

Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de eudragit L100 preparadas pela técnica de nanomoagem húmida para posterior incorporação de compostos bioactivos

Development and characterization of eudragit L100 nanoparticles prepared by wet nanogrinding for further incorporation of bioactive compounds

Rosa Pereira^{1,2}, Tommy Julianto², Kah-Hay Yuen³, Abu Bakar Majeed^{2*}.

¹Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona, Campo Grande, 376, 1749-024, Lisboa, Portugal.

²Nanopharmacy Research Unit, Faculty of Pharmacy, Universiti Teknologi MARA, Shah Alam, Malaysia.

³School of Pharmaceutical Sciences, Universiti Sains Malaysia, Pulau Pinang, Malaysia.

E-mail: abubakar@salam.uitm.edu.my

Resumo

Neste estudo, propomos uma nova metodologia para a produção de nanopartículas poliméricas formadas a partir de um polímero do tipo polimetacrilato -Eudragit L100. O papel da nanomoagem húmida na redução do tamanho das partículas do pó Eudragit L100 foi investigada através da caracterização de diversos parâmetros importantes, tais como: o tamanho das esferas de moagem, a concentração e tipo de estabilizadores das nanosuspensões, a concentração do polímero, a velocidade de agitação do nanomoíno e, por último o tempo de moagem.

Com o objectivo final de se obter um pó seco que permita uma melhor manipulação e armazenamento destas partículas, as metodologias de liofilização e de secagem por aerossol foram comparadas. As nanopartículas optimizadas foram testadas em soluções electrolíticas e ácidas, que mimetizam as condições fisiológicas encontradas no tracto gastrointestinal humano. Foi demonstrado que é necessária a combinação de dois tipos diferentes de estabilizadores (eletrostático (SLS) e estérico (PVA)) para se obterem nanopartículas com dimensões na escala nanométrica, bem como uma melhor redispersão destas partículas em soluções electrolíticas e ácidas que simulam as condições fisiológicas in vivo. Outros estudos serão posteriormente realizados com a finalidade de se produzir por esta técnica nanopartículas que encapsulem compostos bioactivos, com o intuito de melhorar a solubilidade e/ou biodisponibilidade dos compostos encapsulados in vivo.

Palavras chave: Sensibilidade ao pH, nanopartículas, nanomoagem, optimização da técnica

Abstract

In this study, we propose a novel methodology to produce nanosized polymeric nanoparticles based on the polymethacrylate polymer Eudragit L100. The role of wet-nanogrinding on the grinding of eudragit L100 powder has been investigated by varying important grinding parameters such as media bead size, concentration and type of stabilizers, polymer concentration, agitation speed, and milling time. In order to obtain a dried powder that allows further formulation of these particles, freeze-drying and spray-drying methodologies were compared. The physical profile of optimized powder nanoparticles were then tested in electrolyte solutions, which mimic the conditions found in the human gastrointestinal tract.

It was shown that the combination of two different types of stabilizers both electrostatic (SLS) and steric (PVA) led to a smaller particle size and a better redispersion in both electrolyte and acidic media that mimic the conditions in vivo. Further studies will be carried out in order to produce bioactive loaded nanoparticles by this procedure possibly with improved solubility and/or bioavailability in vivo.

Key words: pH-sensitive, nanoparticles, nanogrinding, process optimization

Recebido em 19/03/2010

Aceite em 12/04/2010

Rev. Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde, 2010; (7) 1: 117-131

Versão electrónica: <http://revistas.ulusofona.pt/index.php/revistasaude>

Introdução

Nas últimas décadas, um esforço notável tem sido direccionado para o desenvolvimento de novos sistemas de transporte de fármacos, que permitam simultaneamente a protecção físico-química e as melhorias nos perfis de libertação dos fármacos encapsulados, sobretudo de compostos bioactivos. Diversas estratégias, tais como a micronização, a formação de dispersões por adição de aditivos, a presença de solventes, a emulsificação e a microemulsificação, e o desenvolvimento de sistemas de veiculação poliméricos e lipídicos, têm sido perseguidas, tanto na micro como na nano escala^[1-5]. No entanto, estas técnicas depararam-se com novos obstáculos, como a polidispersão das partículas, a presença de solventes orgânicos, processos de produção elaborados e a dificuldade em transpor para um nível industrial as tecnologias desenvolvidas^[6,7]. Em relação à produção de nanopartículas poliméricas propriamente ditas, podem-se encontrar essencialmente duas metodologias gerais descritas na literatura. O primeiro método envolve processos bottom-up (do simples para o complexo) como a auto-montagem e modelos de síntese modelados, enquanto o segundo método envolve um processo de top-down (do complexo para o simples). Este último método pode ser realizado recorrendo a um dispositivo mecânico conhecido como nanomoinho, no qual uma fonte de energia é direccionada para um material em dispersão formado por partículas de dimensões elevadas, resultando numa redução substancial do tamanho inicial da partícula^[8]. Esta tecnologia tem sido aplicada com sucesso para a produção de ingredientes farmacêuticos activos (API), com partículas de tamanho entre 100 a 200 nm. Estas partículas apresentam diversas vantagens, tais como: um aumento da taxa de dissolução e, uma maior biodisponibilidade e menor variabilidade na absorção, após a administração oral de API, na presença de alimentos.

Existem actualmente cinco produtos farmacêuticos comerciais baseados nesta tecnologia: Rapamune, Emend, TriCor, ES Megace e Triglide^[9]. Ao contrário das nanopartículas API, existe informação limitada sobre a produção de nanopartículas poliméricas através da nanomoagem^[10].

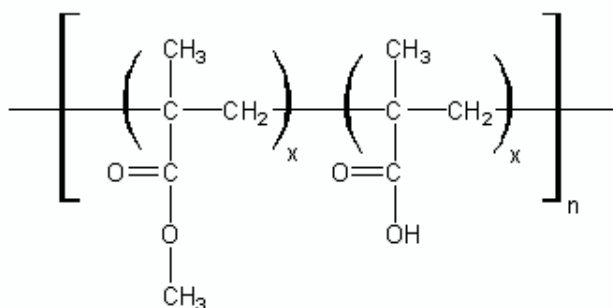
O polímero Eudragit L100 é um copolímero de ésteres de ácido acrílico e metacrílico que apresenta um baixo teor de grupos de amónio quaternário que conferem ao polímero a capacidade de entumescer. A estrutura química do Eudragit L100 pode ser visualizada na Figura 1. É um material de encapsulação comum, utilizado frequentemente pela indústria farmacêutica, com um perfil de segurança estabelecido. Este polímero é estável em pH ácido, mas é dissolvido

Introdução

Over the last decades, significant research effort has been directed to develop new drug delivery systems and to resolve issues such as drug protection, targeting and drug release of bioactive compounds. Several strategies such as micronization, additive-aid dispersions, inclusion of organic solvents, emulsification, microemulsification, and development of polymeric and lipidic carriers both in the micro and nano-range have been developed^[1-5]. However, these techniques introduce new obstacles such as particle broad distribution, presence of organic solvents, multi-step production processes and difficulty to scale-up the technology^[6,7]. When polymeric nanoparticles were considered, two general methodologies for their production were reported in the literature. The first method involves bottom-up processes such as self-assembly and template synthesis while the second method entails a top-down procedure. The latter involves a mechanical device known as the nanomill, in which an input of energy is imparted to a coarse-grained material resulting in a reduction of initial particle size^[8]. This technology has been applied with success to active pharmaceutical ingredients (API) resulting in the production of API particles of size 100-200 nm. These API particles present several advantages such as increase in the rate of dissolution, enhanced bioavailability and decreased variability upon the oral administration of drugs in the presence of food. There are currently five commercial pharmaceutical products based on this technology, Rapamune, Emend, TriCor, Megace ES and Triglide^[9]. Unlike the API nanoparticles, there is little work on polymeric nanoparticles produced by nanogrinding^[10]. Eudragit L100 polymer is a copolymer of acrylic and methacrylic acid esters with a low content of quaternary ammonia groups that are capable of swelling. The chemical structure of eudragit L100 is shown in Figure 1. It is a common and popular encapsulation material employed by the pharmaceutical industry, and has an established track record of safety. This polymer is stable at acidic pH but dissolves above pH 6.0. These are critical properties for nanoparticles to protect bioactive compounds in the stomach and subsequently release them in the absorptive region of the GI tract. The mechanism of dissolution of the polymer and drug release has been reported in detail by El Kamel et al. (2001)^[11] and is believed to be a combined dissolution and swelling processes^[12, 13]. We recently produced cefotaxime sodium and griseofulvin loaded-L100 nanoparticles by a bottom-up, pH-sensitive nanoprecipitation method^[14,15]. Nevertheless there has been relatively few publications on the preparation of polymeric nanoparticles using a wet-milling process. The fundamentals of fine grinding were established by

acima de um pH de 6,0. Estas propriedades são essenciais para a produção de nanopartículas que irão permitir a protecção de compostos bioactivos no estômago e, posteriormente, localizá-los junto da janela de absorção favorável para estes compostos no tracto gastrointestinal.

Klaus Schonert in the 1990s^[16, 17] and those of stirred milling were developed earlier in the 1980s and 1990s by Steier, Schwedes, Stehr and Kwade^[18-21]. Their work led to the development of new generation of stirred mills capable of finer grinding.



Composition	Poly (methacrylic acid, methylmethacrylate 1 1)
Tg (C)	67
Density (g/cm3)	0,83-0,85
MW (g/mol)	115000

Figura 1 - Estrutura química e propriedades fisico-químicas do polímero Eudragit L100
Figure 1 - Chemical structure and physicochemical properties of Eudragit L100 polymer [27-29].

O mecanismo de dissolução do polímero e liberação do fármaco foi descrito em detalhe por El Kamel et al. (2001)^[11] e pensa-se que resulte de um mecanismo combinado de dissolução com um processo de entumescimento^[12,13]. Recentemente, foram produzidas nanopartículas de L100 encapsulando cefotaxima sódica e griseofulvina por método de nanoprecipitação induzido por variação do pH^[14,15]. Não obstante, existem poucas publicações sobre a preparação de nanopartículas poliméricas usando um processo de nanomoagem húmida.

Os fundamentos da nanomoagem foram estabelecidos por Klaus Schonert na década de 90 e os de moagem por agitação desenvolvidos nas décadas de 80 e 90 por Steier, Schwedes, Stehr e Kwade^[18-21]. Estas descobertas levaram ao desenvolvimento de uma nova geração de moinhos capazes de realizar uma moagem mais fina por um mecanismo de agitação.

A fim de se produzir nanodispersões poliméricas, a utilização simultânea de fenómenos químicos e mecânicos, designado globalmente por processamento químico-mecânico, é necessária. Este processo é baseado na combinação da moagem mecânica de pós

In order to produce nanoscaled polymeric dispersions, the simultaneous utilization of chemical and mechanical phenomena, so called chemomechanical processing, is necessary. This process is based on the combination of the mechanical grinding of polymeric powders in agitator bead mills and the ruling of colloidal chemistry in order to tailor-made an appropriate particle surface chemistry and size.

In the present work, we present a novel approach for the production of polymeric eudragit L100 nanoparticles for further incorporation of bioactive compounds. We studied the effect of addition of different electrostatic and steric stabilizers alone or in combination to promote the stabilization of the formed polymeric dispersions. There is a large number of parameters affecting grinding in stirred mills where 44 parameters were early identified by Molls and Hornle (1972)^[22]. Moreover, Gao et al. (1996)^[23] conducted series of laboratory experiments to identify the most important parameters that could affect grinding performances. As such, the second focus of this research was to select and study the more important parameters of nanogrinding when a zeta nanomill from Netzsch was used grinding

de polímeros em moinhos de bola com agitadores, com a formulação adequada das dispersões com base na química coloidal, com o objectivo final de se obterem nanopartículas com uma química de superfície adequada.

No presente trabalho, apresentamos uma nova abordagem para a produção de nanopartículas poliméricas de Eudragit L100, para a posterior incorporação de compostos bioactivos. Foi estudado o efeito da adição de diferentes agentes estabilizadores (electrostáticos e estéricos), quer isoladamente ou em associação, para promover a estabilização das nanodispersões poliméricas formadas.

Um grande número de parâmetros afecta o resultado da moagem em moinhos. Molls e Hörnle (1972) ^[22] identificaram 44 parâmetros com influência nos resultados finais das dispersões. Gao et al. (1996) ^[23], realizaram uma série de experiências para identificar os parâmetros mais importantes que poderiam afectar o desempenho da moagem. Tornou-se necessário, para este trabalho, seleccionar e estudar os parâmetros mais importantes da nanomagem quando um nanomoíno zeta da Netzsch foi utilizado. Estes parâmetros são importantes já que a acção da alta energia de moagem sobre o fraccionamento materiais poliméricos está dependente de componentes individuais e de um campo de deformação complexa no qual o cisalhamento, a extensão multiaxial e a fractura coexistem para produzir partículas poliméricas de tamanho reduzido [24,25].

O objectivo do trabalho é o de produzir nanopartículas poliméricas de eudragit L100 tendo por base a nanomoagem húmida. Pretende-se simultaneamente identificar os parâmetros que poderão influenciar o método de forma significativa, de forma a que o processo seja optimizado e, leve à formação de nanopartículas estáveis, com um tamanho próximo dos 100 nm.

Materiais e métodos

Materiais

Eudragit L100 pH-sensíveis copolímero foram adquiridos Rohm (Darmstadt, Alemanha). Polivinil álcool (PVA) de 88% -89% hidrolisado, Pluronic F-68, Tween 80, Brij 75 e dodecilsulfato de sódio (SDS) foram adquiridos à Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). A água foi purificada pelo sistema MilliQ (Millipore, UK).

Preparação de nanopartículas de Eudragit L100 por nanomoagem húmida

Os nanosuspensões foram preparadas com o sistema nanomill Zeta (Netzsch, E.U.A.), usando esferas de alta

media, mill speed and polymer concentration. These parameters are highly important since high-energy milling of polymeric materials subjects the components to a complex deformation field in which shear, multiaxial extension and fracture of the particles coexist ^[24,25].

The aim of the present work is to produce polymeric nanoparticles of eudragit L100 based on wet-nanogrinding procedure. Furthermore, we intend to identify the factors that significantly influence this method, to allow the optimization of the milling procedure, in order to attain stable nanoparticles with a size around 100 nm.

Materials and methods

Materials

pH-sensitive copolymer eudragit L100 were purchased from Rohm (Darmstadt, Germany). Polyvinyl alcohol (PVA) 88%-89% hydrolyzed, Pluronic F-68, Tween 80, Brij 75 and Sodium dodecylsulphate were purchased from Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Water was purified by a MilliQ system (Millipore, UK).

Preparation of L100-Eudragit nanoparticles by wet-nanogrinding

The nanosuspensions were prepared with the Zeta nanomill system (Netzsch, USA), using high density zirconium oxide beads (Netzsch, USA) as the grinding media. The loading suspension was prepared by adding the polymer into an aqueous solution in which the polymer is non-soluble, in the presence of different types and amounts of stabilizers. The nanomill was loaded with different percentages of beads and/or with different bead sizes. Different speeds were investigated in order to grind the polymeric nanosuspension in the presence of stabilizers. After the optimized formulations were developed they were mixed with the adequate cryoprotectants and lyophilized.

Characterization of nanodispersions

Particle size analysis

The particle size and polydispersity index (PDI) were measured by dynamic light scattering (DLS). DLS was performed at room temperature on the Malvern Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK). Mean size and polydispersity measurements were performed in triplicates and four different batches were measured for each sample.

densidade, formadas por óxido de zircônio (Netzsch, E.U.A.) que constituem as esferas de moagem. A suspensão inicial de polímero foi preparada pela adição de polímeros em solução aquosa, na qual o polímero não é solúvel, na presença de diferentes tipos e quantidades de agentes estabilizantes. O nanomoído foi carregado com diferentes percentagens de esferas. Diferentes velocidades de moagem foram investigadas para se conseguir a redução de tamanho das partículas, na presença de agentes estabilizadores. Após a optimização das formulações, estas foram misturadas com agentes crioprotectores adequados e posteriormente liofilizados.

Caracterização das nanodispersões

Análise granulométrica

O tamanho das partículas e o índice de polidispersidade (PDI) foram medidos por DLS (Dynamic Light Scattering). O DLS foi realizado à temperatura ambiente com o nano zeta sizer Malvern Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK). A medição da média do tamanho e da polidispersão foram realizados em triplicado e, quatro lotes diferentes foram analisados para cada amostra.

Potencial Zeta

As nanopartículas foram caracterizadas em termos de carga superficial, através da medição do potencial zeta (ζ) a 25 °C num equipamento Malvern NanoZS90 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK). As medições foram realizadas em triplicado e quatro lotes diferentes foram analisados para cada amostra.

Recuperação das Nanopartículas

A recuperação das nanopartículas foi calculada pela seguinte fórmula:

Percentagem de Recuperação =

$$\frac{\text{peso de recuperação após a moagem}}{\text{quantidade total de ingredientes antes da moagem}} \times 100$$

Formação das nanopartículas sólidas

Os nanosuspensões optimizadas foram secas em pequena escala, usando para o efeito ou um secador Buchi (Buchi, E.U.A.) ou um liofilizador. As nanodispersões foram processadas na presença de manitol, na mesma proporção que o polímero. A capacidade de redispersão das nanopartículas sólidas em água com 0.1 M NaCl e em solução aquosa ácida (HCl 0,01 N) foi avaliada, para ser representativa das

Zeta potential

Nanoparticles were characterized in terms of surface charge through the measurement of zeta potential (ζ) at 25 °C in a folded capillary cell with a Malvern Zetasizer NanoZS90 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK). The measurements were performed in triplicate and four different batches were measured for each sample.

Nanodispersion recovery

Recovery values of the nanoparticles were calculated by the following formula

Recovery % = $\frac{\text{Weight of powder recovered after grinding}}{\text{Total amount of initial ingredients before milling}} \times 100$.

Nanodispersion drying

The optimized nanosuspensions were dried in a small-scale dryer Buchi (Buchi, USA). The nanodispersions were spray-dried in the presence of mannitol, in the same ratio as the polymer. Their redispersibility was assessed in water with 0.1 M NaCl and acidic condition (0.01 N HCl) to be representative of physiological conditions. The redispersed particles were sonicated for 1 minute before the measurements of particle size were conducted. The measurements were performed in triplicate.

condições fisiológicas. As novas nanodispersões foram sonicadas durante 1 minuto antes da medição do tamanho das mesmas ser realizada. As análises foram realizadas em triplicado.

Resultados e discussão

Tendo por base estudos experimentais, previamente realizados pelos autores com nanopartículas sensíveis ao pH produzidas pelo método de nanoprecipitação [14], foram seleccionados os agentes estabilizadores mais adequados - electrostáticos (lauril sulfato de sódio) e estéricos (PVA, Tween 80, Span 80, Brij 78 e Pluronic F68). Os agentes estabilizadores catiónicos foram omitidos devido às suas conhecidas propriedades anti-sépticas. Os agentes utilizados neste estudo são biocompatíveis e/ou biodegradáveis, com um perfil de segurança aceitável (GRAS). Os resultados na Figura 2 mostram que as partículas nanométricas podem ser produzidas na presença de PVA e SLS, sendo as concentrações mais efectivas, respectivamente 1,5% e 1%.

Results and discussion

Based on previous studies carried by the authors [14] for pH-sensitive nanoparticles produced by a nanoprecipitation method, we selected suitable stabilizers both electrostatic (sodium laurylsulfate) and steric (PVA, Tween 80, Span 80, Brij 78, Pluronic F68). Cationic stabilizers were omitted due to their known antiseptic properties. The agents used in this study are all biocompatible and/or biodegradable with an accepted safe status (GRAS). The results in Figure 2 showed that nanosized particles could be achieved for PVA and SLS, being the most suitable concentration 1.5% and 1% respectively.

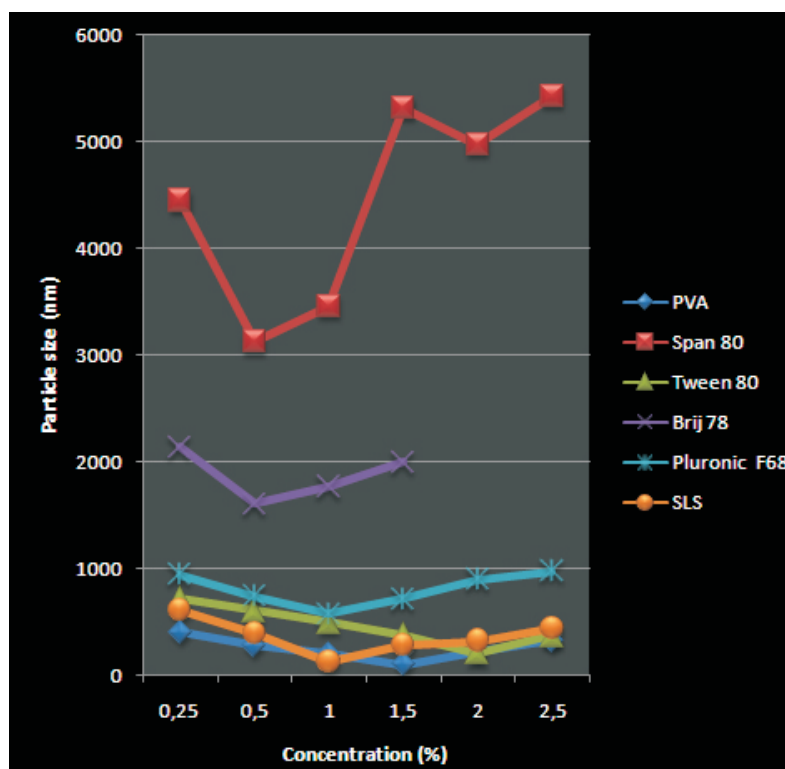


Figura 2 - Dimensões das partículas das suspensões de Eudragit L100 após nanomoagem a húmido com estabilizadores previamente seleccionados. A caracterização do tamanho foi realizada com base nas seguintes condições experimentais: as nanopartículas foram preparadas com uma carga de 80% com 100mm esferas de ZrO₂, com uma concentração de 0,25% Eudragit L100, após 6 horas de moagem e com uma concentração de estabilizador variável de 0,25% até 2,5%.

Figure 2 - Particle sizes of the suspensions of eudragit L100 after nanogrinding with selected stabilizers. The measurements were made on the following conditions: nanoparticles were prepared with 100m ZrO₂ beads at 80% loading, with a concentration of 0.25% eudragit L100, after 6 hours of grinding and with a concentration of stabilizer ranging from 0.25% to 2.5%.

Foram também investigadas exaustivamente as variáveis processuais e as condições experimentais que poderiam afectar o resultado final da nanomoagem. Foram analisadas variáveis tais como o tamanho das esferas de moagem, o tempo de moagem, a velocidade de moagem e, a concentração inicial do polímero. O tamanho final do produto de moagem e o índice de polidispersão foram avaliados em todas as análises. A Figura 3 apresenta os resultados comparativos entre as esferas de óxido de zircónio com tamanhos diferentes.

We investigated extensively the process variables and conditions such as size of grinding media, milling time, milling speed and polymer concentration. The grinding product size and size distributions were assessed in all the experiments. Figure 3 presents the comparative results between the zirconium oxide beads with different sizes.

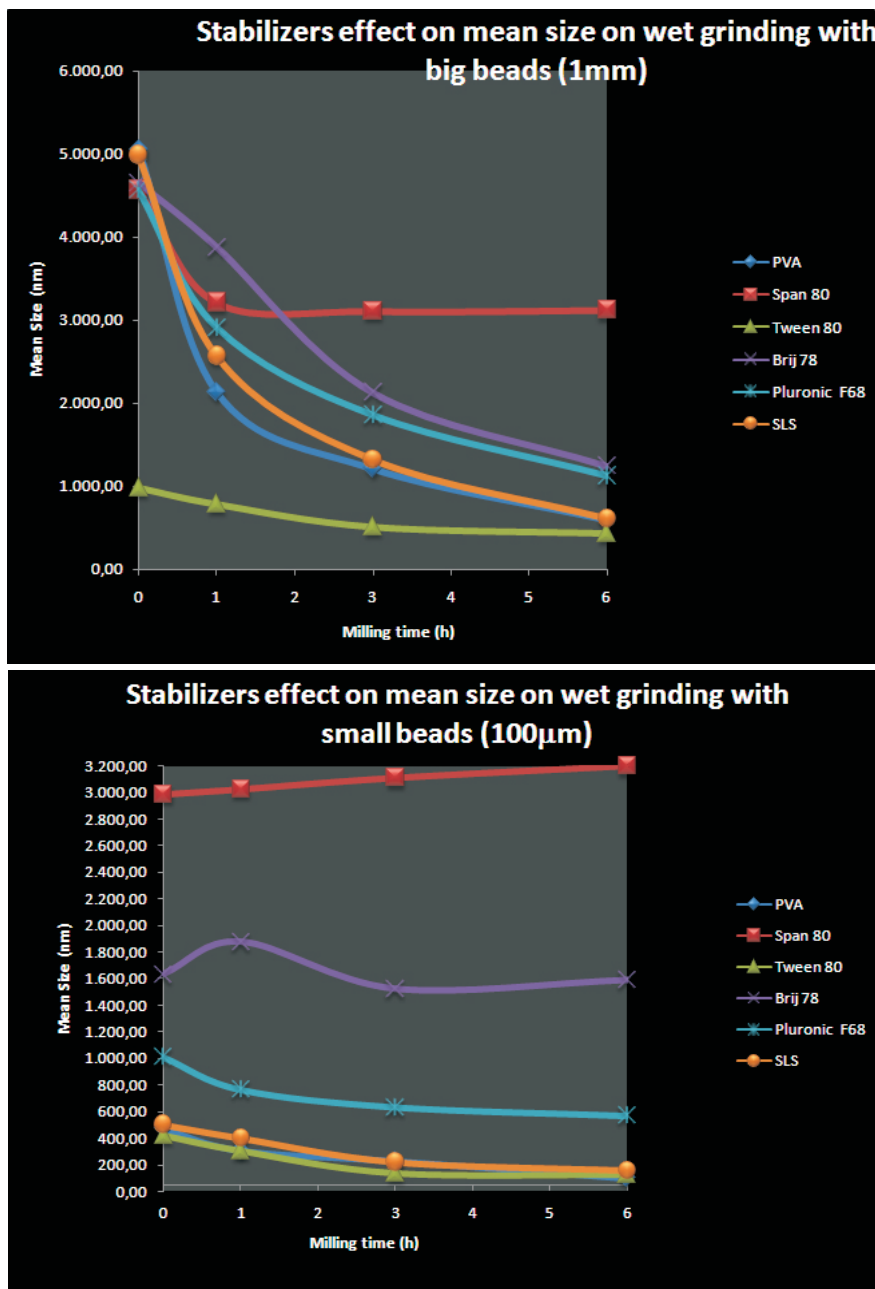


Figure 3 - Grinding product size as function of beads size and stabilizer type.

Figura 3 - Tamanho das partículas nas nanosuspensões finais em função do tamanho das esferas e do tipo de estabilizador.

Pode observar-se que o tamanho das partículas após a moagem é menor quando esferas de menores dimensões são utilizadas. Verifica-se simultaneamente que longos períodos de moagem contribuem inicialmente para um decréscimo do tamanho das nanopartículas, após o qual as partículas parecem manter seu tamanho. Esferas com diâmetros inferiores contribuem para uma menor polidispersão, devido por um lado, ao aumento exponencial do número de esferas por unidade de volume e, por outro, ao aumento do número de pontos de contacto com as nanopartículas. Quando o número de pontos de contacto por unidade de volume aumenta, maior a probabilidade de as partículas poliméricas se encontrarem entre duas esferas, de serem esmagadas, cortadas e dispersas.

No entanto, os resultados obtidos para o tamanho de partículas foram o resultado de uma pré-moagem com esferas de maiores dimensões, tendo as suspensões resultantes um tamanho médio de partículas de aproximadamente 10 μm .

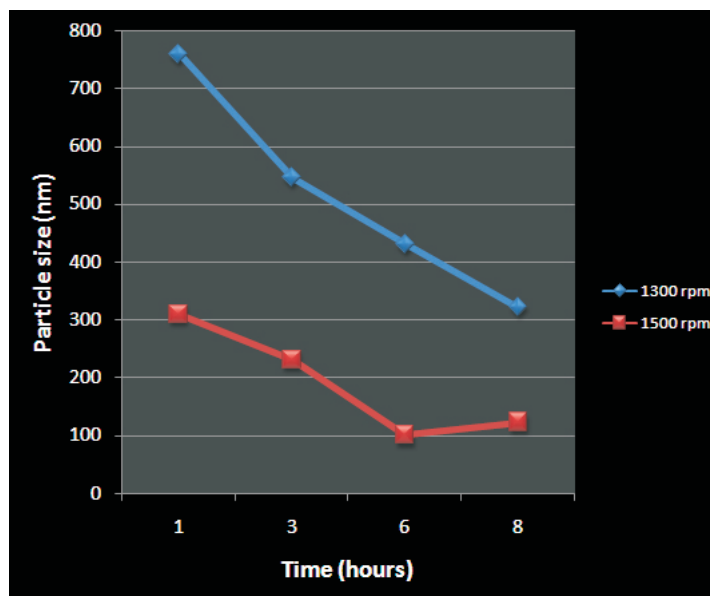
Para além do efeito do tamanho das esferas, a velocidade utilizada na moagem pode afectar o tamanho das partículas na dispersão. Na figura 4 são apresentados os resultados da variação da velocidade de agitação das esferas dentro da câmara de moagem, em função do tempo de moagem. Os resultados revelam que velocidades mais elevadas conduzem a um decréscimo mais acentuado do tamanho das partículas poliméricas, tendo um efeito positivo sobre a eficiência de moagem. Quanto maior a velocidade do agitador, maior é a quantidade de energia aplicada nas esferas de moagem. O aumento da energia cinética das esferas de moagem num agitador de alta velocidade, resulta numa maior dispersão e moagem das partículas presentes nas suspensões. Como tal, a uma velocidade maior, corresponde a formação de pequenas partículas, dando origem às nanodispersões poliméricas.

Figura 4 - Efeito da velocidade de agitação nas nanosuspensões finais em função do tempo de moagem.

Figure 4 - Effect of agitation speed on the final nanogrinded suspensions as a function of the grinding time.

It can be seen that the resulting polymeric particles are finer for small bead sizes and for longer periods of grinding after which the particles seem to maintain their size. A small bead diameter leads to a lower particle size distribution due to the exponential increase in the number of beads per unit of volume and the associate increase in media contact points. When the number of contact points per unit of volume increases, the higher is the probability of the polymeric particles to be caught between two beads, crushed, sheared and dispersed. Nevertheless the results expressed for the small particle size were the result of a pre-grinding with the larger media in which the resulting suspensions presented a size of approximately 10 μm .

In addition to the beads effect, the speed used on the mill can affect the grinding results. Grinding results for three speeds are presented in Figure 4. It can be seen that high grinding speed has a positive effect on grinding efficiency. The higher the agitator speed, more energy is applied to the media volume. Higher kinetic energy in the media through high agitator speed results in greater crushing and dispersion of the suspensions. As such, a higher speed leads to the formation of smaller polymeric nanodispersions.



A carga de esferas na câmara de agitação é um parâmetro importante, que decide o número de esferas, o número de colisões e a razão entre o número de partículas poliméricas e esferas dentro da câmara de moagem.

A Figura 5 mostra o diagrama esquemático do nanomoinho zetanano mill da Netzsch.

Bead loading is an important parameter, which decides the number of beads, number of collisions and particles to bead ratio inside the mill grinding chamber. Figure 5 shows the schematic diagram of the zeta-nanomill from Netzsch.

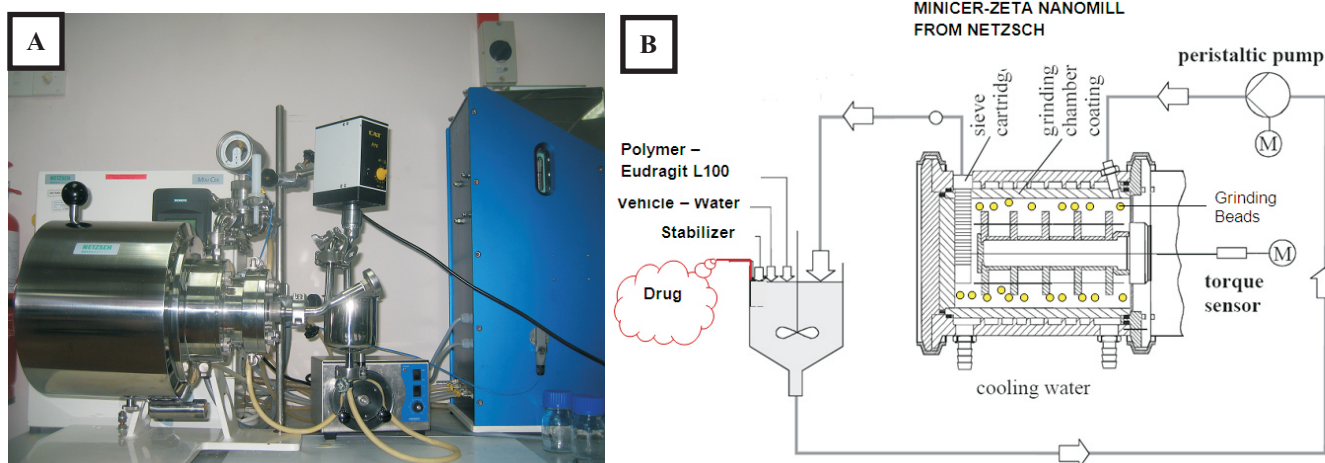


Figura 5 - Fotografia (A) e ilustração esquemática (B) do nanomill Minicer Zeta-da Neztzsch. O nanomill tem um reservatório horizontal, cilíndrico, que pode ser preenchido com esferas de moagem, resistentes ao desgaste. Um agitador com discos actua como um elemento de agitação provoca um movimento intenso dos esferas de moagem. O fluxo dos sólidos em suspensão desencadeia-se desde a entrada e axialmente ao longo do rotor em torno de sua limite posterior para a área de separação entre o rotor e o filtro. Os meios de moagem que seguem o retorno do fluxo estão sujeitos a uma força centrífuga de aceleração elevada e são devolvidos através das ranhuras do rotor de volta para a câmara de moagem. Os sólidos suspensos são moídos ou dispersos entre as esferas de moagem por impacto e forças de cisalhamento. O produto da moagem e as esferas são separadas através de um sistema de separação (filtro) na saída de descarga do moinho. A suspensão do produto final sai da câmara de moagem, sem ser impedido pela tela bloqueada pelas esferas. A câmara é mantida refrigerada através da circulação de água arrefecida

Figure 5 - Picture (A) and schematic illustration(B) of the Minicer-Zeta nanomill from Neztzsch. Minicer-zeta nanomill has an horizontally arranged, cylindrical tank, which can be filled with grinding beads. The grinding beads consist wear-resistant materials. An agitator with discs as an agitation element provides for intensive movement of the grinding media. The suspended solids flow goes from the inlet on the bearing side axially along the rotor around its rear edge into the separation area between rotor and gap screen. The grinding media that follows the return of flow is subject to a high centrifugal force acceleration and is returned through the slots of the rotor back into the grinding chamber. The suspended solids are ground or dispersed between the grinding beads by impact and shearing forces. The product and the beads are then separated using a separation system at the discharge outlet of the mill. The final product suspension flows out of the mill unimpeded by a screen blocked by the beads. The chamber is kept refrigerated by the circulation of cooling water.

O nanomoinho é um dispositivo mecânico que permite que suspensões sejam processadas a alta energia, mas com condições de moagem devidamente controladas. A câmara de moagem deve ser entendida como um reator, onde reacções químicas complexas podem decorrer sob condições mecânica bem definidas na fase húmida. Para evitar a contaminação da amostra, por fragmentos das esferas de moagem devido ao desgaste; esferas de óxido de zircónio foram seleccionadas devido à sua baixa porosidade, superfície lisa, alta densidade e baixo grau de erosão.

O espaço livre permitido na câmara de moagem é fundamental para a expansão do volume da dispersão, que aumenta com o crescimento do número de partículas poliméricas durante a moagem. Este espaço deverá ser de tal forma que, todo o espaço livre que não é ocupado pela dispersão, seja ocupado por esferas de moagem durante a moagem. Na Figura 6, um carregamento de 80% do volume da câmara de moagem levou à produção de nanodispersões. Verifica-se que quando a percentagem de carga é aumentada, um aumento no tamanho das partículas é observado. Neste caso, não há espaço suficiente para a formação de nanopartículas, levando a uma menor taxa de moagem e, como consequência, a um maior tamanho das partículas poliméricas.

It is a device that allows the suspensions to be processed at high energy but with controlled conditions. The milling chamber of the mill needs to be understood as a reactor where complex chemical reactions can be conducted under well defined mechanical conditions in the wet phase. For wear protection and to avoid product contamination, zirconium oxide beads were selected due to their low porosity, smooth surface, high density and low media wear characteristics. The free space allowed in the mill is critical for the expansion of the slurry volume as the number of polymeric particles increases during grinding. It should be in such a way that all the free space will be occupied by the grinding beads during grinding. In Figure 6, the loading of 80% leads to the production of smaller size nanosuspensions. When the loading is increased, an increment in the particle size is observed. In this case, there is no sufficient space for nanoparticles formation, leading to a lower grinding rate and as a result, a higher particle size.

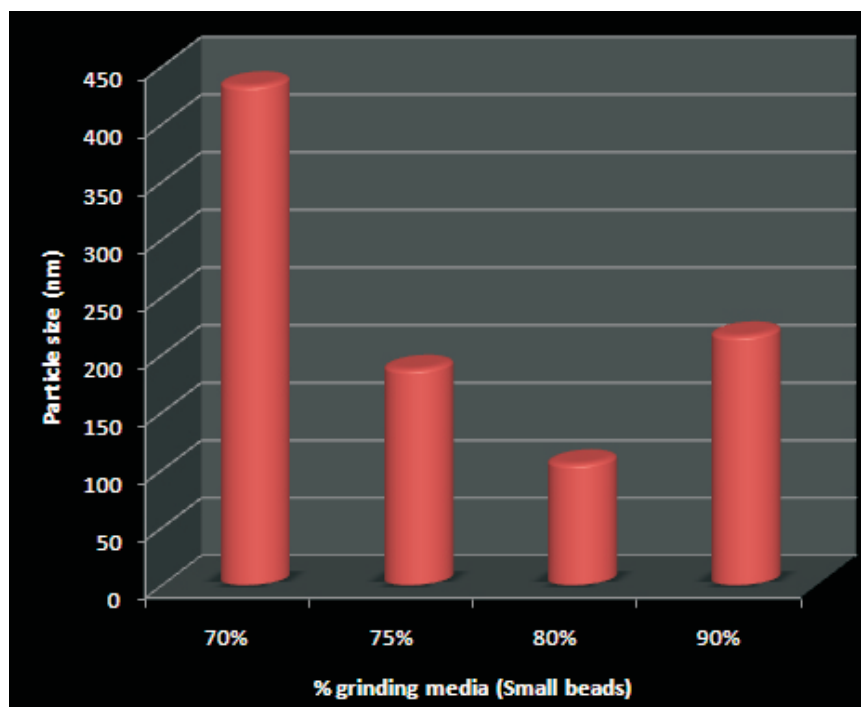


Figura 6 - Efeito da carga das esferas de moagem na nanomoagem do polímero Eudragit L100
Figure 6 - Effect of bead loading on nanogrinding of Eudragit L100.

A avaliação do efeito da concentração do polímero no tamanho final das nanodispersões está sumariada na Figura 7.

The results observed from the experiments performed to evaluate the effect of polymer concentration on the size (Figure 7) showed that a critical concentration of 0.25% eudragit L100 was necessary to achieve a small particle size. Moreover, higher grinding time led to smaller nanoparticles.

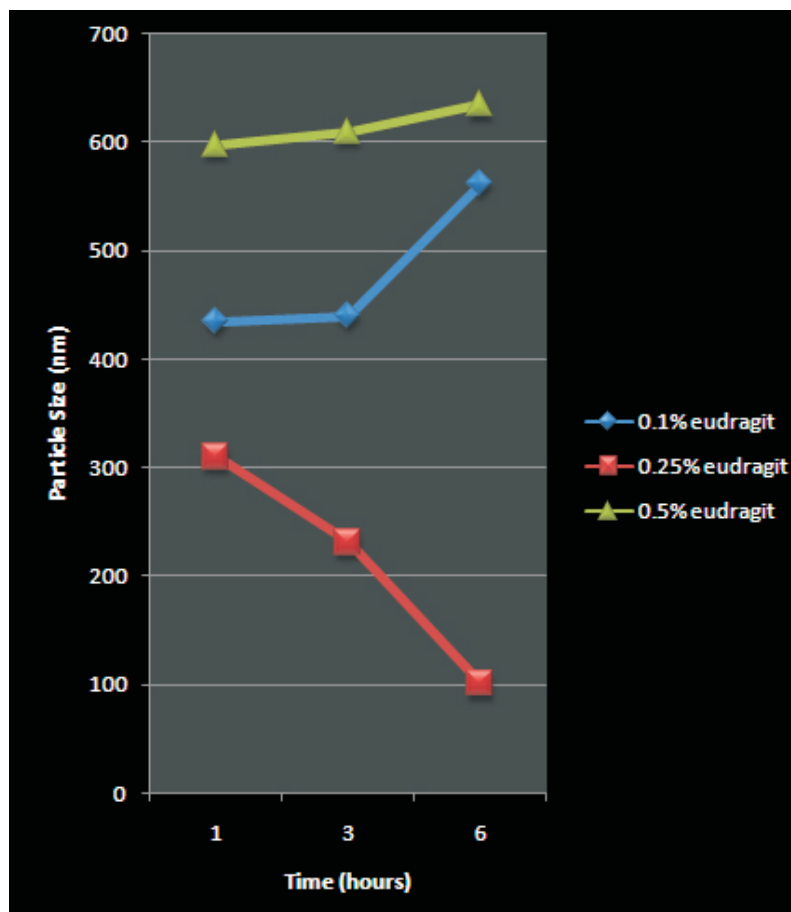


Figura 7 - Efeito da concentração do polímero na nanomoagem húmida de eudragit L100 em função do tempo de moagem.
Figure 7 - Effect of polymer concentration on wet-grinding of eudragit L100 as a function of grinding time.

Pode observar-se que existe uma concentração crítica de 0,25% de eudragit L100 para se conseguir atingir um tamanho de partícula à nanoescala. Além disso, com o aumento do tempo de moagem o tamanho das partículas tende a diminuir. Por um lado, uma concentração de polímero mais baixa na dispersão inicial, resulta numa moagem ineficiente, com uma ampla distribuição dos tamanhos das partículas, verificando-se a presença de partículas originais (de

On the one hand, a low polymer concentration results in inefficient grinding, with wider particle size distribution, needing a longer grinding time and with initial feed particles in the product. On the other hand, high polymeric concentration increases the viscosity of the system rapidly upon grinding and the probability of a polymeric particle to be captured between two beads is less, reducing bead energy, as the beads need to travel through viscous slurry resulting in an

tamanho elevado) na dispersão final. Por outro lado, um aumento na concentração do polímero aumenta a viscosidade da dispersão rapidamente, durante e após a moagem, e consequentemente a probabilidade de uma partícula polimérica ser capturada entre as duas esferas é menor, reduzindo a energia das esferas (uma vez que o seu fluxo através de uma dispersão mais viscosa é menor), originando uma moagem ineficiente e/ou aglomeração.

Após a secagem das nanodispersões, mesmo após a adição do manitol como agente crioprotector, verificou-se que a estabilização estérica cedida pelo PVA presente na superfície das nanopartículas foi insuficiente para estabilizá-las e evitar aglomeração (Tabela 1).

inefficient grinding and/or agglomeration.

Upon drying, we verified that steric stabilization granted by the PVA at the surface of the nanoparticles was insufficient to stabilize them and prevent agglomeration even in the presence of mannitol as cryoprotectant. To circumvent the flocculation problem, we combined an anionic stabilizer SLS to contribute with further repulsive input. The results of this combination on the physicochemical characteristics of the polymeric nanoparticles are depicted in Table 1. It can be seen that it is necessary the presence of both charge and steric effects, in order to obtain nanoparticles with a size near 100 nm and with a low PDI.

Tabela 1 - Tamanho das partículas nas nanosuspensões após nanomoagem na presença do agente estabilizador PVA a 1.5 % e SLS 0.5% após 6 horas de moagem nas mesmas condições experimentais.

Table 1 - Particle size of nanogrinded nanodispersions in the presence of PVA 1.5% and SLS 0.5%, after 6 hours of grinding under same experimental conditions

Nanoparticle composition	Mean Size (nm)	PDI	Mean Zeta Potential (mV)
Eudragit L100+ PVA 1.5%	101	0.203	-2,02
Eudragit L100+SLS 1%	154	0.312	-34,60
Eudragit L100+ PVA 1.5%+0.5% SLS	107	0.134	-29,80

Para contornar o problema da floculação, estudou-se a combinação de um estabilizador aniônico (SLS), que contribui com o seu efeito de carga para um efeito mais repulsivo. Os resultados desta combinação nas características físico-químicas das nanopartículas, encontram-se resumidos na Tabela 1. Verifica-se que é necessária a contribuição simultânea do efeito de carga, conferido pelo SLS, e do efeito estérico, conferido pelo PVA, para que se obtenham partículas com um tamanho próximo dos 100 nm e com um baixo índice de polidispersão.

As nanodispersões poliméricas acima descritas são suspensões aquosas com tamanhos de partícula próximos dos 100 nm. Estas nanodispersões podem ser secas antes de serem incorporadas em formulações, para sua futura administração oral. O manitol foi identificado como sendo o agente crioprotector mais adequado, para assegurar uma adequada redispersão

The above polymeric nanoparticulate aqueous suspensions formed through nanomilling are aqueous suspensions with a size around 100 nm. These nanoparticles can be dried prior to formulating their composition for further oral administration. We identified mannitol as the a suitable cryoprotectant to ensure redispersibility after freeze-tawking based on preliminary studies reported by Jeong et al. (2005) [26] for PLGA polymer and our unpublished results for anionic eudragit polymers [15]. When it was added 5% mannitol to the nanodispersions for spray drying, dried nanoparticles were obtained and the results depicted in Table 2.

após freeze-tawking, com base em estudos preliminares realizados por Jeong et al. (2005) [26] para o polímero PLGA, e com base também, nos nossos resultados não publicados para os diferentes polímeros aniónicos eudragit [15]. Quando o manitol foi adicionado na concentração de 5% (w/v) às nanodispersões antes do spray-drying, nanopartículas em pó foram obtidas, estando os resultados descritos na Tabela 2. Verificou-se que ambos os métodos originaram partículas com um tamanho aproximado de 100 nm, sendo contudo a liofilização o método que originou as partículas com menores dimensões.

Tabela 2 - Capacidade de redispersão das nanopartículas, após nanomoagem na forma sólida, em água e em soluções electrolíticas, imediatamente após a reconstituição.

Table 2 - Redispersion properties of nanogrinded nanoparticles in solid form, in water and in electrolyte solution, immediately after reconstitution.

Nanoparticles with of PVA 1.5% and SLS 0.5%	Electrolyte concentration (M)	Type	Mean particle size (nm)
Freeze-dried	0	Plain water	107 10
	0.01	HCl (pH=2)	110 12
	0.1	NaCl	118 15
Spray-dried	0	Plain water	145 9
	0.01	HCl (pH=2)	149 11
	0.1	NaCl	156 15

No estômago, o pH varia entre pouco menos de 2 em jejum (mas superior a 1) e até 4 ou 5 na presença de alimentos. Assim, a concentração de HCl 0.01N reproduz as condições típicas de pH que se poderá encontrar no estômago. Por outro lado, 0,1 M NaCl simula a concentração de electrólitos que se pode encontrar em todo o corpo, incluindo o intestino. Por isso, a capacidade de redispersão das nanopartículas sólidas, formadas após liofilização ou spray-drying, nas condições que mimetizam as situações fisiológicas, é mostrada na Tabela 2. Os resultados demonstram que as nanopartículas poliméricas apresentaram excelentes propriedades de redispersão sob pH ácido e neutro, com e sem electrólitos, imediatamente após a reconstituição.

In the stomach, the pH ranges from slightly less than 2 in fasting state (but greater than 1) and up to 4 or 5 in the presence of food. Thus, a 0.01N HCl concentration reproduces typical acidic conditions found in the stomach. Also, 0.1 M NaCl simulates the concentration of electrolytes found throughout the body, including the intestine. The redispersion properties of the spray-dried and freeze-dried nanoparticles in water and in the above conditions are shown in Table 2. The polymeric nanoparticles showed excellent redispersion properties under acidic and neutral pH, with and without electrolytes, immediately after reconstitution.

Conclusões

Em conclusão, os resultados apresentados neste trabalho contribuem para a compreensão da tecnologia da nanomoagem a húmido no processamento de nanopartículas poliméricas. O efeito dos parâmetros de moagem foram sistematicamente avaliados e discutidos. Apurou-se que parâmetros tais como o tamanho das esferas de moagem, a velocidade de agitação do equipamento e as características da dispersão inicial (razão carga das esferas/ quantidade de partículas poliméricas, a concentração inicial do polímero, a densidade da dispersão) têm um efeito importante sobre a eficiência de moagem. Também foi descrito que a combinação de dois tipos diferentes de agentes estabilizadores, eletroestáticos (SLS) e estéricos (PVA), levou a um menor tamanho das partículas poliméricas e a uma melhor redispersão em ambos as soluções, na presença de eletrólitos e de ácido, que simulam as condições *in vivo*. Novos estudos serão realizados a fim de serem produzidas nanopartículas com compostos bioactivos incorporados, produzidos por este processo, com a finalidade de melhorar a sua solubilidade e/ou a sua biodisponibilidade *in vivo*.

Agradecimentos

Os autores agradecem o financiamento deste projecto a agência governamental MOSTI, do Governo da Malásia.

Conclusions

In conclusion, results presented in this paper contribute to the understanding of wet-nanogrinding technology for polymeric nanoparticles processing. The effect of different milling parameters were evaluated and discussed. It was found that parameters such as grinding media (size), equipment speed and slurry characteristics (feed, product size, slurry density) have a prominent effect on the mill grinding efficiency. It was also exposed that the combination of two different types of stabilizers both electrostatic (SLS) and steric (PVA), led to a smaller particle size and to a better redispersion in both electrolyte and acidic media that mimic the conditions *in vivo*. Further studies will be carried out in order to produce bioactive loaded nanoparticles through this procedure to improve their solubility and /or bioavailability *in vivo*.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Malaysian Government Agency Mosti through the E-Science Grant for its financial support.

Referências / References

- [1] Gregoriadis G, Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Trends Biotechnol* 1995; 13: 527-537.
- [2] Kwon GS, Okano T, Polymeric micelles as new drug carriers, *Adv Drug Deliv* 1996; 21: 107-116.
- [3] Florence AT, The oral absorption of micro- and nanoparticulates: neither exceptional nor unusual. *Pharm Res* 1997; 14: 259-266.
- [4] Mainardes RM, Silva LP, Drug delivery systems: past, present and future, *Curr Drug Targets* 2004; 5: 449-455.
- [5] Rabinow BE, Nanosuspensions in drug delivery. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3: 785-796.
- [6] Date AA, Patravale VB, Current strategies for engineering drug nanoparticles. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2004; 9: 222-235.
- [7] Merisko-Liversidge E, Liversidge GG, Cooper EG, Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *Eur J Pharm Sci* 2003; 18: 113-120.
- [8] Datta A, Mishra BK, Prediction of power draw of ball mills by using neural network, *Minerals and Metallurgical Processing* 1999; 16: 57-60.
- [9] Kesisoglou F, Panmai S, Wu Y, Nanosizing - Oral formulation development and biopharmaceutical evaluation, *Adv Drug Deliv* 2007; 59: 631-644.
- [10] de Castro CI, Mitchell B, The use of polymeric milling media in the reduction of contamination during mechanical attrition. *J Mat Res* 2002; 17: 2997-2999.

- [11] El Kamel AH, Sokar MS, Gamal SSA, Naggar VF, Preparation and evaluation of ketoprofen floating oral delivery system. *Int J Pharm* 2001; 220: 13-21.
- [12] Bhagwat D, Diehl D, Baichwal AR, Novel once-a-day controlled release sulfonylurea formulation. United States Patent 2005; 6:875, 793.
- [13] Nguyen DA, Fogler HS, Facilitated diffusion in the dissolution of carboxylic polymers. *AIChE Journal* 2005; 51: 415-425.
- [14] Pereira R, Julianto T, Yuen KH, Majeed AB, Pharmaceutical applications of nanotechnology. *E-bionexus* 2007; 2: 1-19.
- [15] Majeed AB, Pereira R, Julianto T, Yuen KH, Design of drug-loaded L100 eudragit nanoparticles for improvement of oral bioavailability. *Proceedings of the 3rd International Conference on Nanoscience and Nanotechnology*; 2008 Nov 18-21; Shah Alam, Selangor, Malaysia.
- [16] Schönert K, A first survey of grinding with high compression roller mill, *International J Miner Process* 1988; 22: 401-412.
- [17] Schönert K, The characteristics of comminution with high pressure roller mills, *KONA* 1991, 9: 149-158.
- [18] Becker M, Schwedes J., Comminution of ceramics in stirred media mills and wear of grinding beads, *Powder Technology* 1999; 105: 374-381.
- [19] Blecher L, Schwedes J, Energy distribution and particle trajectories in a grinding chamber of a stirred ball mill. *Int J Min Process* 1996; 44-45: 617-627.
- [20] Stehr N, 1998, Media milling with high power density, Technical article, European coating net, "<http://www.coatings.de/articles/stehr/stehr.html>"
- [21] Kwade A, Wet Comminution in Stirred Media Mills - Research and its practical Application, *Powder Technology* 1999; 105: 14-20.
- [22] Molls HH, Hornle R, Wirkungsmechanismus der Nasszerkleinerung in der ruhwerkskugelmühle, *DECHEMA-Monography* 1972, 69: 631-661.
- [23] Gao MW, Forssberg KSE, Weller KR, Power predictions for a pilot scale stirred ball mill, *Int J Min Proc* 1996; 44-45: 641-652.
- [24] Pan J, Shaw WJD, Effects of processing parameters on material properties of mechanically processed polyamide, *J Appl Polym Sci* 1993; 56: 557-566.
- [25] Pan J, Shaw WJD, Properties of mechanically processed polymeric material, *J Appl Polym Sci* 1994; 52: 507-514.
- [26] Jeong YI, Shim YH, Kim C, Lim GT, Choi KC, Yoon C. Effect of cryoprotectants on the reconstitution of surfactant-free nanoparticles of poly(DL-lactide-co-glycolide). *J Microencapsul.* 2005; 22:593-601.
- [27] Eerikäinen H, Peltonen L, Raula J, Hirvonen J, Kauppinen EI, Nanoparticles Containing Ketoprofen and Acrylic Polymers Prepared by an Aerosol Flow Reactor Method. *AAPS PharmSciTech.* 2004; 5(4): article 68.
- [28] Shukla AJ, Polymethacrylates. In: Wade A, Weller PJ, editors. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 2nd ed. Washington DC: American Pharmaceutical Association, Pharmaceutical Press; 1994.
- [29] Porsch B, Hillang I, Karlsson A, Sundelöf LO, Ion-exclusion controlled size-exclusion chromatography of methacrylic acid-methyl methacrylate copolymers. *J Chromat A* 2000; 872: 91-99.