

## Vehiculización de Proteínas en Microesferas Biodegradables

Diego A. CHIAPPETTA <sup>1\*</sup>, Carolina APICELLA <sup>2</sup>, Teresa GENTILE <sup>2</sup>,  
José DOKMETJIAN <sup>2</sup> & Carlos BREGNI <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Tecnología Farmacéutica, <sup>2</sup> Departamento de Inmunología,  
Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires,  
Junín 956 (1113) Buenos Aires, Argentina.

**RESUMEN.** Se obtuvieron microesferas de poli(D,L-láctico-co-glicólico) conteniendo ovoalbúmina por medio de una emulsión múltiple agua en aceite en agua empleando una técnica de evaporación de solvente. Se realizó un experimento con un diseño factorial 2<sup>3</sup> para estudiar el efecto de tres variables independientes (cantidad de principio activo, cantidad de polímero y concentración de alcohol polivinílico) sobre las variables dependientes (eficacia de encapsulación y tamaño de partícula). Las tres variables independientes influyeron significativamente sobre la eficacia de encapsulación de la ovoalbúmina. En el caso del tamaño de partícula, también las tres variables ejercieron una influencia significativa. Los estudios de liberación *in vitro* han mostrado que después de un efecto inicial inmediato de liberación, se ha obtenido una liberación de ovoalbúmina en forma sostenida durante 28 días.

**SUMMARY.** "Vehiculation of Proteins in Biodegradable Microspheres". Microspheres of poly(D,L-lactide-co-glicolide) containing ovalbumin were prepared by the solvent evaporation method using a multiple water in oil in water emulsion. 2<sup>3</sup> factorial design was used to determine the effect of three independent variables (amount of drug, amount of polymer and concentration of polyvinyl alcohol) over the dependent variables (efficacy of entrapment and particle size). The three independent variables influenced significantly over the efficacy of entrapment. In the particle size case, also the three variables influenced significantly. The *in vitro* release studies have shown that after an immediate initial effect of release, has obtained a sustained release among 28 days.

### INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la tecnología del ADN recombinante en la mitad de los 70 marca el comienzo de la era biotecnológica moderna <sup>1</sup>. El rápido crecimiento en este campo ha permitido el desarrollo de numerosas proteínas recombinantes, algunas de las cuales son de gran importancia terapéutica <sup>2</sup>. Este crecimiento ha facilitado la producción económica de estas sustancias a gran escala <sup>3</sup>.

En la naturaleza, las proteínas son sintetizadas en pequeñas cantidades y son estabilizadas por el entorno celular y extracelular. En cambio, para desarrollar un producto farmacéutico, las proteínas deben ser altamente purificadas, concentradas y tener una vida media de al menos dos años.

La mayoría de estas proteínas dependen del desarrollo de novedosas tecnologías para mejorar y controlar su liberación. La complejidad es-

tructural y bioquímica de las proteínas comparada con los principios activos convencionales hace del diseño de formulaciones para la liberación de proteínas terapéuticas un verdadero desafío.

Los transportadores (*carriers*) utilizados como sistemas de liberación de drogas ofrecen una alternativa óptima para la administración de fármacos. Entre estos sistemas encontramos microesferas, nanopartículas, liposomas, etc., los cuales modulan las características de liberación y absorción de las drogas <sup>4</sup>.

Los sistemas microparticulados son utilizados como fármacos de liberación sostenida debido a su pequeño tamaño y a sus eficientes características como transportadores. De los polímeros biodegradables sintéticos comúnmente utilizados para microencapsular, los poliésteres alifáticos [poli(láctico), poli(glicólico) y poli(láctico-co-glicólico)] han generado un gran interés de-

**PALABRAS CLAVE:** Biodegradable, D,L-PLGA, Diseño factorial, Microesferas, Proteínas.

**KEY WORDS:** Biodegradable, D,L-PLGA, Factorial design, Microspheres, Proteins.

\* Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: diegochiappetta@yahoo.com.ar

bido a su excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad <sup>5</sup>. Inicialmente, estos polímeros fueron desarrollados por la industria farmacéutica como materiales de sutura quirúrgicos, demostrando sus características como polímeros biodegradables. Además, se los ha considerado para una gran variedad de aplicaciones biomédicas, entre los que se encuentran implantes para la reconstrucción y el reemplazo óseo <sup>6,7</sup>.

Otra de las aplicaciones de los poliésteres alifáticos ha sido la preparación de sistemas de liberación controlada de drogas. Entre estos sistemas, se encuentran el Lupron Depot® (Takeda-Abbott), el Zoladex® (Zeneca), el Decapeptyl® (Ipsen Biotech) y el Prostag SR® (Lederle), los cuales han sido licenciados para su uso en humanos en Europa y en los Estados Unidos <sup>8-11</sup>.

Estos polímeros serían una herramienta básica en el campo de la biotecnología debido a la capacidad de poder transportar y vehicular en un solo *carrier* péptidos y/o proteínas. En el campo de la inmunología, estos polímeros podrían transportar y liberar antígenos, excipientes y adyuvantes desde un solo sistema de liberación.

La preparación de sistemas microparticulados con poli(D,L-láctico-co-glicólico) cargados con proteínas ha recibido gran atención en los últimos años debido a la posibilidad de lograr una liberación controlada en forma satisfactoria <sup>12-14</sup>.

La aplicación de un diseño estadístico para optimizar el desarrollo de formulaciones farmacéuticas podría proveer una metodología económica y eficiente. El diseño factorial es una herramienta estadística que nos permite obtener la información necesaria para entender la relación entre las variables controlables (independientes) y las variables de *performance* (dependientes). Esta técnica ha sido comúnmente empleada en el desarrollo de comprimidos <sup>15-17</sup>, microcápsulas <sup>18,19</sup> y suspensiones <sup>20</sup>.

El objetivo de este trabajo es obtener un sistema microparticulado biodegradable capaz de liberar proteínas en forma sostenida, para lo cual se ha utilizado un diseño factorial <sup>23</sup> para optimizar el proceso de desarrollo y mejorar las características farmacotécnicas de las formulaciones. Como modelo de proteína se utilizó ovoalbúmina (OVA). Además, se estudió la integridad estructural de la proteína por SDS-PAGE y la liberación *in vitro* de la OVA.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

OVA (Fluka); poli(D,L-láctico-co-glicólico)

(50:50) (D,L-PLGA 50:50) ( $M_w$  50.000-75.000) (Sigma); alcohol polivinílico (PVA) (Riedel-de Haën); cloruro de metileno (Anedra®) grado HPLC; cloruro de sodio (Parafarm®); fosfato de potasio monobásico (Parafarm®). Todos los materiales fueron utilizados como se recibieron.

### Diseño factorial de los experimentos

Los experimentos fueron realizados siguiendo un diseño factorial <sup>23</sup>. En este diseño, las variables independientes son cantidad de polímero ( $X_1$ ), concentración de PVA ( $X_2$ ) y cantidad de principio activo ( $X_3$ ). La eficacia de encapsulación ( $Y_1$ ) y el tamaño de partícula ( $Y_2$ ) son las variables dependientes. Las variables independientes y los niveles utilizados en la preparación de las microesferas se encuentran detallados en la Tabla 1. Todas las formulaciones fueron preparadas por triplicado. Los datos fueron evaluados utilizando el programa computacional Statistica®.

| Variable independiente                 | Nivel bajo | Nivel alto |
|--|------------|------------|
| Cantidad de polímero ( $X_1$ )         | 100 mg     | 200 mg     |
| Concentración de PVA ( $X_2$ )         | 0,5 % P/V  | 2,0 % P/V  |
| Cantidad de principio activo ( $X_3$ ) | 10 mg      | 20 mg      |

**Tabla 1.** Variables independientes y sus niveles.

### Preparación de las microesferas

Las microesferas de D,L-PLGA 50:50 conteniendo OVA fueron preparadas por medio de una emulsión múltiple agua en aceite en agua ( $A_1/O/A_2$ ) empleando una técnica de evaporación de solvente. Una cantidad exactamente pesada de OVA fue disuelta en 1 ml de agua destilada ( $A_1$ ). Para preparar la fase oleosa se disolvió una cantidad conocida de polímero (D,L-PLGA) en 5 ml de cloruro de metileno (O). La solución de proteína ( $A_1$ ) fue agregada a la solución polimérica (O) y agitada durante 1 minuto en un mezclador vortex. La emulsión primaria ( $A_1/O$ ) fue agregada bajo agitación en 150 ml de una solución acuosa de PVA. La emulsión múltiple  $A_1/O/A_2$  así obtenida se mantuvo bajo agitación durante 3 horas 30 minutos hasta la evaporación del cloruro de metileno. Las microesferas fueron recuperadas por centrifugación, lavadas con agua destilada y filtradas. Luego fueron secadas a temperatura ambiente en desecador durante 48 horas. Las diferentes formulaciones desarrolladas se detallan en la Tabla 2.

| Formulación | Cantidad de polímero (mg) | Concentración de PVA (% P/V) | Cantidad de principio activo (mg) |
|-------------|---------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| F1          | 200                       | 2,0                          | 20                                |
| F2          | 200                       | 2,0                          | 10                                |
| F3          | 100                       | 2,0                          | 20                                |
| F4          | 100                       | 2,0                          | 10                                |
| F5          | 200                       | 0,5                          | 20                                |
| F6          | 200                       | 0,5                          | 10                                |
| F7          | 100                       | 0,5                          | 20                                |
| F8          | 100                       | 0,5                          | 10                                |

**Tabla 2.** Formulaciones de microesferas de D,L-PLGA 50:50 conteniendo OVA.

### **Determinación del contenido de principio activo**

Las microesferas (7-10 mg) fueron tratadas con 3 ml de una solución de NaOH 0,1 M y lauril sulfato de sodio (SDS) al 5% P/V durante 16 horas a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas para determinar el contenido de proteína en el sobrenadante utilizando el método del BCA <sup>21</sup>. La concentración de OVA se determinó versus una serie de estándares de OVA en una solución de NaOH 0,1 M y SDS al 5% P/V.

### **Morfología y distribución del tamaño de partícula**

Las características morfológicas de las microesferas fueron estudiadas utilizando un microscopio óptico trinocular (Arcano XSZ-107 E) con cámara fotográfica (Seagull DF-300s).

La determinación del tamaño de partícula se efectuó mediante microscopía óptica (Arcano XSZ-107 E), para lo cual se determinaron los diámetros de 300 partículas <sup>22</sup>. La distribución de tamaño de las microesferas fue ajustada en función del porcentaje de frecuencia.

### **Integridad estructural de la proteína**

La integridad estructural de la OVA fue determinada por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10%. La OVA fue extraída de las microesferas con una solución de NaOH 0,1 M y lauril sulfato de sodio (SDS) al 5% P/V durante 16 horas a temperatura ambiente.

Para asegurar la integridad estructural de la proteína, se comparó la posición de las bandas de la OVA antes y después del proceso de encapsulación.

### **Estudios de liberación *in vitro***

Para realizar el ensayo de liberación de la

OVA se eligió la formulación F1 y F2. El estudio de liberación *in vitro* se llevó a cabo en condiciones estáticas. El ensayo se efectuó a una temperatura de  $37 \pm 0,5$  °C, utilizando como medio de disolución 1 ml de una solución de buffer fosfato pH 7,4. A tiempos predeterminados, las muestras fueron centrifugadas para remover el sobrenadante y analizar el contenido de proteína utilizando el método de BCA. Para continuar el ensayo de liberación se agregó a las microesferas solución de buffer fosfato pH 7,4 recién preparada. En cada caso, los resultados son el promedio de tres determinaciones.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Preparación de las microesferas**

La selección de una técnica de microencapsulación es fundamentalmente determinada por la solubilidad del principio activo <sup>23</sup>. Para microencapsular compuestos solubles en agua existen varios métodos <sup>24</sup>. Los principales métodos se dividen en dos categorías: evaporación de solvente y coacervación - separación de fases <sup>25-27</sup>.

En este caso, se seleccionó la metodología basada en una emulsión múltiple agua en aceite en agua (A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub>) con evaporación de solvente por ser la más adecuada para encapsular fármacos hidrofílicos en micropartículas <sup>28</sup>. Esta técnica involucra principalmente dos pasos, primero la formación de una emulsión primaria (A<sub>1</sub>/O) estable, y luego, la evaporación del solvente para permitir la solidificación de las microesferas.

Las microesferas de D,L-PLGA 50:50 con OVA, obtenidas por medio de una emulsión múltiple A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub> empleando una técnica de evaporación de solvente, poseen eficacias de encapsulación que van desde  $12,2 \pm 2,1$  % a  $76,2 \pm 2,2$  % (Tabla 3). Las partículas resultantes son de forma esférica (Fig. 1) con un tamaño comprendido entre  $9,0 \pm 7,2$  μm y  $67,9 \pm 34,6$  μm para las diferentes formulaciones desarrolladas (Tabla 3).

### **Evaluación del diseño factorial**

Los diseños estadísticos experimentales son generalmente utilizados para identificar las variables críticas en el desarrollo de productos farmacéuticos. El uso de estos diseños permite desarrollar modelos matemáticos, los cuales pueden adecuadamente describir y predecir el comportamiento en término de las variables estudiadas.

En este caso, se evaluó el efecto de las variables independientes (X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub>) sobre el tamaño de partícula y la eficacia de encapsulación

| Formulación | Eficacia de encapsulación (%) | Tamaño de partícula (µm) media ± D.S. |
|-------------|-------------------------------|---------------------------------------|
| F1          | 76,2 ± 2,2                    | 9,5 ± 7,3                             |
| F2          | 57,3 ± 2,1                    | 9,0 ± 7,2                             |
| F3          | 24,9 ± 2,0                    | 10,0 ± 7,5                            |
| F4          | 43,0 ± 1,9                    | 10,1 ± 8,2                            |
| F5          | 31,8 ± 1,6                    | 67,9 ± 34,6                           |
| F6          | 31,4 ± 1,8                    | 66,0 ± 35,6                           |
| F7          | 12,2 ± 2,1                    | 57,6 ± 35,7                           |
| F8          | 38,1 ± 1,9                    | 55,5 ± 34,1                           |

**Tabla 3.** Características de las microesferas.

utilizando un análisis de la varianza (ANOVA). Se aplicó una regresión múltiple a las variables dependientes en función de las variables independientes. En el caso de la eficacia de encapsulación se obtuvo la siguiente ecuación:

$$Y = 101,2833 - 0,364X_1 - 8,6667X_2 - 5,12X_3 + 0,068X_1X_2 + 0,0227X_1X_3 - 0,2X_2X_3 + 0,0072X_1X_2X_3$$

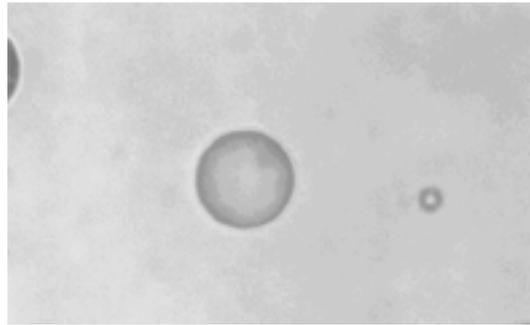
donde  $R_2 = 0,9988$  y el Ajuste  $R_2 = 0,9977$ . Para el tamaño de partícula, la ecuación obtenida es la siguiente:

$$Y = 53,1333 + 0,1472X_1 - 20,5667X_1 + 0,32X_3 - 0,0823X_1X_2 - 0,0004X_1X_3 - 0,2X_2X_3 + 0,0005X_1X_2X_3$$

donde  $R_2 = 0,9998$  y el Ajuste  $R_2 = 0,9995$

La bondad de ajuste del modelo fue revisada por el ajuste del coeficiente de determinación (ajuste  $R^2$ ). El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) es una medida del grado de reducción en la variabilidad de  $Y$ . Grandes valores de  $R^2$  no necesariamente implican que el modelo de regresión sea bueno. Al agregar una variable al modelo siempre habrá un incremento en el  $R^2$ . En cambio, el ajuste  $R^2$  no siempre tendrá un incremento en su valor al agregar variables al modelo. En el caso de la eficacia de encapsulación, el valor del coeficiente de determinación ( $R^2 = 0,9988$ ) fue mayor que el valor del ajuste del coeficiente de determinación (ajuste  $R^2 = 0,9977$ ), lo cual indica una alta significancia del modelo. Para el tamaño de partícula, el valor de  $R^2 = 0,9998$  y el valor del ajuste  $R^2 = 0,9995$ , lo cual indica también una alta significancia del modelo.

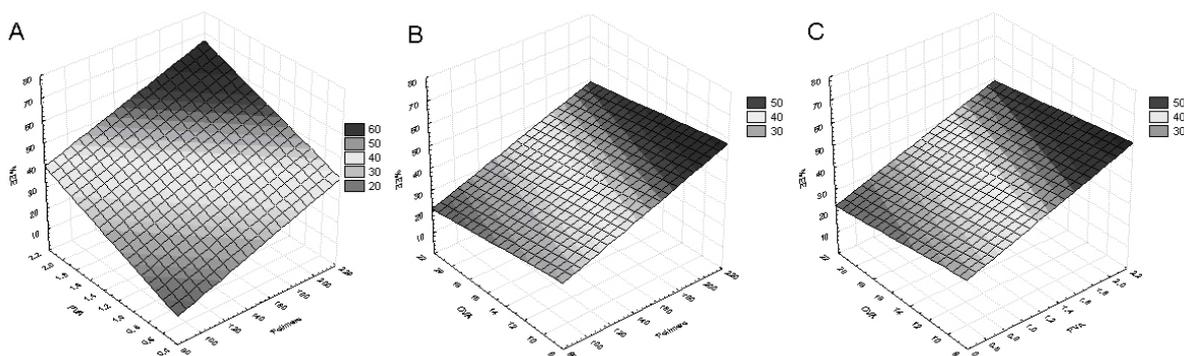
Los resultados del análisis de la varianza indican que las tres variables independientes ( $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$ ) han influido significativamente en la eficacia de encapsulación. De las tres variables estudiadas, la concentración de PVA ( $X_2$ ) es la variable que mayor influencia ejerció sobre la



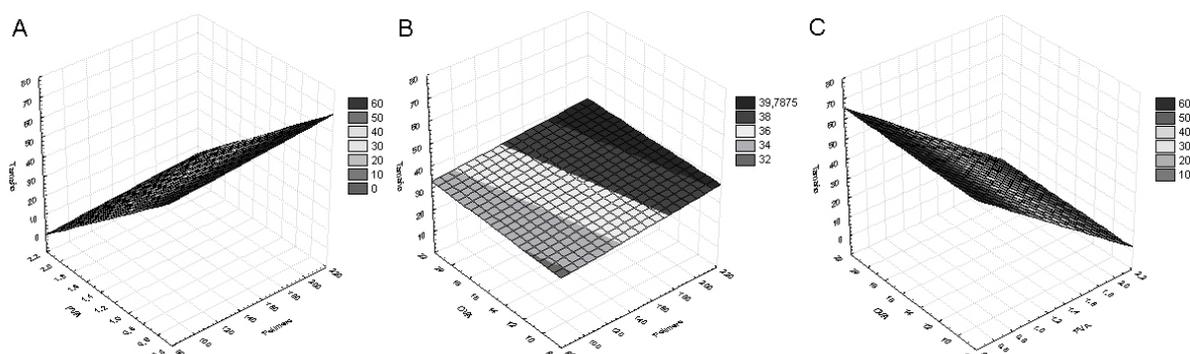
**Figura 1.** Microesferas de D,L-PLGA 50:50 conteniendo OVA.

encapsulación de OVA. A mayor concentración de PVA se observó una mayor carga de ovoalbúmina (Figs. 2A y 2C). Un aumento en la viscosidad de la fase externa de la emulsión  $A_1/O/A_2$  impediría el pasaje de principio activo a la fase externa. Con respecto a la cantidad de polímero ( $X_1$ ) empleado, un aumento en la concentración mejora la eficacia de encapsulación en las formulaciones preparadas con el nivel alto de PVA (Fig. 2A). Esto coincide con los resultados obtenidos por Rafati *et al.*<sup>12</sup> y Yan *et al.*<sup>29</sup>. Se considera que esto, se debe a la alta concentración de polímero en la emulsión primaria ( $A_1/O$ ), lo cual tiende a restringir la migración de la fase acuosa interna/proteína a la fase acuosa externa. El aumento en la concentración del polímero produce un aumento en la viscosidad de la solución polimérica, de esta manera, se puede obtener una emulsión primaria ( $A_1/O$ ) más estable. La cantidad de principio activo ( $X_3$ ) fue la variable que menos influyó como se observa en las Figs. 2B y 2C.

Con respecto al tamaño de partícula, las tres variables independientes influyeron significativamente. La variable independiente  $X_2$  es la que ejerció mayor influencia sobre el tamaño de partícula. Esta metodología requiere el agregado de PVA en la fase acuosa externa ( $A_2$ ) como coloid protector, para lograr una emulsión múltiple estable. Al aumentar la concentración de PVA se obtienen partículas de menor tamaño (Figs. 3A y 3C). Esto se debe a un aumento de la viscosidad en la fase externa de la emulsión múltiple. Una mayor concentración de PVA favorece la estabilización de las partículas de menor tamaño, lo cual disminuye la tendencia a coalescer y formar partículas de mayor tamaño. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Rafati *et al.*<sup>12</sup>. La variable  $X_1$  tuvo un menor efecto sobre el tamaño de partícula. Este efecto se observa en las formulaciones preparadas con el nivel bajo de PVA (F5, F6, F7 y F8), donde una mayor



**Figura 2.** Diagrama de superficie en función del porcentaje de eficacia de encapsulación. **A)** Concentración de PVA (% P/V) y cantidad de polímero (mg). **B)** Cantidad de principio activo (mg) y cantidad de polímero (mg). **C)** Cantidad de principio activo (mg) y concentración de PVA (% P/V).



**Figura 3.** Diagrama de superficie en función del tamaño de partícula ( $\mu\text{m}$ ). **A)** Concentración de PVA (% P/V) y cantidad de polímero (mg). **B)** Cantidad de principio activo (mg) y cantidad de polímero (mg). **C)** Cantidad de principio activo (mg) y concentración de PVA (% P/V).

cantidad de polímero provoca un aumento en el tamaño de partícula (F5 y F6) (Fig. 3A). Al utilizar una mayor cantidad de polímero se produce un aumento en la viscosidad de la primera emulsión (A<sub>1</sub>/O) que impide disminuir el tamaño de las gotas. Por último, la cantidad de principio activo (X<sub>3</sub>) es la variable de menor influencia en el tamaño de partícula (Figs. 3B y 3C).

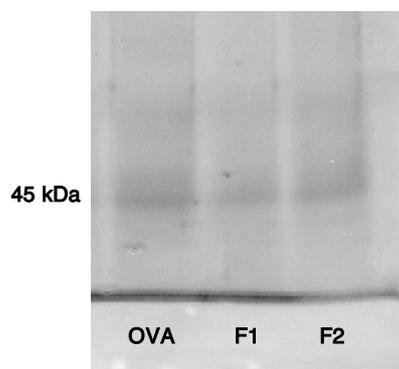
**Integridad estructural de la proteína**

En el SDS-PAGE se observa que la posición de la banda correspondientes a la OVA encapsulada en las microesferas de D,L-PLGA 50:50 es igual a la de la OVA nativa (Fig. 4). En el ensayo no se observaron bandas adicionales, lo que indicaría la ausencia de agregados o fragmentos mayores o menores a 45 kDa. Estos resultados demuestran que la integridad estructural de la OVA no fue afectada por el proceso de microencapsulación.

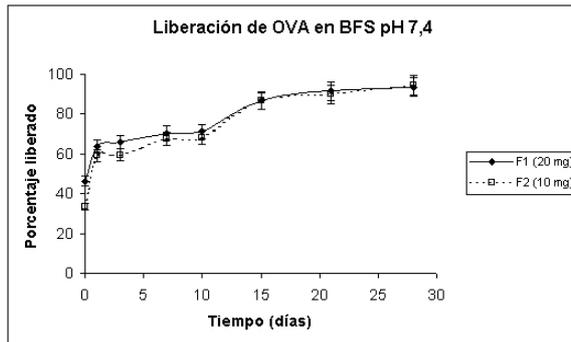
**Estudios de liberación in vitro**

El perfil de liberación de la formulación F1 y F2 fue caracterizado por un efecto inicial de liberación inmediata durante las primeras 24 ho-

ras (Fig. 5). Este efecto inicial de liberación inmediata, conocido como efecto *burst*, se debe a la liberación de OVA desde la superficie de la microesfera. Después de este efecto inicial se observa una liberación del principio activo en forma sostenida hasta la finalización del ensayo (28 días).



**Figura 4.** SDS-PAGE de la OVA nativa (banda de la izquierda). La banda del centro es la OVA extraída de la formulación F1 y la banda de la derecha es la OVA extraída de la formulación F2.



**Figura 5.** Perfiles de liberación de OVA desde microesferas de D,L-PLGA 50:50.

**CONCLUSIONES**

De los resultados obtenidos se puede concluir que los resultados del análisis de varianza indican que las tres variables independientes (cantidad de principio activo, cantidad de polímero y concentración de PVA) influyeron significativamente sobre la encapsulación de OVA. En el caso del tamaño de partícula, también las 3 variables ejercieron una influencia significativa. Por otra parte, los resultados en el SDS-PAGE demuestran que la integridad estructural de la OVA no fue afectada por el proceso de microencapsulación. Finalmente, los estudios de liberación *in vitro* han mostrado que las formulaciones de D,L-PLGA 50:50 se caracterizan por un efecto inicial de liberación inmediata durante las primeras 24 horas. Después de este efecto inicial se observa una liberación del principio activo en forma sostenida hasta la finalización del ensayo (28 días) (F1 y F2).

Este método de preparación podría ser utilizado para lograr una formulación de dosis única, lo que nos permitiría una sola administración del sistema mejorando la compliance del paciente al reducir la cantidad de dosis a aplicar.

**Agradecimientos.** Los autores agradecen el aporte financiero para este trabajo provisto por UBACyT (Proyecto B043).

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Walsh, G. (2003) *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **55**: 3-10.
- Hutchinson, F.G. & B.J.A. Furr (1990) *J. Control. Rel.* **13**: 279-94.
- Kamphorst, A.O., Mendes de Sá, I., Faria, A.M.C. & R.D. Sinisterra (2004) *Eur. J. Pharm. Biopharm* **57**: 199-205.
- Vasir, J.K., Tambwekar, K. & S. Garg (2003) *Int. J. Pharm.* **255**: 13-32.
- Anderson, J.M. & M.S. Shive (1997) *Adv. Drug Del. Rev.* **28**: 5-24.

- Rokkanen, P., Bostman, O., Vainionpaa, S., Vihtonen, K., Tormala, P., Laiho, J., Kilpikari, J. & M. Tamminmaki (1985) *Lancet* **22**: 1422-4.
- Hoppen, H.J., Leenslag, J.W. & A.J. Pennings (1990) *Biomaterials* **11**: 286-90.
- Okada, H., Yamamoto, M., Heya, T., Inoue, Y., Shigeru, K., Ogawa, Y. & H. Toguchi (1994) *J. Control. Rel.* **28**: 121-9.
- Dutta, A.S., Furr, B.J.A. & F.G. Hutchinson (1993) *Pharm. Med.* **7**: 9-28.
- Klippel, K.F., Jurincic Winkler, C., Jocham, D., Rubben, H., Moser, B. & A. Gulati (1999) *Der Urologe A* **38**: 270-5.
- Gommersall, L.M., Hayne, D., Shergill, I.S., Arya, M. & D.M.A. Wallace (2002) *Expert Opin. Pharmac.* **3**: 1685-92.
- Rafati, H., Coombes, A.G.A., Adler, J., Holland, J. & S.S. Davis (1997) *J. Control. Rel.* **43**: 89-102.
- Boury, F., Marchais, H., Proust, J.E. & J.P. Benoit (1997) *J. Control. Rel.* **45**: 75-86.
- Igartua, M., Hernández, R.M., Esquisabel, A., Gascón, A.R., Calvo, M.B. & J.L. Pedraz (1998) *Int. J. Pharm.* **169**: 45-54.
- Danckwerts, M.P. & J.G. van der Watt (1995) *Int. J. Pharm.* **123**: 85-94.
- Ngo, T.H., Vertommen J. & R. Kinget (1997) *Int. J. Pharm.* **146**: 271-4.
- Ceschel, G.C., Maffei, P. & R. Badiello (1999) *Drug Dev. Ind. Pharm.* **25**: 1167-76.
- Jones, D.S. & K.J. Pearce (1995) *Int. J. Pharm.* **118**: 199-205.
- Gohel, M.C. & A.F. Amin (1998) *J. Control. Rel.* **51**: 115-22.
- Elkheshen, S.A., Badawi, S.S. & A.A. Badawi (1996) *Drug Dev. Ind. Pharm.* **22**: 623-30.
- Stoscheck, C.M. (1990) *Meth. Enzymol.* **182**: 50-69.
- Vila Jato, J.L. (1997) "Sólidos Pulvulentos" en *Tecnología Farmacéutica*, Editorial Síntesis, Madrid, págs. 75-142.
- Ogawa, Y., Yamamoto, M., Okada, H., Yashiki, T. & T. Shimamoto (1988) *Chem. Pharm. Bull.* **36(3)**: 1095-1103.
- Okada, H. & H. Toguchi (1995) *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **12**: 1-99.
- Sanders, L.M., Kent, J.S., McRae, G.I., Vickery, B.H., Tice, T.R. & D.H. Lewis (1984) *J. Pharm. Sci.* **73**: 1294-7.
- Okada, H., Ogawa, Y. & T. Yashiki (1987) *Patent U.S.*, N° 4,652,441.
- Kent, J.S., Lewis, D.H., Sanders, L.M. & T.R. Tice (1987) *Patent U.S.*, N° 4,675,189.
- Iwata, M. & J.W. McGinity (1992) *J. Microencapsul.* **9**: 201-14.
- Yan, C., Resau, J.H., Hewetson, J., West, M., Rill, W.L. & M. Kende (1994) *J. Control. Rel.* **32**: 231-41.