

Diseño de un Sistema Matriz de Liberación Prolongada a base de Quitosano de Producción Chilena

Cristián TAPIA *¹, Jaime SAPAG-HAGAR¹,
Gianfranco ZUNINO¹ y Edda COSTA²

¹ Laboratorio de Operaciones Unitarias

y ² Laboratorio de Tecnología Farmacéutica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.
Universidad de Chile, Casilla 233, Santiago 1, Chile.

RESUMEN. Los objetivos de este trabajo fueron establecer la utilidad del quitosano de producción chilena como un excipiente adecuado para producir matrices hidrofílicas de liberación prolongada, y comparar dos sistemas de matrices, uno con quitosano (Q) y otro con la mezcla quitosano-alginato (Q/A). Las formulaciones (Q/A) produjeron una liberación de droga más prolongada que las formulaciones (Q). Las formulaciones B (Q 20%), C (Q 30%), y D (Q/A 10%) mostraron un mecanismo de liberación controlado por difusión fickiana. Las formulaciones E (Q/A 20%) y F (Q/A 30%) mostraron una difusión no fickiana. Los parámetros termodinámicos de activación calculados para las formulaciones C y D mostraron valores similares de dG.

SUMMARY. "Design of a Prolonged Release Matrix System Based on Chitosan of Chilean Production". The objectives of this work were to establish the utility of chitosan of Chilean production, as an excipient suitable for producing a prolonged-release hydrophilic matrix, and to compare two matrix systems, one with chitosan (Q) and the other with the mixture chitosan-alginate (Q/A). The formulations (Q/A) produced a more prolonged drug release than formulations (Q). Formulations B (Q 20%), C (Q 30%), and D (Q/A 10%) showed a mechanism of release controlled by fickian diffusion. Formulations E (Q/A 20%) and F (Q/A 30%) showed a non-fickian diffusion. The thermodynamic activation parameters calculated for formulations C and D showed similar dG values.

INTRODUCCION

La quitina [(1→4)-2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucosa]_n es un polímero natural que se obtiene principalmente a partir de caparazones de crustáceos, encontrándose estrechamente asociada a sales inorgánicas como carbonato de calcio, así como a proteínas, lípidos y pigmentos. Para la obtención de la quitina generalmente se requieren tres etapas: desmineralización con ácido clorhídrico diluido, desproteínización con hidróxido de sodio acuoso y eliminación de lípidos con solventes

PALABRAS CLAVE: Alginato, Biopolímeros, Difusión, Indometacina, Liberación Prolongada de Droga, Quitosano, Termodinámica.

KEY WORDS: Alginate, Biopolymers, Chitosan, Diffusion, Indomethacin, Prolonged Drug Release, Thermodynamics.

* Autor a quien dirigir la correspondencia.

orgánicos ^{1,2}. Al ser tratada la quitina con álcali concentrado a altas temperaturas, experimenta varios grados de desacetilación y degradación generando quitosano ^{3,4}. Experimentalmente el quitosano puede ser diferenciado de la quitina por la solubilidad del primero en ácidos orgánicos diluïdos y por su composición porcentual de nitrógeno, la que alcanza a un 7% o más para quitosano y a un valor inferior para quitina. En solución ácida diluïda el quitosano se encuentra con su grupo amino protonado, lo que le confiere una carga eléctrica positiva que lo hace compatible sólo con sustancias de naturaleza catiónica o neutra, reaccionando con los polianiónicos formando geles o precipitando ⁵.

Chile produce quitosano (Biorend, Bioquímica Austral) a partir de la caparazón de centollas, subproducto de la industria pesquera de la zona de Punta Arenas (Chile). Su principal uso actual es agrícola para aumentar el crecimiento radicular.

Dada la excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad del quitosano, se ha ensayado su uso en productos farmacéuticos, cosméticos, industria de alimentos y biotecnológica ^{6,7}.

En el ámbito farmacéutico, el quitosano ha sido usado como formador de matrices en formulaciones de liberación prolongada ^{8,9}. Además, se han estudiado las interacciones entre quitosano y polímeros aniónicos, debido a que ellas producen formulaciones de liberación más prolongada que con quitosano sólo. Así, se ha reportado que el ácido cítrico y carbomer-934P pueden usarse como agentes formadores de gel con quitosano, mejorando el poder retardante de este último ¹⁰. Resultados similares se han obtenido con la mezcla quitosano y ácido hialurónico. Así, se ha reportado que la liberación de azul brillante CFC a partir de tabletas con esta mezcla está determinada fundamentalmente por el cambio de la razón de mezcla de los polímeros ¹¹.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el uso de quitosano de producción nacional como un excipiente para desarrollar matrices hidrofílicas erosionables en formas farmacéuticas sólidas de liberación prolongada y comparar dos sistemas matrices, uno constituido por quitosano y el otro por una mezcla de quitosano y alginato de sodio. Se comparó para ambos sistemas el poder retardante en la liberación de principio activo y se establecieron los mecanismos de liberación de él utilizando modelos difusionales ¹² y parámetros termodinámicos ¹³.

MATERIALES Y METODOS

En este estudio se elaboraron tabletas por compresión directa, las cuales fueron preparadas a partir de una mezcla de indometacina (B.P.1980, Hopei, China), lactosa (Tabletose), alginato de sodio (Protan, Noruega) y quitosano (Bioquímica Austral, Chile).

Tratamiento y caracterización del quitosano

Previo a la manufactura de las tabletas, fue necesario realizar un pretratamiento y caracterización del quitosano con la finalidad de adecuarlo para su empleo en este tipo de forma farmacéutica. En primer lugar, fue sometido a una eliminación de restos de lípidos mediante tratamiento con etanol grado técnico a re-

flujo durante 30 minutos. Luego fue lavado con agua destilada y secado en estufa a 105 °C (Köttermann de aire forzado) hasta peso constante. Posteriormente fue molido en un molino de cuchillos (Bosch MKM 6000) y tamizado por malla 100. Se determinó su porcentaje de desacetilación valorando el grupo amino por alcalimetría usando como indicador anaranjado de metilo ¹⁴.

Su peso molecular promedio se calculó por viscosimetría capilar ¹⁵ mediante la ecuación de Mark-Houwink $[\eta] = K_m \cdot M^a$, en que $[\eta]$ es la viscosidad intrínseca, K_m es una constante de la fase dispersa y el medio de dispersión, M es el peso molecular promedio y a es una constante en el rango de 0 a 2. Para la mayoría de los polímeros este último parámetro varía entre 0,6 y 0,8, y depende de la forma del polímero. Se utilizaron las constantes a y K_m descritas por Roberts ¹⁶.

Se midió la viscosidad a 20 °C de una solución al 1% de quitosano en ácido acético al 1% en un viscosímetro Brookfield modelo LVT, utilizando el spindle 3 a 30 rpm ¹⁷. Además se determinó humedad, tamaño promedio de partículas, y análisis elemental del producto . Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1.

Propiedades	Valor medio ± Desviación estándar
Desacetilación	81 ± 3 % (n=4) base seca
Tamaño promedio	2145 µm
Peso molecular	1.180.000
Viscosidad 1%	400 ± 20 mPas (n=3)
Humedad	10,5 ± 1,0 % (n=4)
Análisis elemental	C:40,32% H:6,92% N:7,29%

Tabla 1. Características del quitosano empleado

Método para establecer la relación óptima entre quitosano y alginato

La relación óptima entre ambos polímeros, para lograr una formación adecuada del complejo interpolimérico, se determinó mediante el método viscosimétrico descrito por Takayama ¹¹.

Se prepararon dos soluciones de quitosano al 0,2%, una a pH 4 y otra a pH 5, y dos de alginato de sodio también al 0,2% y a los mismos valores de pH, los que fueron obtenidos con tampones de ácido acético/acetato de sodio. Se tomaron distintas alícuotas de estas soluciones (2-12 mL) a un mismo pH, y se mezclaron en tubos de ensayo a un volumen final de 20 mL. Las distintas mezclas fueron incubadas en estufa (Memmert tipo V10) a 37 °C por dos días. Los tubos fueron luego centrifugados a 15.000 rpm (centrífuga Sorvall RC53) durante 20 minutos. Finalmente se midió la viscosidad del sobrenadante a 25 °C mediante un viscosímetro tipo Ubbelohde.

Manufactura de las tabletas

Se prepararon seis formulaciones cuya composición porcentual se muestra en la Tabla 2.

Componentes	A %	B %	C %	D %	E %	F %
Indometacina	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3
Lactosa	81,7	71,7	61,7	81,7	71,7	61,7
Quitosano	10,0	20,0	30,0	4,0	8,0	12,0
Alginato-	-	-	-	6,0	12,0	18,0

Tabla 2. Composición porcentual de las formulaciones estudiadas.

Se procedió a mezclar los polvos en un mezclador de cubo (Erweka AR400) durante 15 minutos a 18 rpm. Posteriormente, se elaboraron las tabletas en una tableteadora de tipo excéntrica (Wilhelm Fette tipo E II N° 270), operando el llenado y la compactación en forma manual. La presión de compactación se reguló de tal modo que la dureza de la tableta resultante no fuera inferior a 7 Kg (durómetro, Erweka TBT-S). Las características físicas de las tabletas resultantes se presentan en la Tabla 3.

Formulaciones	Peso (mg)	Dureza (Kg)	Espesor (mm)	Diámetro (mm)
A (Q10%)	303,3 ± 2,9	9,0 ± 0,5	2,0 ± 0,1	12,2 ± 0,0
B (Q20%)	297,5 ± 2,0	11,0 ± 0,5	2,1 ± 0,1	12,2 ± 0,0
C (Q30%)	304,0 ± 4,3	13,0 ± 1,0	2,2 ± 0,0	12,2 ± 0,0
D (Q/A10%)	301,4 ± 3,0	9,0 ± 1,0	2,1 ± 0,1	12,2 ± 0,0
E (Q/A20%)	302,4 ± 2,5	8,0 ± 1,0	2,2 ± 0,1	12,3 ± 0,0
F (Q/A30%)	307,8 ± 6,5	7,0 ± 0,5	2,2 ± 0,1	12,2 ± 0,1

Tabla 3. Características físicas de las tabletas.

Ensayos de disolución

Los ensayos de disolución se realizaron en el equipo de la USP XXI (Hanson Research Mod. 6420), utilizando el método de la paleta (Método 2), empleando diferentes velocidades de agitación (50 y 100 rpm) y temperaturas (33, 37 y 43 °C). Con el objeto de activar las matrices (hinchamiento), las tabletas fueron sumergidas previamente en 400 mL de una solución 0,1 M de ácido clorhídrico en un baño termostático (Haake 001-3603) a 37 °C durante 1 hora. Luego fueron trasladadas al medio de disolución, consistente en 900 mL de una solución de acetato de sodio de 13 g/L, cuyo pH fluctuó entre 7,4 y 7,6 durante el experimento. Se realizó muestreo con reposición. Se tomó una alícuota de 5 mL cada media hora o una hora por un período de 5 u 8 h, respectivamente, según la experiencia. La alícuota fue filtrada mediante papel Whatman N°32 y analizada al UV en un espectrofotómetro UV-VIS (Hitachi-Perkin Elmer Mod. 139). La cuantificación de la indometacina se realizó interpolando la lectura de la absorbancia en una curva de calibración a 318 nm (USP XXI) ¹⁸. La curva de calibración obtenida para indometacina fue la siguiente:

$$A = 0,0182xC + 0,0192; n = 6; r = 0,9998; (0-32 \text{ ppm})$$

Todas las experiencias se hicieron por triplicado y los valores medios se expresaron mediante curvas de porcentaje de droga disuelta en función del tiempo. El 100% de droga disuelta correspondió a la cantidad máxima de droga disuelta en una cinética realizada con una formulación blanco que contenía 8,3% de indometacina y 91,7% de lactosa.

Modelos difusionales y termodinámicos

Los datos se ajustaron al modelo difusional de Peppas ¹², realizándose los cálculos de los parámetros termodinámicos de activación por medio de la ecuación de Eyring ¹⁹, que relaciona el logaritmo natural de la constante de la velocidad de disolución ($\ln k$), y el recíproco de la temperatura absoluta ($1/T$). De su pendiente se obtuvo la entalpía de activación y con el intercepto en el eje de las ordenadas se calculó la entropía de activación, para finalmente obtener la energía libre de Gibbs para la activación.

RESULTADOS Y DISCUSION

Propiedades físicas de las tabletas

En las tabletas cuya formulación contenía sólo quitosano (Q), la dureza fue mayor a medida que la proporción de éste iba aumentando (Tabla 3). Lo que está de acuerdo con lo descrito por Acatürk ¹⁰ y Sawayanagi ²⁰. Por otra parte, en las tabletas que contenían quitosano y alginato de sodio (Q/A) la dureza disminuyó al aumentar la proporción de alginato en la mezcla de polímeros. Lo anterior obligó a aumentar la presión de compactación con el propósito de conseguir durezas aceptables.

Determinación de la relación óptima entre quitosano y alginato de sodio

La Figura 1 muestra la viscosidad relativa del sobrenadante de las mezclas de soluciones de quitosano y alginato de sodio a pH 4 y 5, en función de la fracción en peso de quitosano en la mezcla quitosano alginato. Cuando ésta fue de 40%, la viscosidad del sobrenadante fue prácticamente la misma que para el solvente puro. Esto indica que a esta proporción ocurre la mayor formación de complejo insoluble entre quitosano y alginato. Así, la relación óptima en peso entre quitosano y alginato es de 40:60 % en peso.

Perfiles de disolución de las diferentes formulaciones

En la Figura 2 se muestran los perfiles de disolución de las formulaciones B,C,D,E y F. La formulación A (Q10%) no aparece puesto que las tabletas se desintegran a la media hora de iniciado el test de disolución. De la figura se observa que el mayor poder retardante se obtiene con la formulación F (Q/A30%), 19% de indometacina disuelta al cabo de 8 horas, y el menor con la formulación B (Q20%), 50% de indometacina disuelta al cabo de 8 horas. En general se observa un mayor poder retardante con las formulaciones que contienen Q/A que las que contienen sólo quitosano (Q), a una menor proporción de polímero en la formulación. Una explicación de este hecho sería que la mezcla Q/A es capaz de gelificar a un bajo porcentaje en peso en la formulación, lo que aumenta considerablemen-

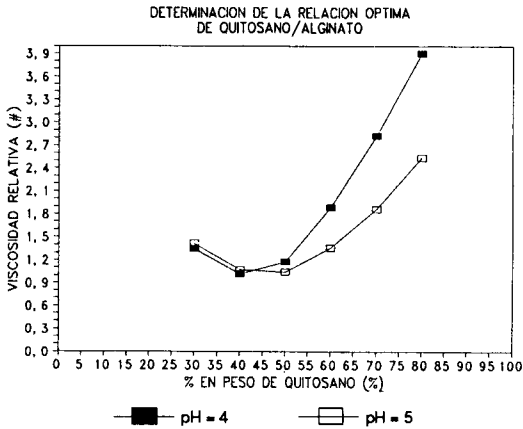


Figura 1. Viscosidad de la solución sobrenadante del sistema quitosano/alginato, como una función de la razón de la mezcla de polímeros.

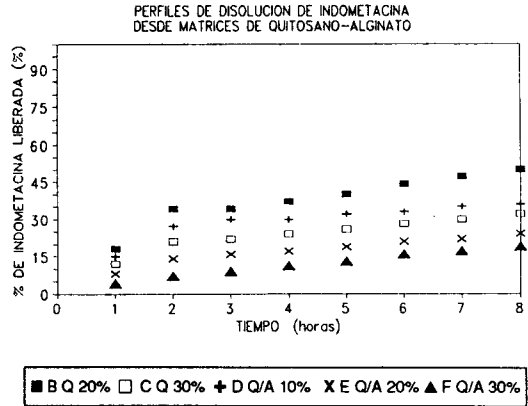


Figura 2. Perfiles de disolución de las formulaciones B, C, D, E y F.

te la viscosidad de la matriz hidrofílica y retarda en mayor medida la difusión de la droga. En cambio, en las formulaciones que contienen sólo quitosano, la matriz se solubiliza parcialmente, disminuyendo su viscosidad, con lo cual el poder retardante en la liberación de droga disminuye. En todas las formulaciones se observa que la velocidad de liberación de la droga disminuye a medida que aumenta la proporción de polímero en la formulación. Este hecho se explicaría porque la viscosidad de la capa de difusión es función directa de la concentración del polímero y, a su vez, la velocidad de difusión de la droga es función inversa de la viscosidad.

Aplicación del modelo difusional de Peppas

De acuerdo a Peppas ¹² los datos de liberación de droga desde matrices poliméricas pueden analizarse de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \times t^n \quad (\text{para } \frac{M_t}{M_\infty} < 0,60)$$

donde M_t/M_∞ es la fracción de droga liberada, t es el tiempo de liberación, k es una constante que incorpora características estructurales y geométricas de la matriz hidrofílica y n es el exponente de liberación de droga indicativo del mecanismo de liberación.

Al aplicar la forma logarítmica de esta ecuación a los datos de liberación obtenidos para las formulaciones B, C, D, E y F durante las primeras 4 horas de disolución, se obtuvieron las siguientes correlaciones que se muestran en la Tabla 4.

En la Figura 3 se muestran los perfiles de disolución de las formulaciones B y C, y en la Figura 4 los perfiles de disolución de las formulaciones D, E, y F aplicando el modelo difusional de Peppas. Además, en estas figuras se representan las respectivas rectas de ajuste.

Las formulaciones B y C presentan un exponente de liberación (n) muy cercano a 0,5, indicativo de un mecanismo de difusión fickiana.

Formulaciones	Exponente de liberación (n)	Coefficiente de regresión (r)	Período de tiempo (horas)
B (Q 20%)	0,512	0,9206	1 - 4
C (Q 30%)	0,496	0,9475	1 - 4
D (Q/A 10%)	0,518	0,9355	1 - 4
E (Q/A 20%)	0,554	0,9670	1 - 4
F (Q/A 30%)	0,727	0,9983	1 - 4

Tabla 4. Datos de disolución de las diferentes formulaciones ajustados al modelo difusional de Peppas.

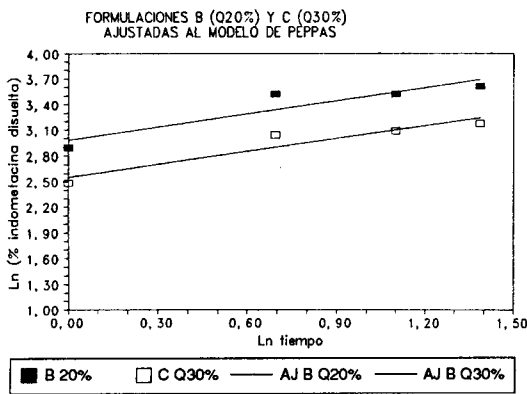


Figura 3. Formulaciones B (Q20%) y C (Q30%) ajustadas al modelo difusional de Peppas.

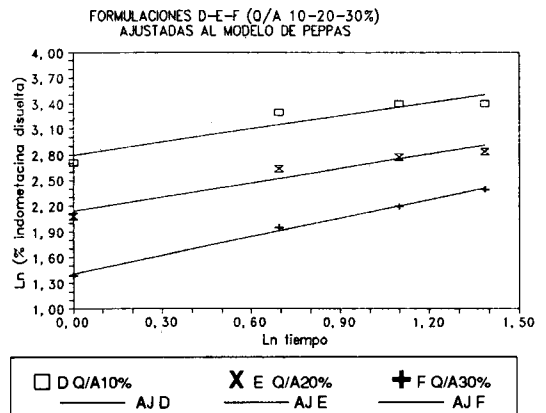


Figura 4. Formulaciones D (Q/A 10%), E (Q/A 20%) y F (Q/A 30%) ajustadas al modelo difusional de Peppas.

En el caso de las formulaciones con la mezcla Q/A se observan dos tipos de comportamiento; para la formulación D, que representa el menor porcentaje de polímero se observa un valor de n cercano a 0,5, lo que indica un comportamiento difusional de tipo fickiano; para las formulaciones E y F el valor de n es mayor que 0,5, lo que indica, de acuerdo a Peppas, que el mecanismo de liberación de droga desde la matriz es de tipo difusional no fickiano o anómalo.

Efecto de la velocidad de agitación sobre la liberación de droga

Para estudiar este efecto se eligió una formulación de cada tipo: formulación C y formulación D. Como se observa en la Figura 5, en ambas formulaciones al aumentar la velocidad de agitación de 50 a 100 rpm, aumenta significativamente el % de droga disuelta ($p = 0,05$), pero este efecto es más significativo para la formulación C que para la formulación D ($p = 0,05$). Esto se explicaría porque en la formulación C la matriz hidrofílica se va desgastando por efecto de la agitación, es decir, es una matriz erosionable. En cambio en la formulación D la matriz hidrofílica es un complejo interpolimérico, menos sensible al efecto erosivo producido por el aumento de la velocidad de agitación.

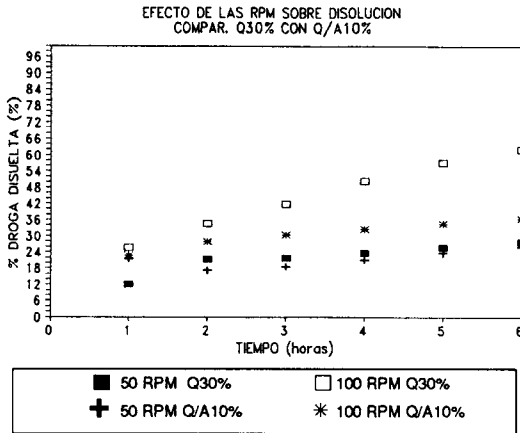


Figura 5. Perfiles de disolución de las formulaciones C y D a 50 y 100 RPM.

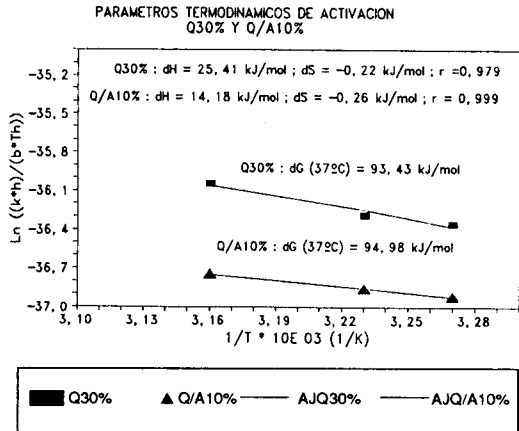


Figura 6. Curvas obtenidas al aplicar la ecuación de Eyring a las constantes de velocidad de disolución de las formulaciones C y D.

Cálculo de los parámetros termodinámicos de activación

Con el fin de caracterizar termodinámicamente ambos tipos de formulaciones (C y D), se calcularon los parámetros termodinámicos de activación dH, dS y dG mediante datos obtenidos de cinéticas de disolución realizados a diferentes temperaturas.

Para obtener estos parámetros se utilizó la ecuación de Arrhenius, la cual relaciona empíricamente a las constantes de velocidad de disolución, k, con la temperatura absoluta. Usualmente, la ecuación de Arrhenius es escrita de la forma:

$$k = A \times e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad \text{o} \quad \ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT}$$

donde E_a es la energía de activación y expresa la dependencia de la constante de velocidad con la temperatura. El factor preexponencial de Arrhenius, A es la constante de velocidad cuando la temperatura tiende a infinito o en ausencia de energía de activación.

Un tratamiento termodinámico de las velocidades de reacción puede ser utilizado para relacionar las ecuaciones anteriores con otras ecuaciones que tienen su origen en la teoría del estado de transición, quedando expresadas como:

$$E_a = dH + nRT$$

donde n es la molecularidad del orden de la reacción y dH es la entalpía de activación. En forma similar, el factor preexponencial A puede ser relacionado con otro parámetro de activación, la entropía de activación, o dS.

Siguiendo el procedimiento descrito por Maskill¹⁹ se calcularon los parámetros termodinámicos de activación para las formulaciones C y D, empleando la ecuación de Eyring.

$$\ln \left(\frac{kxh}{bxT_h} \right) = \frac{dS}{R} - \frac{dH}{R} \times \frac{1}{T}$$

donde: K = constante de la velocidad de disolución; h = constante de Planck; b = constante de Boltzmann; R = constante universal de los gases; T_b = temperatura absoluta media armónica; T = temperatura absoluta.

En la Tabla 5 se muestran las constantes de velocidad de disolución obtenidas para las formulaciones C (Q30%) y D (Q/A 10%) a 33 °C, 37 °C y 43 °C.

Formulaciones	k (%/s) x 10 ⁴	t °C	r	n	Tiempo de disolución (h)
C (Q 30%)	10,51	33	0,9607	10	0,5 - 5
	11,25	37	0,9948	10	0,5 - 5
	14,31	43	0,9878	10	0,5 - 5
D (Q/A 10%)	5,96	33	0,9939	10	0,5 - 5
	6,36	37	0,9970	10	0,5 - 5
	7,10	43	0,9956	10	0,5 - 5

Tabla 5. Constantes de velocidad de disolución para las formulaciones C (Q30%) y D (Q/A 10%) a diferentes temperaturas.

Como se observa en la Tabla 5, las constantes de velocidad de disolución para la formulación C son significativamente mayores que para la formulación D, lo cual indica que el proceso de liberación de droga está más favorecido en la formulación C que en la formulación D. Además, dado los significativos coeficientes de regresión obtenidos para ambas formulaciones a distintas temperaturas, indica que habrá una adecuada estimación de los parámetros de activación a partir de estas constantes de velocidad.

En la Figura 6 se muestra la representación gráfica de la ecuación de Eyring que permite calcular los parámetros termodinámicos de activación. Para ambas formulaciones el valor de dG es similar en magnitud e indicativo de un proceso desfavorable, lo que está de acuerdo con un proceso de liberación prolongada. El parámetro entrópico para ambas formulaciones es similar. Por otra parte, en los resultados se aprecia que la barrera entálpica para la formulación C es mayor que la correspondiente a la formulación D. Esto podría deberse al hecho de que en esta última existe un dH de reacción entre quitosano y alginato que es espontáneo, de signo negativo, lo que haría que el dH total para el proceso de disolución de la formulación D resulte menor.

CONCLUSIONES

Las formulaciones con quitosano muestran un menor poder retardante en la liberación de droga que las formulaciones que tiene la mezcla quitosano-algianto, a igual proporción en peso en la formulación. Ambas formulaciones correlacionan significativamente con el modelo de Peppas. Las formulaciones con quitosano (B

y C) presentan un mecanismo de liberación de drogas del tipo difusional fickiano. En cambio, las formulaciones con quitosano-alginato (D,E y F) presentan dos tipos de comportamiento. En la formulación D la difusión es fickiana y en las formulaciones E y F el mecanismo de liberación difusional es anómalo o no fickiano. El efecto del aumento de la velocidad de agitación fue más significativo en la formulación C (Q30%) que en la formulación D (Q/A 10%), lo cual indicaría que esta última es una matriz menos erosionable y menos sensible al efecto de la agitación externa. Los parámetros termodinámicos de activación para las formulaciones C y D muestran un dG similar en magnitud e indicativo de un proceso desfavorable, lo que está de acuerdo con un proceso de liberación prolongada.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Austin, P. (1988) "Chitin solutions and purification of chitin", en *"Methods in Enzymology"* (Wood, Willis, eds.), vol. 161, págs. 403-7
2. Shimahara, K. y Y. Takiguchi (1988) "Preparation of crustacean chitin", en *"Methods in Enzymology"* (Wood, Willis, eds.), vol. 161, págs. 417-23
3. Foster, A.B., J.M. Weber (1960) "Chitin", en *"Avances in carbohydrate chemistry"* (Wolfrom Melville L., ed.), vol. 15, págs. 371-93
4. Horton, D. y D.R. Lineback (1965) "N-deacetylation, chitosan from chitin", en *"Methods in carbohydrate chemistry"* (Whistler Roy L., ed.), vol. V, págs. 402-6
5. Davies, D. y E. Hayes (1988) "Determination of the degree of acetylation of chitin and chitosan", en *"Methods in Enzymology"* (Wood, Willis, eds.), vol. 161, págs. 442-6
6. Breimer, D.D. y D. Crommelin (1989) *"Topics in Pharmaceutical Sciences"*, Elsevier, págs. 211-21
7. Muzzarelli, R.A.A. (1977) *"Chitin"*, Pergamon Press, Oxford
8. Kawashima, Y., S. Lin, A. Kasai, T. Handa y H. Takenaba (1985) *Chem. Pharm. Bull.* **33**: 2107-13
9. Acatürk, F. (1989) *Pharmazie* **44**: 547-9
10. Nigalaye, A., P. Adsumilli y S. Bolton (1990) *Drug. Dev. & Ind. Pharm.* **16**: 449-67
11. Takayama, K., M. Hirata, Y. Machida, T. Masada, T. Sannan y T. Nagai (1990) *Chem. Pharm. Bull.* **38**: 1993-7
12. Peppas, N. (1985) *Acta Helv.* **60**: 110-1
13. Buckton, G. y M. Efentakis (1990) *Int. J. Pharm.* **62**: 157-63
14. Wang, Z. (1986) *Huaxue Shijie* **27**: 22-3
15. Martin, A., J. Swarbrick y A. Cammarata (1983) *"Physical Pharmacy"*, 3rd. Ed., Lea & Febiger, Philadelphia, págs. 599-601
16. Roberts, G. y J. Domszy (1982) *Int. J. Biol. Macromol.* **4**: 374-7
17. *Catálogo Protan®. Biopolymers* (1988) Bulletin A, 10 1/1-10
18. *The United States Pharmacopeia* (1985) United States Pharmacopeial Convention, Inc. 21st. Revision, Rockville, USA, págs. 532-3
19. Maskill, H. (1990) *Education in Chemistry*. July. 111-4
20. Sawayanagi, Y., N. Nambu y T. Nagai (1982) *Chem. Pharm. Bull.* **30**: 2935-40