

## FORMULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOCÁPSULAS CON UN ANTIOXIDANTE NATURAL PARA SU APLICACIÓN CUTÁNEA

R. ÁLVAREZ ROMÁN<sup>1</sup>, M. R. CAVAZOS RODRÍGUEZ<sup>1</sup>, A. CHÁVEZ MONTES<sup>2</sup>, R. CASTRO RÍOS<sup>1</sup>, N. WAKSMAN DE TORRES<sup>1</sup>, M.L. SALAZAR CAVAZOS<sup>1</sup> Y S.A. GALINDO RODRÍGUEZ<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química Analítica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Francisco I. Madero y Dr. Enrique Aguirre Pequeño s/n, Col. Mitras centro, C.P. 64460, Monterrey, N. L., México. <sup>2</sup>Departamento de Química, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Manuel L. Barragán s/n, Ciudad Universitaria, C.P. 66450, San Nicolás de los Garza, N. L., México. \*E-mail: sagrod@yahoo.com.mx

### Resumen

La aplicación de las nanopartículas poliméricas en el área dermatológica ha adquirido una gran relevancia debido a que pueden liberar activos para que tengan un efecto local o sistémico. El objetivo del presente estudio fue desarrollar y optimizar una formulación de nanocápsulas poliméricas (NC) cargadas con un agente antioxidante natural (carvacrol, CRV) para su potencial aplicación local en la piel. Se obtuvo una formulación de NC biodegradables con CRV que presentaron un tamaño promedio de 180 nm con un IP de 0.083, un potencial  $\zeta = -17.8$  mV y un porcentaje de encapsulación del 51 %. Por microscopía electrónica de barrido se observó que las poblaciones de NC-CRV eran esféricas y homogéneas. La formulación fue estable por al menos 16 semanas. Además, la técnica de nanoprecipitación resultó ser un buen método de preparación, ya que, se logró obtener una eficiencia de encapsulación mayor al 90 %. Finalmente, se concluyó que las características y propiedades de la formulación de NC-CRV son las adecuadas para que sea usada como sistema acarreador de CRV con una potencial aplicación para prevenir el cáncer de piel causado por la sobreexposición al sol.

**Palabras clave:** nanopartículas poliméricas, carvacrol, antioxidantes.

### 1. Introducción

Las nanopartículas poliméricas han generado interés en los últimos años debido a su potencial como sistemas acarreadores de moléculas con actividad biológica. Estos sistemas coloidales pueden ofrecer ventajas como: i) la protección del activo contra la degradación por agentes de su entorno, ii) el direccionamiento del fármaco a sitios específicos de acción (i.e. célula o tejido), iii) el control de la liberación del principio activo por tiempos prolongados y iv) el transporte y la liberación de moléculas biológicas tales como péptidos, proteínas y oligonucleótidos. Básicamente, las ventajas conferidas por estos coloides en su aplicación como sistemas de liberación se deben a sus características fisicoquímicas, incluyendo su tamaño submicrónico, su amplia área superficial específica, sus versátiles propiedades de superficie (i.e. carga, hidrofobicidad) y su composición polimérica variable. Adicionalmente, dependiendo de su composición, las formulaciones de nanopartículas pueden ser administradas por las vías oral, parenteral o tópica (i.e. mucosas y piel) [1-4].

En particular, la aplicación de las nanopartículas poliméricas en el área dermatológica ha adquirido una gran relevancia debido a que pueden liberar activos para que tengan un efecto local o sistémico [5, 6]. Por ejemplo, se han preparado nanopartículas biodegradables cargadas con un protector solar con la finalidad de aumentar su penetración y permanencia en la piel [7]. Asimismo, se ha reportado que las nanopartículas pueden ser potencialmente útiles para la liberación en piel de genes [8]. Otros estudios han abordado el uso de nanopartículas para la administración transdérmica de antiinflamatorios [9]. En general, estas posibilidades de aplicación de las nanopartículas en la piel se deben tanto a su versatilidad para incorporar sustancias activas de diferentes características fisicoquímicas (i.e. hidrofílicas, hidrofóbicas, sólidas, líquidas) como a su capacidad para interactuar a diferentes niveles con los componentes de la piel (i.e. estrato córneo, anexos cutáneos) [10, 11].

En este contexto, el objetivo del presente estudio fue desarrollar y optimizar una formulación de nanopartículas poliméricas, específicamente nanocápsulas (NC), cargadas con un agente antioxidante natural para su potencial aplicación en la prevención del cáncer de piel causado por la sobreexposición al sol. En base a estudios previos [7, 10], se determinó que la formulación idónea para esta aplicación debía constar de NC con un tamaño promedio alrededor de 200 nm y con un aceptable porcentaje de encapsulación del activo (mayor al 50%). Como agente antioxidante modelo se utilizó carvacrol (CRV), el cual es un compuesto fenólico monoterpeneoide presente en los aceites esenciales de tomillo y orégano. A pesar de su importante actividad antioxidante, el uso de CRV como antioxidante se ha visto limitado por su marcada volatilidad (2.5 hPa a 25 °C). Por lo tanto, la

incorporación del CRV en NC sería una buena aproximación para generar un sistema acarreador que permita mejorar tanto su permanencia y estabilidad en una formulación, como su función y desempeño una vez que es aplicado en el órgano blanco, es decir, la piel.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Materiales

El Eudragit® RL100 fue amablemente donado por HELM México (Rôhm Pharma Polymers). Poli( $\epsilon$ -caprolactona) (Sigma-Aldrich), Tween 80 (Sigma-Aldrich), carvacrol (97 % (GC), Fluka Analytical), acetona (Grado HPLC, Burdick & Jackson), columna 100 % polidimetilsiloxano (AT-1, Grace, 30 m x 0.53 mm x 1.5  $\mu$ m), microfibras (poliacrilato 85  $\mu$ m, Supelco). El resto de los reactivos fueron de grado analítico.

### 2.2. Métodos

*Preparación de las nanocápsulas.* Las formulaciones de NC se obtuvieron por la técnica de nanoprecipitación. Brevemente, una fase orgánica constituida de acetona, del polímero formador de las NC y de CRV fue inyectada a 20 mL de una fase acuosa con tensoactivo (Tween 80 al 3%, p/v). La difusión de la acetona en la fase acuosa indujo la agregación del polímero y la formación espontánea de las nanocápsulas con carvacrol (NC-CRV). El solvente contenido en la suspensión de NC fue eliminado por evaporación a presión reducida (Rotavapor Heidolph). Posteriormente, se realizaron diferentes caracterizaciones fisicoquímicas a la suspensión acuosa de NC-CRV. Con la finalidad de determinar su influencia sobre las características de las NC, a partir de este procedimiento base, se modificaron distintas variables experimentales incluyendo el tipo de polímero formador de las NC (poli( $\epsilon$ -caprolactona) o Eudragit® RL100) y las concentraciones de CRV y de polímero en la fase orgánica.

*Caracterización de las formulaciones de nanocápsulas.* A la suspensión acuosa de NC-CRV se le hicieron diferentes evaluaciones: i) el tamaño e índice de polidispersidad (IP) se determinaron por espectroscopía de correlación fotónica (Zetasizer Nanoseries, Malvern, mod. Nano-Zs90), ii) el potencial  $\zeta$  de la formulación se midió usando el mismo instrumento y iii) la morfología de las NC se determinó mediante microscopía electrónica de barrido (Microscopio Jeol JSM-6490LV).

*Cuantificación de carvacrol en las nanocápsulas.* La cantidad de CRV presente en las NC se determinó por cromatografía de gases con microextracción en fase sólida por *headspace* (HS-SPME, por sus siglas en inglés). Brevemente, esta técnica consiste brevemente en extraer el CRV presente en las muestras, que se colocan en viales (relación 1:1, muestra:headspace), mediante la adsorción en una fibra de sílice fundida recubierta por poliacrilato (85  $\mu$ m) que se introduce en el espacio del headspace, seguida de la desorción del carvacrol mediante temperatura en el inyector del cromatógrafo de gases. El programa de temperatura del horno del cromatógrafo de gases inició a 130 °C (manteniéndose 1 min), se calentó hasta 190 °C (a 30 °C/min), después hasta 210 °C (a 10 °C/min.) y finalmente hasta 270 °C (a 30 °C/min) manteniéndolo durante 4 min. Los parámetros analíticos del método a un intervalo de concentración de CRV de 0.1-2.5  $\mu$ g/mL fueron: ecuación de la curva de  $y = 0.7182x - 0.0168$ , coeficiente de correlación ( $r^2$ ) de 0.9991, límite de detección (LDD) de 0.07  $\mu$ g/mL, límite de cuantificación (LDC) de 0.18  $\mu$ g/mL y precisión < 15% (R) [12].

Las suspensiones de NC-CRV se sometieron a centrifugación a 20,000 rpm durante 2 h a 4 °C para obtener la pastilla y el sobrenadante. La pastilla se secó y, posteriormente, se solubilizó en metanol y se analizó por inyección directa por cromatografía de gases con el método antes mencionado. El sobrenadante obtenido se diluyó y se cuantificó el CRV no incorporado en las NC por HS-SPME. Una vez cuantificado el CRV incorporado en las NC, se calcularon tanto el porcentaje de encapsulación como el porcentaje de eficiencia de encapsulación de las formulaciones de NC-CVR. Los cálculos se realizaron utilizando las ecuaciones 1 y 2, respectivamente.

$$\% \text{ Encapsulación} = \frac{\text{CRV (mg) en fase orgánica} - \text{CRV (mg) no encapsulado}}{\text{Polímero (mg) y CRV (mg) en fase orgánica}} \quad (1)$$

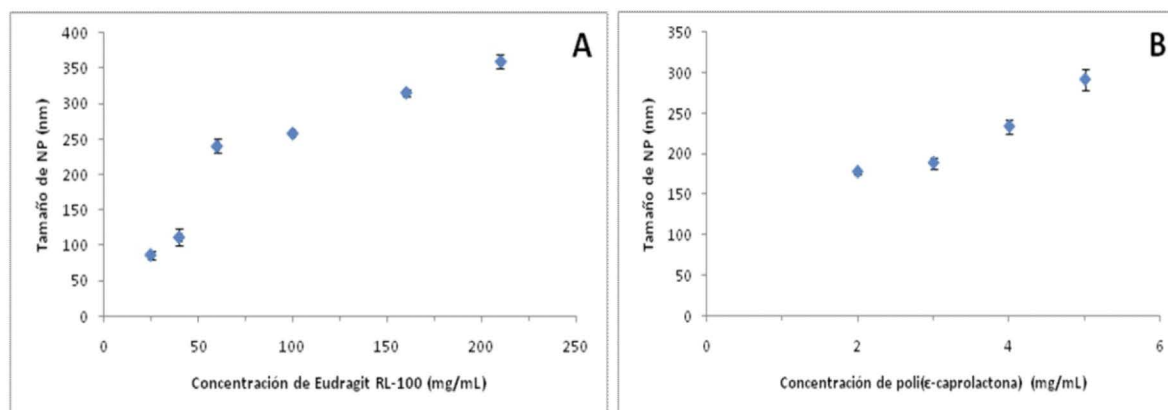
$$\% \text{ Eficiencia de Encapsulación} = \frac{\text{CRV (mg) en fase orgánica} - \text{CRV (mg) no encapsulado}}{\text{Polímero (mg) en fase orgánica}} \quad (2)$$

*Estabilidad de la formulación de nanocápsulas.* La estabilidad de la dispersión acuosa de NC-CRV fue evaluada durante 16 semanas para lo cual se determinó periódicamente el tamaño de partícula y el IP. Asimismo, se realizaron valoraciones visuales para detectar la presencia de agregados de polímero o de material oleoso en la superficie de la suspensión de NC.

### 3. Resultados y discusión

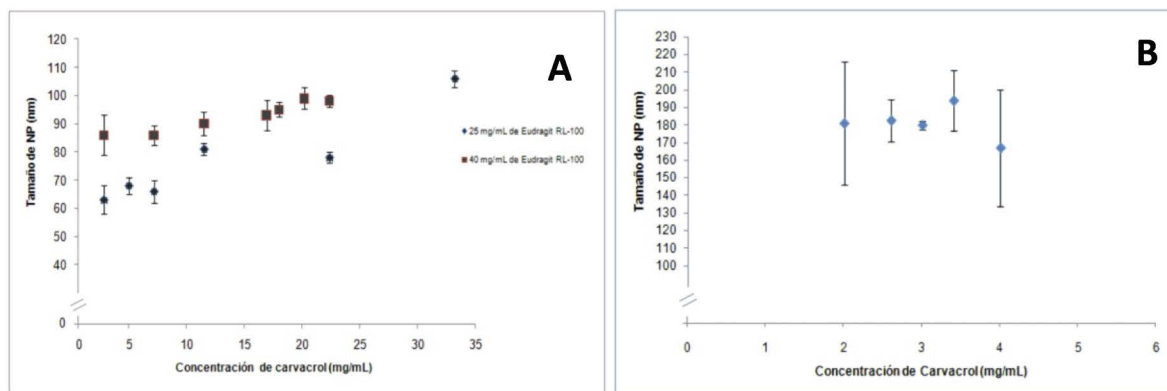
#### 3.1. Optimización de la formulación de nanocápsulas con carvacrol

*Efecto de la concentración de polímero sobre el tamaño de nanocápsulas.* Durante la optimización de la técnica de nanoprecipitación para la obtención de formulaciones de nanopartículas con un tamaño promedio alrededor de 200 nm, inicialmente, se hicieron ensayos para determinar el efecto de la concentración de polímero formador de NC en la fase orgánica sobre el tamaño de las NC. Es importante precisar que, considerando las evaluaciones biológicas que se realizarán posteriormente con las nanopartículas, se utilizaron por separado dos materiales poliméricos formadores de NC: i) la poli( $\epsilon$ -caprolactona) como polímero modelo biodegradable, y ii) el Eudragit<sup>®</sup> RL100 como polímero modelo no biodegradable. Como puede apreciarse en la figura 1, el incremento en la concentración de polímero de la fase orgánica, particularmente Eudragit<sup>®</sup> RL100 (25-210 mg/mL), induce un aumento en el tamaño de las NC (87-360 nm). El aumento en la concentración de poli( $\epsilon$ -caprolactona) en la fase orgánica (2-5 mg/mL) siguió la misma tendencia observándose un incremento en el tamaño de las NC (178-292 nm). Este comportamiento puede explicarse considerando el mecanismo de formación de las nanopartículas: al entrar en contacto la fase acuosa y la fase orgánica, el solvente de esta última difunde hacia la fase acuosa acarreando consigo cadenas de polímero. La completa incorporación de la acetona en el agua induce la agregación y deposición del polímero en la superficie del material oleoso, llevando así a la formación de las NC. Al aumentar la concentración de polímero en la fase orgánica, existe una mayor cantidad de cadenas poliméricas por unidad de volumen de solvente, lo cual conduce a la formación de NC de mayor tamaño. Este comportamiento fue consistente hasta que se llegó a 210 mg/mL de Eudragit<sup>®</sup> RL100 y 5 mg/mL de poli( $\epsilon$ -caprolactona) en la fase orgánica. Con concentraciones mayores de polímero, se observó que se formaban agregados poliméricos irregulares, lo cual afectaba, considerablemente, tanto el rendimiento de obtención de nanopartículas, como la eficiencia de encapsulación del CRV [13].



**Figura 1.** Influencia de la concentración de polímero (Eudragit<sup>®</sup> RL100 [A] y poli( $\epsilon$ -caprolactona) [B]) en la fase orgánica sobre el tamaño de nanopartículas preparadas por nanoprecipitación (media  $\pm$  D.E., n=3).

*Efecto de la concentración de carvacrol sobre el tamaño de partícula.* Una vez obtenidas las nanopartículas con el tamaño deseado (~ 200 nm), se procedió a determinar la influencia de la concentración de CRV en la fase orgánica sobre el tamaño de las NC-CRV a fin de obtener las condiciones para incorporar eficientemente la mayor cantidad de CRV en las NC. Primeramente, se evaluaron dos concentraciones de Eudragit® RL100 (25 y 40 mg/mL) con concentraciones crecientes de CRV (2-30 mg/mL) en la fase orgánica. Como se muestra en la figura 2, utilizando 25 mg/mL de Eudragit® RL100 se obtuvieron NC-CRV con tamaños promedio de 63 a 106 nm, mientras que con 40 mg/mL de polímero los diámetros variaron de 83 a 101 nm. En general, fue evidente que al aumentar la concentración de CRV, también se incrementó el tamaño de las NC, lo cual se debió a que se tenía una mayor cantidad de material oleoso disponible para formar el núcleo de las NC-CRV. El comportamiento es consistente con los obtenidos en otros estudios con otros estudios [11, 14].



**Figura 2.** Efecto de la concentración de carvacrol en la fase orgánica sobre el tamaño de nanocápsulas de A) Eudragit® RL 100 y B) poli(ε-caprolactona) preparadas por nanoprecipitación (media ± D.E., n=3).

También se pudo observar que, utilizando concentraciones de CRV mayores a 20 mg/mL, una fracción de éste no era encapsulada, la cual era fácilmente detectada como una mancha oleosa en la superficie de la suspensión de NC. Es probable que en este punto el exceso de CRV interfiriera con la agregación/deposición del polímero en la interfase CRV/fase acuosa y, en consecuencia, con la formación de las NC-CRV.

En general, empleando poli(ε-caprolactona) a 3 mg/mL con concentraciones variables de CRV en la fase orgánica se obtuvo el mismo comportamiento que para el Eudragit® RL100. Como se observa en la figura 3, se realizaron lotes de NC-CRV con una concentración de polímero de 3 mg/mL y concentraciones de CRV entre 2 y 4 mg/mL en la fase orgánica, lo cual permitió obtener tamaños promedio de las NC de 181 a 167 nm, respectivamente. La concentración crítica en la cual una fracción de CRV no era encapsulada correspondió a 3.4 mg/mL. Prácticamente, puede apreciarse en la figura 2 que a partir de esta concentración la variabilidad (D. E.= 16.9) entre los lotes fue elevada, lo cual hace suponer que el exceso de CRV interfiere con la agregación/deposición del polímero en la superficie de las NC, afectando la formación de las NC.

En investigaciones recientes se ha demostrado que las nanopartículas con un diámetro alrededor de los 200 nm, aplicadas en piel, se acumulan principalmente en los folículos pilosos y en los pliegues más profundos del estrato córneo, sin penetrarlo. En base a lo anterior, las condiciones experimentales que permitieron obtener NC con diámetros cercanos a los 200 nm, con un rendimiento del 100 % en la conversión de polímero a nanopartículas (es decir, sin agregados irregulares) y con una encapsulación óptima de CRV, fueron: una fase orgánica compuesta de 5 mL de acetona con poli(ε-caprolactona) a 15 mg/mL y CRV a 3 mg/mL; asimismo, una fase acuosa constituida de 20 mL de Tween 80 al 3 % (p/v). Las NC-CRV con la formulación optimizada presentaron un diámetro promedio de 180 nm con un IP de 0.083. En particular, el IP resulta aceptable si se considera que varía de 0 a 1, donde el valor más cercano a cero indica una distribución homogénea de nanopartículas.

### 3.2. Caracterización de la formulación de nanocápsulas con carvacrol

Con el método de cromatografía de gases con *HS-SPME* previamente validado, se cuantificó la cantidad de CRV presente en las NC-CRV preparadas con poli( $\epsilon$ -caprolactona). Considerando las ecuaciones 1 y 2, se calcularon el porcentaje de encapsulación y la eficiencia de encapsulación, cuyos valores correspondieron a  $50.9\% \pm 2.40$  (media  $\pm$  D.E.,  $n=3$ ) y  $90.8\% \pm 0.20$  (media  $\pm$  D.E.,  $n=3$ ), respectivamente [12].

En cuanto al porcentaje de encapsulación (Tabla 1), el cual indica las partes de molécula activa incorporadas por cada 100 partes que constituyen la NC, el valor calculado muestra que prácticamente el 51% de las NC están formadas por CRV y el resto corresponde al polímero formador de las NC, la poli( $\epsilon$ -caprolactona). El resultado se considera aceptable, sobre todo si se toma en cuenta que la eficiencia de encapsulación fue elevada. Por otra parte, el porcentaje de eficiencia de encapsulación (90.8 %) indica que solo el 9.2 % de CRV contenido en la fase orgánica no quedó encapsulado en las NC. Este dato permite afirmar que el método de preparación fue eficiente, bajo las condiciones establecidas, para la incorporación de CRV en las NC. En general, se puede decir que la eficiencia de encapsulación fue muy elevada, lo cual resulta congruente con estudios anteriores en los cuales estableció que el método de nanoprecipitación es recomendado para incorporar moléculas de carácter lipofílico [7, 11, 15].

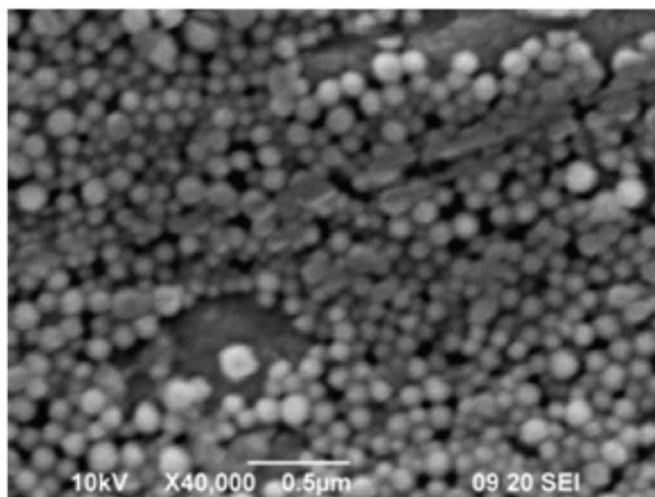
**Tabla 1.** Características fisicoquímicas de la formulación de nanocápsulas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) con carvacrol obtenidas por nanoprecipitación.

Características fisicoquímicas	Determinación
Tamaño e [IP]	180 nm [0.083]
Porcentaje de encapsulación	50.9
Eficiencia de encapsulación	90.8
Potencial $\zeta$	-17.8 mV
Estabilidad	16 semanas
Morfología	Esférica

La estabilidad de la formulación de NC-CRV se determinó midiendo periódicamente el diámetro promedio de las NC por espectroscopia de correlación fotónica y realizando una evaluación visual para detectar la presencia de agregados de polímero o de restos de CRV en la superficie de la suspensión de las NC. Después de 16 semanas, prácticamente, el diámetro de las NC se mantuvo cercano a 180 nm y no varió de forma significativa. Asimismo, no se observó la presencia de agregados poliméricos o de CRV libre en la superficie de la suspensión de nanopartículas.

Estos resultados sugieren que la formulación de NC-CRV es estable físicamente, por lo menos, durante este periodo de tiempo. Es probable que el potencial  $\zeta$  de las NC, el cual correspondió a -17.8 mV haya sido el factor que influyó para mantener a las NC en suspensión, evitando su agregación. Dicha carga superficial suele ser negativa y produce fuerzas de repulsión electrostática entre las partículas vecinas, lo que permite su suspensión en el medio que las contiene. Esto concuerda con estudios llevados a cabo por otros autores en donde se ha demostrado que NC poliméricas pueden presentar estabilidad hasta por 6 meses [15].

Finalmente, en las micrografías (Figura 3), obtenidas por microscopia electrónica de barrido, se observó que la formulación de NC presentó una población de partículas homogénea. Además se pudo apreciar que las NC son esféricas con tamaños aproximados de 200 nm. La homogeneidad de la población de las nanopartículas, tanto en tamaño como en forma, resultó favorable y hace suponer que el desempeño individual de éstas será uniforme y consistente durante las evaluaciones biológicas a las que serán sometidas posteriormente.



**Figura3.** Micrografía electrónica de barrido de nanocápsulas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) cargadas con carvacrol.

#### 4. Conclusiones

En conclusión, se logró obtener una formulación de NC con CRV con las siguientes características fisicoquímicas: un tamaño promedio de 180 nm con un IP de 0.083, un potencial  $\zeta = -17.8$  mV y un porcentaje de encapsulación del 51 %. Asimismo, la formulación presentó una distribución de tamaños de partícula homogénea, lo cual se reflejó en el bajo índice de polidispersidad (IP de 0.083). Dicha uniformidad en cuanto a tamaño, y también en cuanto a morfología, se confirmó por microscopía electrónica de barrido. Asimismo, la formulación resultó ser estable por al menos 16 semanas. En cuanto al proceso de preparación, la técnica de nanoprecipitación resultó ser un buen método de preparación ya que se lograron obtener eficiencias de encapsulación mayores al 90 %. Finalmente, se puede concluir que la formulación obtenida presenta las características y propiedades adecuadas para servir como un potencial sistema acarreador de un agente antioxidante (carvacrol) para su aplicación en piel con el objetivo de potenciar su efecto antioxidante en su uso como auxiliar preventivo contra el cáncer de piel.

#### 5. Agradecimientos

El presente trabajo fue apoyado por el proyecto número 129961 del Fondo de Ciencia Básica de SEP-CONACYT y por la red de Nanociencias y Nanotecnología de CONACYT.

#### 6. Referencias

- [1] Couvreur P., Vauthier C., Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. *Pharm. Res.*, 23(7):1417-50 (2006).
- [2] Teli M. K., Mutalik S., Rajanikant G.K., Nanotechnology and nanomedicine: going small means aiming big. *Curr. Pharm. Des.*, 16(16):1882-92 (2010).
- [3] Xiao R.Z., Zeng Z.W., Zhou G.L., Wang J.J., Li F.Z., Wang A.M., Recent advances in PEG-PLA block copolymer nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine*. 26(5):1057-65 (2010).
- [4] Dinarvand R, Sepehri N, Manoochehri S, Rouhani H, Atyabi F., Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *Int. J. Nanomedicine.*, 6:877-95 (2011).
- [5] Greenhalgh K. and Turos E., In vivo studies of polyacrylate nanoparticle emulsions for topical and systemic applications. *Nanomedicine*, 5(1):46-54 (2009).
- [6] Lane M.E., Nanoparticles and the skin - applications and limitations. *J. Microencapsul.* En impresión (2011).
- [7] Alvarez Román R., Barré G, Guy RH, Fessi H., Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 52: 191-195 (2001).
- [8] Özbaş-Turan S. and, Akbuğa J., Plasmid DNA-loaded chitosan/TPP nanoparticles for topical gene delivery. *Drug Deliv.*, 18(3):215-22 (2011).



- [9] Abdel-Mottaleb M.M., Neumann D., Lamprecht A., Lipid nanocapsules for dermal application: A comparative study of lipid-based versus polymer-based nanocarriers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 79(1):36-42 (2011).
- [10] Alvarez-Román R., Naik A., Kalia Y. N., Fessi H., Guy R., Visualization of skin penetration using confocal laser scanning microscopy., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58(2):301-16 (2004).
- [11] Pinto Reis C., Neufeld R.J., Ribeiro A.J., Veiga F., Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine*, 2(1):8-21 (2006).
- [12] Cavazos Rodríguez M.R., Galindo-Rodríguez S.A., Waksman Torres, N., Castro Ríos R., Alvarez Román R., Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de un aceite esencial en nanopartículas poliméricas., 45° Cong. Quím., Soc. Quím. Méx., Quintana Roo., México (2010).
- [13] Galindo-Rodríguez S., Allémann E., Fessi H., Doelker E., Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharm. Res.* 21(8):1428-39 (2004).
- [14] Ferranti V., Marchais H., Chabenat C., Orecchioni A.M., Lafont O., Primidone-loaded poly- $\epsilon$ -caprolactone nanocapsules: incorporation efficiency and in vitro release profiles., *Int. J. Pharm.* 193(1):107-11 (1999).
- [15] Guterres S.S., Fessi H., Barratt G., Devissaguet J.P., Puisieux F., Poly(D,L-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study., *Inter. J. Pharm.*, 113:57-63 (1999).

