYALINGAM, S.; MOHAMMAD, N.; REDDY, I.; KHAN, M. Preparation and Characterization of a Customized Cellulose Acetate Butyrate Dispersion for Controlled Drug Delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 91, n. 6, p. 1512-1522, 2002.

VAJDY M.; O'HAGAN, D. T. Microparticles for Intranasal Immunization. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 51, n. 1-3, p. 127-141, 2001.

VAN DEN MOOTER, G.; SAMYN, C.; KINGET, R. Azo Polymers for Colons-specific Drug Delivery. II. Influence of the Type of Azo Polymer on the Degradation by Intestinal Microflora. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 97, p. 133-139, 1993.

VYAS, S. P.; GOGOI, P. J.; JAIN, S. K. Development and Characterization of Pseudolatex based Transdermal Drug Delivery System of Diclofenac. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 17, n. 8, p. 1041-1058, 1991.

WALTER, K.; VON NIECIECKI, A. Relative Bioverfügbarkeit von Diclofenac nach Einmalgabe einer neuen Multiple-Unit Formulierung mit magensaftresistent befilmten Pellets. **Arzneimittel-Forschung**, Aulendorf, v. 51, n. 2, p. 643-650, 2001.

WAN, L. S. C.; HENG, P. W. S.; CHIA, C. G. H. Spray Drying as a Process for Microencapsulation and the Effect of Different Coating Polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 18, n. 9, p. 997-1011, 1992.

WANG, D.; YANG, M.; WONG, C. Formulation Development of Oral Controlled-Release Pellets of Diclofenac Sodium. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 23, n. 10, p. 1013-1017, 1997.

WANG L.; CHAW, C. S.; YANG, Y. Y.; MOOCHHALA, S. M.; ZHAO, B.; NG, S.; HELLER, J. Preparation, Characterization, and In Vitro Evaluation of Physostigmine-Loaded Poly(Ortho Ester) and Poly(Ortho Ester)/Poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) Blend Microspheres Fabricated by Spray-Drying. **Biomaterials**, Guildford, v. 25, n. 16, p. 3275-3282, 2004.

WATTS, P. J.; ILLUM, L. Colonic Drug Delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 23, n. 9, p. 893-913, 1997.

WEIß, G.; KNOCH, A.; LAICHER, A.; STANISLAUS, F.; DANIELS, R. Microencapsulation of Ibuprofen by a Coacervation Process using Eudragit L100-55 as an Enteric Polymer. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 19, n. 20, p. 2751-2764, 1993.



WEISS, V. **Avaliação tecnológica de suspensões e nebulizados de nanocápsulas e nanoesferas contendo indometacina**. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

WIELAND-BERGHAUSEN, S.; SCHOTE, U.; FREY, M.; SCHMIDT, F. Comparison of Microencapsulation Techniques for the Water-soluble Drugs Nitenpyram and Clomipramine HCl. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 85, n. 1-3, p. 35-43, 2002.

WILLIS, J. V.; KENDALL, M. J.; JACK, D. B. The Influence of Food on the Absorption of Diclofenac after Single and Multiple Oral Doses. **European Journal of Clinical Pharmacology**, Berlin, v. 19, p. 33-37, 1981.

YAMADA, T.; ONISHI, H.; MACHIDA, Y. Sustained Release Ketoprofen Microparticles with Ethylcellulose and Carboxymethylethylcellulose. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 75, p. 271-282, 2001.

YAMASHITA S.; FURUBAYASHI, T.; KATAOKA, M.; SAKANE, T.; SEZAKI, H.; TOKUDA, H. Optimized Conditions for Prediction of Intestinal Drug Permeability using Caco-2 Cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 10, n. 3, p. 195-204, 2000.

YEH M.; CHIANG, C. Inactive Vibrio Cholerae Whole-Cell Vaccine-Loaded Biodegradable Microparticles: In Vitro Release and oral Vaccination. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 21, n. 1, p. 91-106, 2004.

ZIMMER, A.; KREUTER, J. Microspheres and Nanoparticles used in Ocular Delivery Systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 16, p. 61-73, 1995.



**ANEXO 1:** Metodologia empregada no estudo de transporte do fármaco através de células Caco-2

---

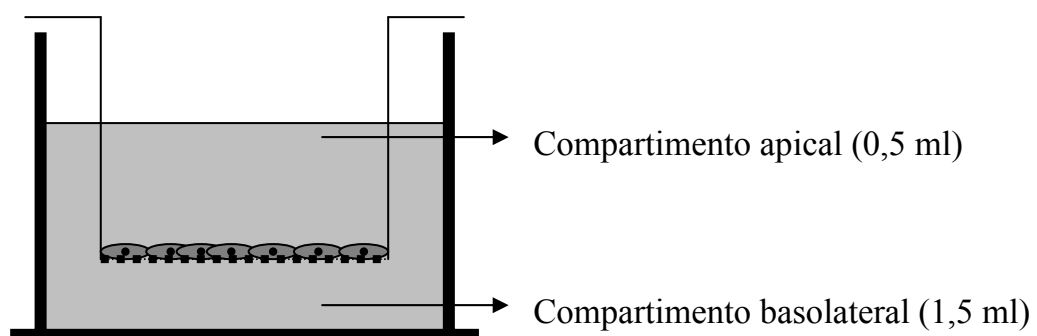
---



## Metodologia empregada no estudo de transporte do fármaco (dexametasona) através das células Caco-2

### 1) Preparação das monocamadas de células Caco-2

As células Caco-2 foram cultivadas em frascos de cultura contendo solução completa de DMEM-20, a 37 °C e em atmosfera contendo 5 % de CO<sub>2</sub>, cujo meio foi repostado a cada 48 horas. Após a formação do tapete celular, as células foram ressuspensas utilizando tripsina-EDTA e semeadas sobre filtros de polocarbonato – filtros Transwell® ((Costar, Corning Inc., Corning, NY) a uma densidade de  $6 \times 10^4$  células/filtro (Esquema 1). O meio de cultura (0,5 ml no compartimento apical e 1,5 ml no compartimento basolateral) foi repostado a cada 48 horas. Após um período de 21 dias de crescimento, a resistência elétrica transepitelial chega a um valor de equilíbrio, indicando a formação completa da monocamada celular.



Esquema 1. Filtro Transwell® contendo a monocamada celular

## 2) Estudo do transporte através das monocamadas celulares

Os estudos de permeabilidade foram realizados utilizando-se a solução salina balanceada de Hank (HBSS), ajustada a pH 7,4 com HEPES. Após serem retiradas da câmaras de umidade e temperatura controlada, ambos os compartimentos do filtro contendo a monocamada (apical e basolateral) foram lavados duas vezes com HBSS pH 7,4 e a resistência elétrica transepitelial foi medida (EVOM, WPI, Alemanha). Após, as placas contendo os filtros foram incubadas a 37 °C durante 1 hora, seguida de nova avaliação da resistência elétrica transepitelial com posterior remoção completa do HBSS pH 7,4. A amostra, diluída ou suspensa em HBSS pH 7,4 (0,6 ml) foi então adicionada ao compartimento apical, seguida da adição de 1,5 ml do HBSS pH 7,4 sem amostra, no compartimento basolateral. Para a determinação da concentração inicial, foram tomadas alíquotas de 100 µl do compartimento apical, iniciando-se a contagem do tempo. Também foram coletadas alíquotas de 400 µl do compartimento basolateral, para a determinação da concentração no tempo 0, com reposição do meio, neste caso. Após essa primeira coleta, as placas contendo os filtros foram incubadas a 37 °C sob leve agitação (agitador orbital). Em seguida, foram realizadas coletas subseqüentes de 400 µl do compartimento basolateral, nos tempos pré-determinados (20, 40, 60, 90, 120, 150, 180, 240 minutos). O volume da solução no compartimento basolateral manteve-se constante pela reposição do meio após cada tomada de amostra. As amostras foram transferidas a frascos para doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência, após adequada diluição. O cálculo do Coeficiente de Permeabilidade Aparente ( $P_{app}$ ) foi realizado utilizando-se a seguinte equação:

$$P_{app} = dQ / dt \times l / AC_0$$

Onde,  $dQ/dt$  é a velocidade de aparecimento do fármaco no compartimento basolateral, em  $\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}$ , dado pelo coeficiente angular (inclinação) da reta obtida plotando-se a quantidade de fármaco no compartimento basolateral (nmol) em função do tempo (segundos);  $A$ : é a área superficial da monocamada celular ( $\text{cm}^2$ ) e  $C_0$  é a concentração inicial da amostra aplicada no compartimento apical (mM).





**ANEXO 2: Pareceres da Banca Examinadora**

---

---



## **BIOGRAFIA**

Nome: Ruy Carlos Ruver Beck

Data de nascimento: 08/06/1974

### **Graduação:**

Farmácia (1992-1995): Universidade Federal de Santa Maria

Farmácia Industrial (1996-1998): Universidade Federal de Santa Maria

### **Pós-Graduação:**

Nível: Mestrado (1998-2000)

Dissertação: Desenvolvimento e caracterização físico-química de nanopartículas contendo dexametasona. Avaliação da atividade antiinflamatória do fármaco associado.

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Farmacêuticas

Universidade Federal de Santa Maria

Nível: Doutorado (2001-2005)

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

### **Lista de publicações:**

BECK, R. C. R. Determinação Quantitativa da Dexametasona em Matéria-Prima e Comprimidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 20, n. 2. p. 127-131, 2001.

BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; FREDDO, R. J.; MICHALOWSKI, C. B.; BARCELLOS, I.; FUNCK, J. A. Nanoparticles Containing Dexamethasone: Physicochemical Properties and Anti-Inflammatory Activity. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 22, n. 1, p. 11-15, 2003.

BECK, R. C. R., POHLMANN, A. R., GUTERRES, S. S. Nanoparticle-coated Microparticles: Preparation and Characterization. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 21 p. 499-512, 2004.

BECK, R. C. R., POHLMANN, A. R., BENVENUTTI, E. V., DALLA COSTA, T., GUTERRES, S. S. Nanostructure-Coated Diclofenac-loaded Microparticles: Preparation, Morphological Characterization, in vitro Release and in vivo Gastrointestinal Tolerance. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, *in press*, 2005.