

Estudio de las variables más relevantes de un proceso de microencapsulación por coacervación utilizando un polímero derivado del ácido metacrílico

Liliana Martín, Angélica Vargas

Helber Barbosa*

Fleming Martínez*¹

Resumen

Se presenta un estudio de las variables que afectan las metodologías de microencapsulación por coacervación, empleando como núcleo el Curan 27 11-P (polímero de lignina), seleccionado como trazador para una proteína bioinsecticida. Se escogió como material de recubrimiento un polímero pH dependiente (copolímero del ácido metacrílico: Eudragit® S 100), teniendo en cuenta su estabilidad en el ambiente y que permite la liberación de la proteína en el intestino del insecto. La estrategia de coacervación consistió en la adición de n-hexano (no-solvente para el Eudragit® S 100) sobre las dispersiones de este polímero en acetona. Se recomiendan los valores: concentración de polímero entre 0.5 y 0.75 % p/v, relación solvente/no-solvente de 1/1 y tiempo de adición del no-solvente entre 20 y 30 minutos.

Palabras clave: Coacervación – Microencapsulación – Polímeros del ácido metacrílico – Adición de no-solvente – Bioinsecticidas.

Summary

Study of relevant variables on a microencapsulation process by coacervation with a metacrylic polymer

Here a complete study of relevant variables affecting the microencapsulation processes, based on coacervation, is presented using as nucleus a lignine polymer (Curan 27 11-P) selected as tracer for a protein bioinsecticide. As a coating material a pH dependent polymer (copolymer of the metacrylic acid: Eudragit® S 100) was selected based on its

Recibido para evaluación: Octubre de 2001

Aceptado para publicación: Octubre de 2002

* Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Bogotá, D. C., Colombia.

1 E-mail: fmartine@ciencias.unal.edu.co

atmosphere stability and requirements for liberation in the insect's intestine. The selected coacervation strategy was the n-hexane addition (non-solvent for Eudragit® S 100) on dispersions of this polymer in acetone. Concentration of the polymer is recommended among 0.5 and 0.75 % w/v, solvent/non-solvent ratio of 1/1, and time of addition of the non-solvent between 20 and 30 minutes.

Key words: Coacervation – Microencapsulation – Metacrylic acid polymers – Addition of non-solvent – Bioinsecticides.

Introducción

La microencapsulación es un procedimiento para recubrir partículas con una capa delgada y uniforme del material de recubrimiento. La coacervación se define como el fenómeno en el que soluciones de macromoléculas se separan en dos fases líquidas que coexisten; siendo una fase solvente puro prácticamente y la otra, una capa rica en agregados coloidales, que es conocida como coacervado (1, 2). En general, el proceso de microencapsulación por coacervación consta de tres etapas: *a.* formación de una nueva fase con alta concentración de material de recubrimiento (coacervado), que se agrega a las existentes (núcleo y solución del polímero); *b.* depósito del material de la pared, como una cubierta continua sobre el material a ser cubierto; y *c.* endurecimiento de la cubierta (3).

La coacervación propiamente dicha ocurre cuando una condición externa o adicional al sistema (cambio de temperatura, adición de sales o de polímeros incompatibles con la solución del polímero) ocasiona que en la fase continua (en la cual está disperso el núcleo de coacervación) aparezca una nueva fase; contando con tres fases dentro del sistema: una solución de polímero de alta concentración que es llamada coacervado, en equilibrio con el solvente puro o con una solución de muy baja concentración del polímero, y el núcleo de coacervación (2, 4, 5).

Las estrategias seleccionadas para inducir la coacervación dependen principalmente de la naturaleza fisicoquímica del polímero

seleccionado y del núcleo a recubrir. Por lo tanto se deben estudiar las características de las entidades químicas a participar en el proceso, para proponer los mecanismos de alteración en el sistema que promuevan la separación de fases. Esto implica conocer las proporciones más adecuadas de los constituyentes del sistema con el fin de seleccionar la concentración óptima de la sustancia causante de la separación de fases.

En la adición de un no-solvente, inicialmente se tiene el polímero de recubrimiento en solución y el núcleo se mantiene disperso por agitación. Posteriormente se adiciona un segundo solvente orgánico, o una mezcla de solventes, miscible con el primer solvente orgánico, pero que actúa como no-solvente para el polímero; de esta forma, debido a un descenso en su solubilidad en el nuevo sistema de solventes, el material de la pared forma una película alrededor del núcleo. Algunos factores tales como la velocidad de agitación, la subsiguiente dispersión de la fase rica en polímero y la velocidad de adición del no-solvente deben ser controlados para regular la porosidad y el espesor de la pared de la microcápsula (4).

En la presente investigación se exponen los diferentes criterios que fueron evaluados para seleccionar la técnica de microencapsulación como posible vía para el desarrollo de una formulación bioinsecticida a base de la cepa nativa de *Bacillus thuringiensis* (Bt) IBUN 28.5, indicada para el control de la *Spodoptera frugiperda*. El material de recubrimiento debe ofrecer protección, liberar el principio activo una vez sea

ingerido por el insecto, además debe incrementar su permanencia en el ambiente para garantizar el control de la plaga (1). Es importante que el principio activo se libere únicamente después de ser ingerido por la larva cuyo pH intestinal se encuentra entre 8 y 10. Fue necesario emplear un polímero insoluble a valores de pH menores de 8.0 y que solubilice por encima de este valor. Generalmente al realizar la dispersión de los insecticidas, previo a su aspersión en los cultivos, se emplea agua como vehículo, circunstancia que incidiría en la estabilidad de la proteína si el polímero que la recubre es soluble en este medio (1). En este trabajo, se realizó un estudio de las variables involucradas en la metodología de coacervación por adición de un no-solvente. Las variables que se tuvieron en cuenta fueron:

Relación solvente/no-solvente: Determina el cambio de la solubilidad del polímero durante el proceso, incide en las tensiones interfaciales y en las características del coacervado. De la afinidad del polímero por la pareja de solventes depende la conformación que adopte el polímero en el medio y ésta incide directamente en las características del coacervado y de la microcápsula formada (6). Los aspectos teóricos relativos a la solubilidad de polímeros en diferentes medios solventes han sido ampliamente descritos en la literatura (2, 7).

Porcentaje de polímero: Relacionado con la posibilidad de separación de fases y la formación de una película capaz de depositarse sobre el núcleo. Porcentajes altos de polímero pueden ocasionar la aglomeración (núcleo y/o polímero), mientras que porcentajes bajos pueden causar que la fase no sea lo suficientemente rica en polímero como para recubrir al núcleo.

Periodo de adición del no-solvente: Relacionado con la velocidad de desolvatación del polímero, lo cual afecta las propiedades de la nueva fase formada (7).

Velocidad de agitación: Permite que el núcleo permanezca suspendido y además uniformizar adecuadamente el sistema.

Tipo de agitación: En su elección es necesario considerar los volúmenes de los solventes y la concentración del polímero que establecen la viscosidad del medio.

Tamaño del núcleo: En la mayoría de las técnicas de microencapsulación son usados núcleos mayores de 100 μm . Para núcleos menores se elaboran premezclas del núcleo y otros excipientes previas a la microencapsulación.

Relación núcleo-polímero: Según la literatura, la concentración de polímero necesaria para microencapsulación es específica para cada núcleo en particular (6).

Temperatura: El carácter lábil de la proteína condiciona los ensayos a temperatura ambiente, aproximadamente de 18°C, para evitar la degradación del complejo proteico.

Tiempo de agitación después de la adición: Permite la adecuada homogenización del sistema.

Los requisitos del núcleo de microencapsulación para este estudio fueron: tener carácter orgánico, sufrir degradación fácilmente observable al contacto con el agua, tamaño de partícula similar al de la proteína, no reaccionar con el polímero o con los solventes del medio, ser insoluble en el medio y tener un color que produzca contraste con el polímero de recubrimiento. El núcleo seleccionado fue el Curan 27-11 P, polímero de lignina de color café, insoluble en acetona y n-hexano. El tamaño de partícula fue seleccionado mediante tamizado utilizando valores entre 56 y 63 μm . Debido a su solubilidad en agua, el material puede indicar cuando el complejo proteico está en contacto con un medio acuoso.

Metodología

Materiales

Eudragit® S 100; Curan 27-11 P; Carbonato de Potasio R.A., Acetona R.A., Ciclohexano R.A., n-Hexano R.A. Merck; Poli(acrilamida); Dodecilsulfato de Sodio R.A. Merck; Buffer de TRIS MBA y Buffer de Fosfatos (Electroforesis); balón de fondo redondo de tres bocas de 25 mL y embudo de adición.

Equipos

Placa calefactora con agitación magnética, CEIF Modelo 400-1; Agitador magnético en barra; Balanza analítica Mettler tipo H 15; Cámara fotográfica Leitz Wetzlar nr513629. Microsix-l objetivo 10 x 45. Alemania. Microscopio, Spencer Buffalo USA, No 172193, Lente: Ernst 10x, Objetivo: Spencer lens Co., Buffalo n:y:4 mm-na: 0.66-44x; Tamices, Malla: 45, 56, 63, 100, 250, 315, 400 μm .

Selección del material de recubrimiento

Se prepararon soluciones buffer de fosfatos pH 1.9, buffer de acetato pH 4.9, buffer ácido cítrico/ Na_2HPO_4 pH 7.2, buffer $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ pH 9.5 y buffer $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ pH 10.6. Posteriormente se pesaron 0.15 g de los polímeros, los cuales se adicionaron a tubos de ensayo que contenían 5 mL de las diferentes soluciones buffer. Se observó el comportamiento de dispersión en los medios líquidos a tiempos: 0, 2 y 24 horas.

Selección de pareja solvente/no-solvente

Se prepararon soluciones del polímero considerado en cada uno de los solventes seleccionados y

se adicionó el no-solvente por goteo hasta que se presentó un cambio apreciable en el aspecto macroscópico del sistema.

Ensayos de microencapsulación

A partir de los factores considerados como relevantes en el proceso, se diseñaron ensayos en los que se combinaron estas variables en diferentes niveles. El valor para cada variable fue el resultado de ajustes realizados en ensayos preliminares (1). En un balón seco de 25 mL se pesó la cantidad de polímero prevista, se adicionó la cantidad de solvente estipulada y se inició agitación magnética hasta la disolución del polímero. Se puso en el balón la cantidad de núcleo de coacervación. El no-solvente contenido en el embudo de adición se dispensó a la mezcla en el período de adición fijado. Durante el proceso se mantuvo una velocidad de agitación constante de 180 r.p.m. Al finalizar el periodo de adición del no-solvente, se extrajo con pipeta una muestra para ser observada en el microscopio y la cantidad restante se agitó durante 30 minutos adicionales. Finalmente, se detuvo la agitación y se extrajo una segunda muestra para su observación y posterior registro fotográfico. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Resultados y discusión

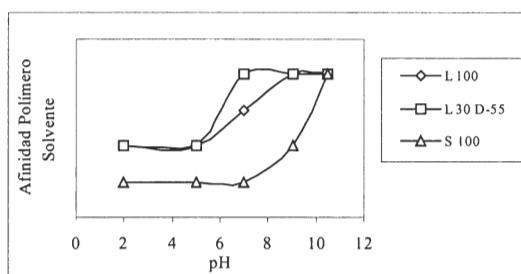
Selección del material de recubrimiento

Las respuestas obtenidas fueron clasificadas en una escala relativa de afinidad entre el polímero y el solvente, relacionada con los procesos de solubilización de los polímeros. Esta clasificación permitió seleccionar los polímeros más prometedores de acuerdo al objetivo propuesto (Tabla 1):

Tabla 1. Clasificación de las respuestas de solubilidad de los polímeros.

Afinidad:	Cambios macroscópicos:
Baja (b)	No hay cambio visible, hinchamiento
Media (m)	Hinchamiento, dos fases que se resuspenden con agitación
Alta (a)	Hinchamiento, apariencia de nubes, deformadas por agitación.
Máxima (M)	Disolución inmediata

La Figura 1 ilustra la afinidad entre el solvente y los polímeros derivados del ácido metacrílico. De los tres derivados el Eudragit® S 100 es el que presenta el mejor comportamiento; es usado en el recubrimiento de formas farmacéuticas de liberación gastrointestinal, su comportamiento es dependiente de la ionización de los grupos carboxílicos libres (2, 9). Los bioensayos realizados con larvas de primer instar de *Spodoptera frugiperda* comprobaron que los materiales utilizados como excipientes en la formulación del biopesticida no son tóxicos para el insecto blanco (1).


Figura 1. Afinidad de los polímeros derivados del ácido metacrílico.

Selección de parejas solvente/no-solvente

El propósito de estos ensayos fue evaluar estrategias para inducir la separación de fases en soluciones de Eudragit® S 100 y de acuerdo con

las características de las fases formadas, seleccionar las más prometedoras para formar las microcápsulas por coacervación. Se realizaron ensayos de posibles parejas solvente/no-solvente que debían ser miscibles, por lo tanto, se realizaron pruebas de miscibilidad para cada par de sustancias: etanol/agua, isopropanol/agua, isopropanol/ciclohexano, cloroformo/n-hexano y acetona/n-hexano. A causa de las características de labilidad de la proteína, la pareja seleccionada no podía ser acuosa. La combinación, acetona como solvente y n-hexano como no-solvente, exhibió fenómenos de separación de fases.

Concentraciones de polímero y relaciones solvente/no-solvente

Con el propósito de observar las cualidades de las fases de coacervado formado en el par acetona/n-hexano y la factibilidad de su implementación en la metodología de microencapsulación de la proteína de *Bacillus thuringiensis*, se diseñó un ensayo con dos variables: la relación solvente/no-solvente y el porcentaje de polímero en el sistema (Tabla 2).

El resultado de este ensayo permitió estimar las posibilidades de recubrimiento a partir de la observación de la apariencia de la nueva fase formada después de la adición del no-solvente.

En los ensayos 1 y 2 se observó la formación de la fase de coacervado, líquida y fluida, al

Tabla 2. Diseño experimental para seleccionar la relación acetona/n-hexano y el porcentaje de polímero.

Ensayo	1	2	3	4
Relación S/N-S ^(a)	1/1	1/2	1/3	1/4
Polímero/%	1.6	2.0	1.6	1.6
p/v ^(b)	3.2	4.0	3.2	3.2
	4.8	5.9	4.8	4.8
	6.4	7.9	6.4	6.4

(a) S / N-S: Relación volumétrica solvente/no-solvente.

(b) Estos valores fueron restringidos por la viscosidad de las soluciones.

parecer con una concentración alta de polímero. En los ensayos 3 y 4 sólo se obtuvo polímero fuertemente desolvatado en las paredes del tubo (La comparación realizada de las fases de coacervado se enfocó hacia las características de rigidez y extensión de la fase). Las relaciones solvente/no-solvente 1/1 y 1/2 presentaron la formación de un coacervado cuyas propiedades posiblemente permitirían el recubrimiento del núcleo seleccionado. En los procesos de purificación de la proteína de *Bacillus thuringiensis* se emplea la coprecipitación con lactosa y adición de acetona, es decir que el complejo es insoluble y no se ve afectado por este solvente (10).

Ensayos de microencapsulación

Las variables seleccionadas para el diseño experimental fueron, el porcentaje de polímero, que debía ser menor del 1 % p/v, por lo que se establecieron valores de 0.25, 0.50 y 0.75 % p/v respecto al volumen de acetona; en segundo lugar, la relación solvente/no-solvente, establecida en relaciones 1/1, 1/2 y 2/1, y adicionalmente, el periodo de adición del no-solvente: ensayado en tiempos de 10, 20 y 30 minutos (Tabla 3).

Se fijaron algunos de los factores, como el volumen del reactor: un balón de 25 mL; agitación magnética: con un agitador de barra de 32 mm; el volumen total del sistema al finalizar la adición de no-solvente: 25 mL; la relación núcleo a polímero: 2 a 3; la velocidad de agitación: 180 r.p.m.; el tiempo de agitación posterior a la adición del no-solvente: 30 min.; la temperatura: aproximadamente 18°C (ambiente) y el tamaño del núcleo en un intervalo entre 56 y 63 µm de diámetro.

La evaluación de la respuesta se hizo de forma cualitativa, mediante la observación en un microscopio. Puesto que el resultado a medir era de carácter cualitativo fue necesario trabajar en todas las combinaciones de variables, para obtener resultados que permitieran reconocer algunas tendencias en el comportamiento del sistema estadísticamente significativas. Se consideraron los siguientes puntos:

No observable: sólo se observan núcleos de Curan 27-11 P aislados y no se observa polímero presente.

Deposición: Curan 27-11 P con depósitos de Eudragit® alrededor, su apariencia semeja una membrana traslúcida que es diferenciable de la superficie del núcleo; de acuerdo a las características de las membranas formadas, se clasificaron en “deposición irregular” y “deposición regular”.

Precipitados: el polímero se encuentra formando redes. En su interior puede verse partículas de núcleo, sin que esto implique una verdadera deposición. De acuerdo al espesor de los hilos que forman las redes, fueron clasificados en “precipitados gruesos” y “precipitados finos”.

Tabla 3. Resultados del diseño experimental de los ensayos de microencapsulación.

Ensayo	S/N-S ^(a)	Polímero/ % p/v ^(b)	Tiempo de adición/ min.	Características del Eudragit® S 100
1	1 a 1	0.25	10	No observable
2			20	No observable
3			30	Deposición (irregular)
4		0.5	10	Deposición (irregular)
5			20	Deposición (regular)
6			30	Deposición (regular)
7		0.75	10	No observable
8			20	Deposición (irregular)
9			30	Deposición (irregular)
10	1 a 2	0.25	10	Precipitado (grueso)
11			20	Precipitado (fino)
12			30	Precipitado (fino)
13		0.5	10	Agregados
14			20	Agregados + Precipitado (fino)
15			30	Agregados + Precipitado (fino)
16		0.75	10	Agregados
17			20	Agregados + Precipitado (grueso)
18			30	Precipitado (fino)
19	2 a 1	0.25	10	No observable
20			20	No observable
21			30	No observable
22		0.5	10	No observable
23			20	Deposición (irregular)
24			30	Deposición (irregular)
25		0.75	10	Agregados
26			20	Deposición (irregular)
27			30	Deposición (irregular)

(a) S/N-S: Relación solvente/no-solvente.

(b) Porcentaje de polímero en el solvente acetona.

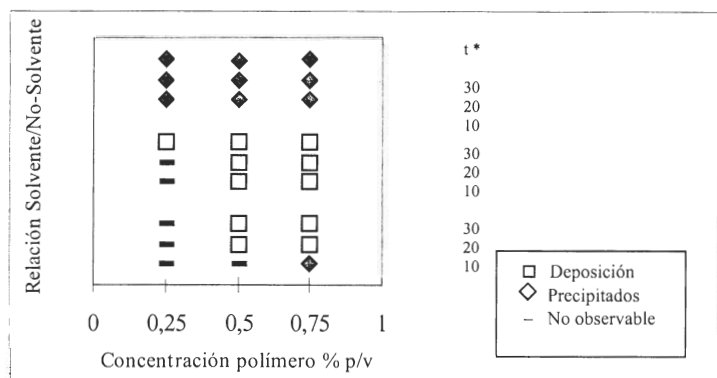


Figura 2. Resultados de los ensayos de microencapsulación (* t: tiempo de adición del no-solvente en min.).

Agregados: polímero precipitado que se encuentra concentrado en una zona. En el microscopio es posible observar formas redondeadas. Igualmente se observan partículas de núcleo en su interior, sin que ello signifique que hay una deposición efectiva.

Respuesta combinada: se observa la presencia de agregados y de precipitados ya sean finos o gruesos.

Con el propósito de tener una visión general de los experimentos se construyó la Figura 2, en la que se resumen las respuestas en tres grupos: no observable, precipitados y deposición.

Al parecer las tres variables estudiadas inciden en la coacervación del polímero y en las características de su deposición. Probablemente las respuestas se deben a la acción combinada de los tres factores considerados en los niveles seleccionados.

En la categoría “no observable” se produjo una separación de fases en el sistema, ya que pasó de una solución clara a un líquido turbio. Probablemente la nueva fase no fue lo suficientemente rica en polímero o no tuvo las condiciones de viscosidad y fluidez requeridas para que se depositara sobre el núcleo. Esto podría deberse a que la desolvatación del polímero no

fue suficiente. En casi todos los casos esta respuesta correspondió a la menor concentración de polímero y a la proporción de no-solvente más baja. Aparentemente en las respuestas clasificadas como “precipitados”, la solubilidad del polímero fue alterada drásticamente en el sistema. Este cambio pudo haber ocurrido por tratarse de una relación solvente/no-solvente desfavorable, que promueve su precipitación; o el periodo de adición del no-solvente fue muy corto, para permitir que el sistema se equilibrara.

La categoría de formación de precipitados se encuentra clasificada en precipitación fina y gruesa. La primera, se presenta en la relación solvente/no-solvente: 1/2 y en periodos de adición del no-solvente mayores de 20 minutos. Al parecer, el cambio que se produce en el sistema, promovido por la elevada cantidad de no-solvente adicionado, se redujo drásticamente con la fracción volumétrica de solvente. Posiblemente esta condición ocasiona que el polímero se precipite al adoptar una conformación recogida. La precipitación gruesa se produjo igualmente en la relación 1/2 de solvente/no-solvente y prevaleció con un tiempo de adición de 10 minutos. El cambio resultó ser muy fuerte, debido a la composición desfavorable de los solventes, originado en un corto periodo de tiempo a concentraciones altas de polímero. La combinación de estos factores se manifestó en un precipitado de mayores proporciones.

La categoría denominada “deposición” correspondió a las respuestas más prometedoras, implicando que la combinación de las condiciones fue favorable para la coacervación del polímero y propició su deposición sobre los núcleos. La respuesta clasificada como “deposi-

ción regular” se encontró únicamente cuando la relación de solvente/no-solvente fue 1/1 y el porcentaje de polímero fue 0.5% p/v. Al parecer, para que este tipo de resultado se presente, el periodo de adición del no-solvente debe encontrarse entre 20 y 30 minutos. Esto podría indicar que para estas condiciones, los factores de relación solvente/no-solvente y la concentración de polímero solo permiten valores muy específicos para que la deposición del polímero en una película regular pueda suceder. Aunque la influencia del tiempo de adición ha quedado demostrada, ya que es con tiempos mayores de 20 y 30 minutos donde hubo deposición, se trata de un factor que puede permitir mayores variaciones. La “deposición irregular” también es una respuesta promisoría, que se encontró en intervalos muy cercanos a los de la respuesta denominada “deposición regular”, éstos ensayos posiblemente requieren tan solo de ajustes mínimos en uno o más de los factores involucrados. De cualquier forma, los ensayos en los que se obtuvo cualquier tipo de deposición, deben ser tenidos en cuenta en la optimización de la metodología.

La consideración de estos factores tanto de forma aislada, como de manera conjunta parece confirmar que cada uno de los parámetros de trabajo en las metodologías de microencapsulación por coacervación es específico para cada tipo de polímero, de pareja de solventes y de núcleo. La multitud de factores que deben tenerse en cuenta en la microencapsulación por coacervación, así como la interconectividad de los diferentes elementos del proceso y el hecho de que hay cientos de variaciones para éste, hacen necesario continuar con el estudio de los factores y sus niveles, a fin de optimizar las condiciones y adicionalmente conocer la influencia específica de cada uno de ellos en particular.

Con el fin de observar algunas características de la deposición del polímero sobre los

núcleos de Curan 27-11 P, se tomaron microfotografías de los resultados del ensayo más promisorio obtenido durante el diseño experimental de microencapsulación, utilizando el microscopio electrónico de barrido del Departamento de Física de la Universidad Nacional de Colombia (Ensayo 6: Figura 3). En esta Figura se puede observar un núcleo de Curan 27-11 P con depósitos del material de recubrimiento a su alrededor, al parecer el recubrimiento es uniforme.

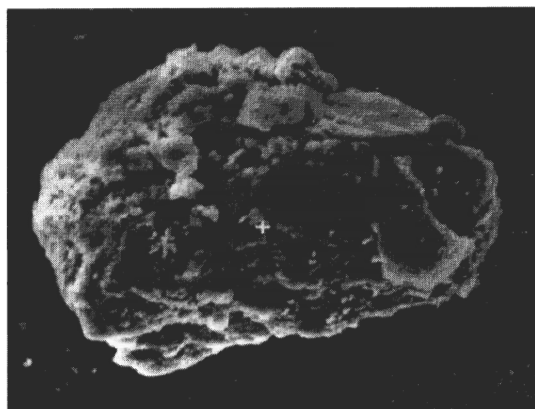


Figura 3. Microfotografía de barrido electrónico de un núcleo recubierto.

Los resultados presentados en este estudio permitieron demostrar la validez de los diferentes ensayos realizados a nivel de laboratorio, los cuales pueden resultar muy útiles para desarrollar metodologías de microencapsulación basadas en la coacervación utilizando el polímero y el trazador seleccionados. A partir de los datos obtenidos en este trabajo fue posible plantear una aproximación a los diferentes factores que conducen a la coacervación del polímero y muy posiblemente, también a la formación de microcápsulas de la proteína de interés bajo condiciones que pueden asegurar su estabilidad (1).

Agradecimientos

Agradecemos muy formalmente a Rhöm, Almapal de Colombia, Polímeros Farma Lignotech, y Cabarria y Cia., por la donación de los polímeros estudiados y a la Universidad Nacional de Colombia por facilitar los equipos e instalaciones utilizados en el desarrollo de esta investigación.

Bibliografía

1. Martín y A.M. Vargas, "Diseño de un prototipo de formulación de microcápsulas a base de *Bacillus thuringiensis* cepa nativa IBUN 28.5. Parte 1. Selección racional de un material de recubrimiento que se ajuste a las necesidades de la microencapsulación", Tesis de grado, Carrera de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., 1999.
2. A.N. Martin, J. Swarbrick y A. Cammarata, "Physical Pharmacy", 3rd Edition, Lea & Febiger, Philadelphia, 1983. Chapters 17, 22, pp 469-491, 592-637.
3. R. Phares, Jr. y G.J. Sperandio, Coating pharmaceutical by coacervation, *J. Pharm. Sci.*, **53**, 515 (1964).
4. L.A. Luzzi, Microencapsulation, *J. Pharm. Sci.*, **59**, 1367 (1970).
5. J.A. Bakan, Microencapsulation, En: "The Theory and Practice of Industrial Pharmacy", 3rd Edition, Ed. L. Lachman, H.A. Lieberman y J.L. Kanig, Lea & Febiger, 1986. Chapter 13, pp 412- 425.
6. M. Shivele y T. McNickle, The physico-chemical effect of coacervation conditions on the difussional properties and surface morphology of biodegradable microcapsules, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **17**, 843 (1991).
7. C. Thomasin, H. Nam-Trân, H.P. Merkle y B. Gander, Drug microencapsulation by PLA/PLGA coacervation in the light of thermodynamics. 1. Overview and theoretical considerations, *J. Pharm. Sci.*, **87**, 259 (1998).
8. I. Maharaj, J.G. Nairn y J.B. Campbell, Simple rapid method for the preparation of enteric-coated microspheres, *J. Pharm. Sci.*, **73**, 39 (1984).
9. A.T. Florence, "Materials Used in Pharmaceutical Formulation", Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1984, p 6.
10. H.G. Miltenburger y A. Krieg, "Advances in Biotechnological Processes", Ed. Alan R. Liss Inc., New York, 1984. Chapter 3, p 273.