

Evaluación y optimización simultánea de papaína inmovilizada en gránulos de alginato entrecruzado mediante un diseño factorial 3x3 y la función de deseabilidad

Evaluation and simultaneous optimization of papain entrapped in crosslinked alginate beads using 3³ factorial design and the desirability function

SANKALIA MG.[†], MASHRU RC.* , SANKALIA JM. AND SUTARIYA VB.

Center of relevance and excellence in NDDS, Pharmacy Department, G. H. Patel building, The M. S. University of Baroda, Vadodara – 390 002, Gujarat, India. Telephone: +91-265-2434187 / 2794051. Fax: +91-265-2418928.

[†]E-mail: sankalia_mayur@hotmail.com

* Author for correspondence.

RESUMEN

En este artículo se investiga el entrecruzamiento del alginato sódico con iones de calcio a través de la gelación ionotrópica para capturar la papaína mediante disolventes «benignos para el entorno». Se empleó un diseño factorial completo 3x3 para investigar el efecto de las tres variables del proceso, que son la concentración de alginato sódico, la concentración de cloruro cálcico y el tiempo de endurecimiento sobre el porcentaje de captura, el tiempo necesario para la liberación de un 50% (T_{50}) y un 90% (T_{90}) de la enzima, la distribución y el ángulo de reposo. Los gránulos se prepararon mediante el uso de un dispositivo de goteo para el vertido de gotas de solución de alginato sódico que contiene la enzima en la solución de cloruro cálcico agitada magnéticamente. Además, se empleó la función de deseabilidad para optimizar el proceso sometido a estudio. Se demostró que los valores óptimos de las respuestas se pueden obtener en los niveles inferiores de las tres variables del proceso. La caracterización topográfica se realizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y la captura se confirmó a través de una calorimetría diferencial de barrido (DSC). Se concluyó que la selección adecuada de concentración de alginato con control de la velocidad de liberación y su potencial interactivo para el entrecruzamiento es importante y determina el tamaño y la forma general de los gránulos, los perfiles de patrón de disolución y duración, la sensibilidad al pH y la capacidad de carga de la enzima.

PALABRAS CLAVE: Gránulos de alginato cálcico. Función de deseabilidad. Captura. Diseño factorial. Optimización. Papaína. Alginato sódico.

ABSTRACT

This paper investigates the crosslinking of sodium alginate with calcium ions through ionotropic gelation to entrap papain using “environmentally benign” solvents. A 3³ full factorial design was employed to investigate the effect of three process variables namely sodium alginate concentration, calcium chloride concentration and hardening time on % entrapment, time required for 50% (T_{50}) and 90% (T_{90}) of enzyme release, particle size and angle of repose. The beads were prepared by dropping the sodium alginate solution containing enzyme from dropping device to magnetically stirred calcium chloride solution. Furthermore, the desirability function was employed in order to optimize the process under study. It was found that the optimum values of the responses could be obtained at the low levels of all three process variables. Topographical characterization was carried out by taking SEM and entrapment was confirmed using DSC. It was concluded that the proper selection of rate-controlling alginate concentration and their interactive potential for crosslinking is important, and will determine the overall size and shape of beads, the duration and pattern of dissolution profiles, pH sensitivity and enzyme loading capacity.

KEY WORDS: Calcium alginate beads. Desirability function. Entrapment. Factorial design. Optimization. Papain. Sodium alginate.

INTRODUCCIÓN

La papaína (EC 3.4.22.2) es una tiol-proteasa y su centro activo es Cis-25, His-159 y Asp-158. La papaína presenta una amplia actividad proteolítica ante las proteínas, péptidos de cadena corta, enlaces amidas y ésteres de aminoácidos¹ y se utiliza de manera muy extendida en el ámbito de la alimentación y la medicina². La reacción inversa de la hidrólisis de la papaína se puede emplear también en la síntesis de péptidos y oligómeros basados en aminoácidos²⁻⁴, especialmente la papaína inmovilizada, empleada en la síntesis enzimática de péptidos y sus derivados en disolventes orgánicos⁵. El pH óptimo para la actividad de la papaína se sitúa en un intervalo de entre 3 y 9, el cual varía según el sustrato^{6,7}. No obstante, la papaína es casi inactiva con un pH gástrico de 1,2, por lo que el lugar ideal para su administración es el intestino delgado.

Los sistemas de administración de fármacos en un punto específico son populares y pueden formularse como formas de dosificación de una o varias unidades. Las ventajas relativas que presentan las formas de dosificación de varias unidades (p. ej. un tiempo de tránsito gastrointestinal predecible, menos molestias gastrointestinales localizadas y una mayor seguridad del producto) frente a los productos de una unidad están ampliamente establecidas. Desde el punto de vista de la fabricación, con independencia de los tipos de forma de dosificación (de una o varias unidades), en la actualidad es común el uso de ingredientes hidrófilos que se puedan dilatar en el diseño de sistemas de liberación modificados y proporcionan una gran flexibilidad a la tecnología farmacéutica⁸⁻¹³. A la vista de las múltiples ventajas que ofrecen las formas de dosificación de varias unidades, se especula sobre el hecho de que tales sistemas pueden resultar particularmente útiles: (i) para la administración de fármacos muy irritantes, como son los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE)^{14,15}; (ii) para la administración en un punto específico del tracto gastrointestinal¹⁶; y (iii) para la administración de enzimas, péptidos/proteínas y vacunas^{17,18}.

El alginato es un copolímero natural de ácido α -D-manurónico (M) y α -L-gulurónico (G) unidos por enlaces 1-4 y es un polisacárido con una elevada masa molecular que se extrae de las algas pardas (*Phaeophyceae*, principalmente *Lamina-*

INTRODUCTION

Papain (EC 3.4.22.2) is one of the thiol proteases, and its active site consists of Cys-25, His-159 and Asp-158. Papain shows extensive proteolytic activity towards proteins, short-chain peptides, amino acid esters and amide links¹, and is applied extensively in the fields of food and medicine². The reverse reaction of hydrolysis of papain also can be employed in the synthesis of peptides and oligomers based on amino acids²⁻⁴, especially immobilized papain, which has been employed in the enzymic synthesis of peptides and their derivatives in organic solvents⁵. Optimum pH for activity of papain is in the range of 3-9 which varies with different substrate^{6,7}. However, papain is almost inactive at gastric pH of 1.2 so the ideal place for papain delivery is small intestine.

Site-specific drug delivery systems are popular and can be formulated as single or multiple unit dosage forms. The relative merits of multiple unit dosage forms (e.g. predictable gastrointestinal transit time, less localized gastrointestinal disturbances and greater product safety) over single unit products are well established. From a manufacturing point of view, irrespective of the types of the dosage form (single or multiple unit), currently the utilization of hydrophilic swellable ingredients in the design of modified release systems are common and offer significant flexibility in pharmaceutical technology⁸⁻¹³. In view of the many benefits offered by multiple unit dosage forms, it is speculated that such systems are particularly useful: (i) for delivering highly-irritant drugs such as nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)^{14,15}; (ii) for site-specific targeting within the gastrointestinal tract¹⁶; and (iii) for delivery of enzymes, peptides/proteins and vaccines^{17,18}.

Alginate is a natural copolymer of 1,4-linked α -D-mannuronic acid (M) and α -L-guluronic acid (G) and is a high-molecular-mass polysaccharide extracted from brown seaweeds (*Phaeophyceae*, mainly *Laminaria*)¹⁹. It has been shown that the G and M units are joined together in blocks and as such, three types of blocks may be found: homo-polymeric G blocks (GG), homo-polymeric M blocks (MM) and heteropolymeric sequentially alternating blocks (MG). The reactivity with calcium and the subsequent gel formation capacity is a direct function of the ave-

ria)¹⁹. Se descubrió que las unidades G y M se unen en bloques y, como tales, se pueden encontrar tres tipos de bloques: bloques G homopolímeros (GG), bloques M homopolímeros (MM) y bloques heteropolímeros con secuencias alternantes (MG). La reactividad con el calcio y la consiguiente capacidad para la formación de geles es una función directa de la longitud de cadena media de los bloques G²⁰. Por lo tanto, los alginatos que contienen las fracciones de GG mayores presentan la más alta capacidad para la formación de geles. Esto se deriva inicialmente de la capacidad del catión calcio divalente para ajustarse en las estructuras gulurónicas de forma similar a como lo hacen los huevos en una «caja de huevos». Por consiguiente, esto une las cadenas de alginato mediante la formación de zonas de unión, lo que conduce a continuación a la gelación de la solución y a la formación de gránulos. Al añadir una solución acuosa de alginato sódico en forma de gotas a una solución acuosa de cloruro cálcico, se obtiene un gel esférico de forma y tamaño regulares. El gel esférico se denomina «gránulo de alginato». Los gránulos de alginato presentan la ventaja de no ser tóxicos por vía oral y de poseer una elevada biocompatibilidad^{21,22}. Otra propiedad ventajosa es su incapacidad para volver a dilatarse en entornos ácidos mientras que sí lo hacen con facilidad en entornos alcalinos, de modo que los fármacos sensibles al ácido que se incorporen a los gránulos estarían protegidos ante los jugos gástricos²³. Por lo tanto, el alginato se emplea como una matriz de captura para células y enzimas, así como para aditivos farmacéuticos y alimentarios²⁴⁻²⁶. No obstante, la porosidad de los gránulos de alginato resulta en una rápida liberación del contenido incorporado.

En el pasado, se han realizado investigaciones de los gránulos de alginato cálcico entrecruzados convencionales para el desarrollo de un sistema de administración de fármacos de varias unidades²⁷⁻³². Se puede afirmar que los factores más importantes que regulan la administración de fármacos son el grado de relajación de polímeros, el mantenimiento de los límites de la capa del gel, la erosión del gel y la disolución de polímeros¹². Por consiguiente, para identificar de forma lógica estos mecanismos de regulación, en este artículo se analizan los estudios de disolución de los gránulos y se evalúan y caracterizan los parámetros fisicoquímicos que afectan a

range chain length of the G blocks²⁰. Hence, alginates containing the highest GG fractions possess the strongest ability to form gels. This initially arises from the ability of the divalent calcium cation to fit into the guluronate structures like eggs in an "egg box junctions". Consequently, this binds the alginate chains together by forming junction zones, and sequentially leading to gelling of the solution mixture and bead formation. When an aqueous solution of sodium alginate is added dropwise to an aqueous solution of calcium chloride, a spherical gel with regular shape and size is obtained. The spherical gel is termed an "alginate bead". Alginate beads have the advantages of being nontoxic orally and having high biocompatibility^{21,22}. Another advantageous property is their inability to reswell in acidic environment while easily reswells in alkaline environment, so acid-sensitive drugs incorporated into the beads would be protected from gastric juice²³. Therefore, alginate is used as an entrapment matrix for cells and enzymes as well as pharmaceutical and food adjuvants²⁴⁻²⁶. However, the porosity of alginate beads results in a fast release of incorporated content.

In the past, conventional crosslinked calcium-alginate beads have been investigated for the development of a multiple unit drug delivery system²⁷⁻³². It may be postulated that the most crucial factors regulating drug release are degree of polymer relaxation, maintenance of gel layer boundary, gel erosion and polymer dissolution¹². Consequently, in order to logically identify these regulating mechanisms, this paper will deal with dissolution studies of beads and with evaluating and characterizing those physicochemical parameters which affect bead formation and its release behavior.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Purified papain, sodium alginate, calcium chloride dihydrate, dibasic sodium phosphate and citric acid were purchased from S. D. Fine-Chem Ltd., Mumbai, India. Hammersten type casein (Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, India) and trichloroacetic acid (Qualigens Fine Chemicals, Mumbai, India) were used as received. All the other chemicals and solvents were

la formación de gránulos y al comportamiento de liberación correspondiente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

La papaína purificada, el alginato sódico, el cloruro cálcico dihidratado, el fosfato sódico dibásico y el ácido cítrico se adquirieron en S. D. Fine-Chem Ltd., Mumbai, India. La caseína tipo Hammerstein (Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, India) y el ácido tricloroacético (Qualigens Fine Chemicals, Mumbai, India) se utilizaron como se recibieron sin modificación alguna. Todos los demás productos químicos y disolventes eran de grado analítico y se utilizaron sin una posterior purificación. Para el estudio se utilizó agua desionizada sometida a doble destilación.

Preparación de los gránulos

La solución de alginato sódico concentrado se preparó antes de que fuera necesario mediante la disolución de alginato sódico en agua destilada. La cantidad de enzima requerida (200 mg de papaína en 50 ml de solución de alginato sódico final) se disolvió en una pequeña cantidad de agua y se mezcló con la solución de alginato sódico concentrado. La concentración final de alginato sódico se ajustó en un intervalo de 1-2% p/v y utilizó tras su desgasificación en vacío. La preparación de los gránulos se realizó mediante el vertido de gotas de la solución de alginato sódico (50 ml) que contiene la enzima desde un dispositivo de goteo como una jeringa con una aguja hipodérmica de punta plana con un calibre de 26 \times en una solución de cloruro cálcico agitada magnéticamente (200 ml) y se dejó que se endureciera durante un período de tiempo específico. Se seleccionaron distintos niveles (Tabla 1) de alginato sódico, cloruro cálcico y tiempo de endurecimiento. Los gránulos se obtuvieron mediante la decantación de la solución de cloruro cálcico, se lavaron con agua desionizada y se secaron en un desecador de vacío (Tarsons Products Pvt. Ltd., Kolkata, India) durante 36 horas. El proceso descrito anteriormente se realizó a una temperatura ambiente controlada (20°C).

of analytical grade and were used without further purification. Deionized double-distilled water was used through out the study.

Preparation of beads

Concentrated sodium alginate solution was prepared well before required by dissolving sodium alginate in distilled water. Required quantity of enzyme (200 mg papain in 50 ml of final sodium alginate solution) was dissolved in small quantity of water and mixed with concentrated sodium alginate solution. Final concentration of sodium alginate was adjusted in the range of 1-2% w/v and was used after being degassed under a vacuum. The beads were prepared by dropping of the sodium alginate solution (50 ml) containing enzyme from the dropping device such as syringe with 26G \times flat-tip hypodermic needle to a magnetically stirred calcium chloride solution (200 ml) and were allowed to harden for specific time. Different levels (Table 1) of sodium alginate, calcium chloride and hardening time were selected. The beads were collected by decanting calcium chloride solution, washed with deionized water and dried in vacuum desiccator (Tarsons Products Pvt. Ltd., Kolkata, India) for 36 hours. Above process was carried out at controlled room temperature (20°C).

TABLA 1. Factorial 3x3: factores y niveles correspondientes.**TABLE 1.** Factorial 3³: factors and their levels.

Factores Factors	Nivel bajo Low level	Nivel medio Middle level	Nivel alto High level
A: Alginato sódico (% p/v) A: Sodium alginate (% w/v)	1,0	1,5	2,0
B: Cloruro cálcico (M) B: Calcium chloride (M)	0,05	0,10	0,15
C: Tiempo de endurecimiento (min) C: Hardening time (min)	20	25	30

Evaluación de los gránulos

Determinación de la eficacia de captura

La eficacia de captura constituía el parámetro de evolución importante para la optimización de la captura. La cantidad total de enzima capturada en los gránulos se determinó mediante la disolución de éstos en un fluido intestinal simulado y agitado magnéticamente durante 45 min. La solución se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min (Remi Instruments Ltd, Mumbai, India) y la parte flotante se sometió a ensayo (n=3) en busca de contenido enzimático mediante el método de digestión de la caseína de USP XXVI. La eficacia de captura se calculó como:

$$\text{Eficacia de captura} = \frac{\text{Carga enzimática}}{\text{Carga enzimática teórica}} \times 100 \quad (1)$$

Determinación del perfil de liberación dependiente del pH

Los estudios de disolución «in vitro» se realizaron mediante el aparato 2 de disolución de USP XXVI (TDT-60T, Electrolab, Mumbai, India) en 500 ml en medios con diferentes pH que oscilaban entre 1,2 y 8,0 en un lote experimental a 37±0,5°C con el agitador de paletas a una velocidad de 50 rpm. Se introdujeron muestras pesadas con precisión (n=3) equivalentes a unos 40 mg de papaína en el medio de disolución y se obtuvieron muestras de 2 ml a las 0, 0,25, 0,50, 0,75, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 y 6,0 horas. Las muestras se filtraron a través de un filtro de membrana de 0,4 µm y se sometieron a estudio en busca de contenido enzimático tal y como se hizo con anterioridad. Los gránulos de alginato demostraron tener un perfil de liberación dependiente del pH, obteniéndose el valor

Evaluation of beads

Determination of entrapment efficiency

Entrapment efficiency was the important evolutionary parameter for optimization of entrapment. Total amount of enzyme entrapped in beads was determined by dissolving the beads in magnetically stirred simulated intestinal fluid without enzyme for about 45 min. The solution was centrifuged at 2500 rpm for 10 min (Remi Instruments Ltd, Mumbai, India) and supernatant was assayed (n=3) for enzyme content by casein digestion method of USP XXVI. Entrapment efficiency was calculated as:

$$\text{Entrapment efficiency} = \frac{\text{Enzymeloading}}{\text{Theoretical enzymeloading}} \times 100 \quad (1)$$

Determination of pH dependent release profile

'In vitro' dissolution studies were carried out using the USP XXVI dissolution apparatus 2 (TDT-60T, Electrolab, Mumbai, India) in 500 ml of different pH media ranging from 1.2 to 8.0 on one experimental batch at 37±0.5°C with paddle speed of 50 rpm. Accurately weighed samples (n=3) equivalent to about 40 mg of papain were introduced to dissolution media and samples of 2 ml were collected at 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 and 6.0 hr. Samples were filtered through 0.4 µm membrane filter and assayed for enzyme content as before. Alginate beads showed pH dependant release profile and it was maximum in simulated intestinal fluid without enzyme.

máximo en el fluido intestinal simulado sin enzima.

Determinación de los valores T_{50} y T_{90}

El tiempo necesario para la liberación del 50 (T_{50}) y el 90 (T_{90}) por ciento de la enzima son parámetros importantes para el estudio de la liberación enzimática. Para una mayor optimización, se realizó un estudio de disolución de todos los lotes en 500 ml de fluido intestinal simulado sin enzima, tal y como se realizó anteriormente. Se sometieron a la disolución las muestras pesadas con precisión ($n=3$) equivalentes a unos 40 mg de papaína y se sometieron a estudio alícuotas de 2 ml cada 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 y 120 min. Los valores T_{50} y T_{90} se obtuvieron a partir del porcentaje de enzima liberada en relación a una línea de tiempo mediante el trazado de una línea de proyección en los ejes de tiempo en los valores de liberación del 50% y 90% respectivamente.

Mediciones del tamaño de partículas

El tamaño de las partículas se determinó con el analizador de tamaño de partículas por difracción láser (MAN 0244/ HYDRO 2000 SM, Malvern Instruments Ltd., RU) con alcohol isopropílico como vehículo.

Mediciones del ángulo de reposo

Para medir el ángulo de reposo se hicieron pasar los gránulos a través de un embudo situado sobre la superficie horizontal. Se midió la altura (h) del montón con un catetómetro y se determinó también el radio (r) de la base del cono. El ángulo de reposo (Φ) se calculó a partir de la ecuación:

$$\tan \Phi = \frac{h}{r} \quad (2)$$

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El análisis calorimétrico diferencial de barrido se utilizó para caracterizar el comportamiento térmico de las sustancias aisladas, gránulos cargados y vacíos. Los termogramas DSC se obtuvieron mediante un sistema de análisis térmico automático (DSC-60, Shimadzu, Japón). Las calibraciones de temperatura se realizaron utilizando

Determination of T_{50} and T_{90}

Time required for 50 (T_{50}) and 90 (T_{90}) percent of enzyme release are important parameters for enzyme release study. For optimization purpose, dissolution study of all batches was carried out in 500 ml of simulated intestinal fluid without enzyme as before. Accurately weighed samples ($n=3$) equivalent to about 40 mg of papain were subjected to dissolution and aliquots of 2 ml were assayed at 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 and 120 min. T_{50} and T_{90} were found from % enzyme released versus time plot by drawing a projection line on the time axes at 50% and 90% release respectively.

Particle size measurements

Particle size was determined with the laser diffraction particle size analyzer (MAN 0244/ HYDRO 2000 SM, Malvern Instruments Ltd., UK) using isopropyl alcohol as a vehicle.

Angle of repose measurements

Angle of repose was measured by passing beads through a funnel on the horizontal surface. The height (h) of the heap formed was measured with a cathetometer and the radius (r) of the cone base was also determined. The angle of repose (Φ) was calculated from:

$$\tan \Phi = \frac{h}{r} \quad (2)$$

Differential scanning calorimetry (DSC)

Differential scanning calorimetric analysis was used to characterize the thermal behaviour of the isolated substances, empty and loaded beads. DSC thermograms were obtained using an automatic thermal analyzer system (DSC-60, Shimadzu, Japan). Temperature calibrations were performed using indium as a standard. Samples were crimped in a standard aluminium pan and heated from 30–400°C at 10°C/min under constant purging of dry nitrogen at 30 ml/min. An empty pan, sealed in the same way as the sample, was used as a reference.

indio como estándar. Las muestras se colocaron en una cubeta de aluminio estándar y se calentaron de 30°C a 400°C a incrementos de 10°C/min con un purgado constante de nitrógeno seco a razón de 30 ml/min. Se utilizó como referencia una cubeta vacía, sellada de la misma forma que la muestra.

Microscopía electrónica de barrido (TEM)

La finalidad del estudio mediante SEM era la de obtener una caracterización topográfica de los gránulos. Los gránulos se montaron en porta-muestras de latón mediante cinta adhesiva por ambas caras. Las imágenes SEM se tomaron con un microscopio electrónico de barrido (JSM-5610LV, Jeol Ltd., Japón) con el aumento requerido a temperatura ambiente. Se mantuvo una distancia de trabajo de 39 mm y se utilizó un voltaje de aceleración de 15 kV, con la imagen de electrones secundarios (SEI) como detector.

Diseño factorial y función de deseabilidad

Para este estudio se utilizó un diseño factorial completo 3x3 para determinar el efecto de la concentración de alginato sódico (% p/v), la concentración de cloruro cálcico (M) y el tiempo de endurecimiento (min). Con anterioridad a la aplicación del diseño, se realizó cierto número de pruebas preliminares para determinar las condiciones a las que se producían gránulos durante el proceso. Los factores implicados y los niveles correspondientes se muestran en la Tabla 1.

La matriz de los experimentos y el resultado de las respuestas se muestran en la Tabla 2. Para determinar el error experimental, se repitió el experimento en el punto medio cinco veces en días diferentes. La media del porcentaje de captura, T_{50} , T_{90} , el tamaño de las partículas y el ángulo de reposo de estos experimentos fue $85,88 \pm 1,02$, $15,57 \pm 0,28$, $82,43 \pm 0,33$, $261,130 \pm 0,868$ y $20,61 \pm 0,29$ respectivamente. Estos valores mostraron la excelente reproducibilidad del proceso. La evaluación estadística de los resultados se realizó mediante el análisis de varianzas con un paquete de software de análisis estadístico disponible en el mercado (DESIGN EXPERT V 6.0.10, Minneapolis, EE.UU.). Se seleccionó el modelo cuadrático para este análisis.

Scanning electron microscopy (SEM)

The purpose of SEM study was to obtain a topographical characterization of beads. The beads were mounted on brass stubs using double-sided adhesive tape. SEM photographs were taken with scanning electron microscope (JSM-5610LV, Jeol Ltd., Japan) at the required magnification at room temperature. The working distance of 39 mm was maintained and acceleration voltage used was 15 kV, with the secondary electron image (SEI) as a detector.

Factorial design and the desirability function

In this study a 3^3 full factorial design was used to determine the effect of the concentration of sodium alginate (% w/v), the concentration of calcium chloride (M) and the hardening time (min). Before the application of the design a number of preliminary trials were conducted to determine the conditions at which the process resulted to beads. The factors and their levels are shown in Table 1.

The matrix of the experiments and the results of the responses are listed in Table 2. To determine the experimental error, the experiment at the centre point was replicated five times at different days. The mean % entrapment, T_{50} , T_{90} , particle size and angle of repose of these experiments were 85.88 ± 1.02 , 15.57 ± 0.28 , 82.43 ± 0.33 , 261.130 ± 0.868 and 20.61 ± 0.29 respectively. The above-mentioned values showed good reproducibility of the process. The statistical evaluation of the results was carried out by analysis of variance (ANOVA) using a commercially available statistical software package (DESIGN EXPERT V 6.0.10, Minneapolis, USA). The quadratic model was selected for this analysis.

TABLA 2.- Factorial 3x3: matriz de experimentos y resultados de la deseabilidad y las respuestas medidas.**TABLE 2.-** Factorial 3³: matrix of the experiments and results for the measured responses and the desirability.

Factores/Niveles Factors/ Levels				Respuestas Responses					Deseabilidad general Overall desira-bility
SE* ESa	Alginato sódico (% p/v) Na. Alginate (% w/v)	Cloruro cálcico (M) Calcium chloride (M)	Tiempo de endurecimi ento (min) Harde- ning Time (min)	% de captura % Entrap- ment	T50	T90	Tamaño (µm) Size (µm)	Ángulo de repose Angle of repose	
1	1,0	0,05	20	91,80	6,50	23,80	211,136	22,62	0,962
10	1,0	0,05	25	89,00	8,30	25,70	207,319	22,88	0,913
19	1,0	0,05	30	86,20	9,35	28,40	202,628	23,27	0,868
4	1,0	0,10	20	85,00	7,80	27,50	184,327	23,39	0,878
13	1,0	0,10	25	82,60	9,10	30,55	181,059	23,75	0,831
22	1,0	0,10	30	80,71	10,70	34,00	178,289	24,15	0,781
7	1,0	0,15	20	68,80	8,60	34,60	175,983	24,07	0,599
16	1,0	0,15	25	67,79	10,30	39,00	171,384	24,94	0,533
25	1,0	0,15	30	65,28	12,05	59,25	169,737	26,33	0,000
2	1,5	0,05	20	93,40	13,35	48,00	297,039	19,50	0,815
11	1,5	0,05	25	90,80	14,45	57,40	291,606	19,76	0,747
20	1,5	0,05	30	88,00	16,30	57,40	285,497	20,02	0,694
5	1,5	0,10	20	87,70	14,35	75,00	266,941	20,27	0,648
29	1,5	0,10	25	87,01	15,30	82,50	261,453	20,56	0,579
32	1,5	0,10	25	86,29	15,90	82,90	259,825	20,20	0,563
31	1,5	0,10	25	85,06	15,20	82,40	260,348	20,98	0,569
28	1,5	0,10	25	84,35	15,80	81,90	261,874	20,44	0,561
14	1,5	0,10	25	86,78	15,70	82,30	262,013	20,89	0,572
30	1,5	0,10	25	85,80	15,50	82,60	261,265	20,58	0,568
23	1,5	0,10	30	83,50	16,80	87,65	255,367	20,97	0,489
8	1,5	0,15	20	77,30	15,55	80,55	258,163	21,20	0,522
17	1,5	0,15	25	75,30	16,90	83,50	252,709	21,84	0,464
26	1,5	0,15	30	72,00	19,30	86,50	246,003	22,20	0,366
3	2,0	0,05	20	94,40	15,90	83,80	715,268	16,14	0,599
12	2,0	0,05	25	91,39	17,05	91,50	708,007	16,49	0,476
21	2,0	0,05	30	88,50	18,60	95,60	701,294	16,87	0,339
6	2,0	0,10	20	88,40	17,70	90,80	682,689	17,00	0,464
15	2,0	0,10	25	86,00	18,60	94,20	677,136	17,26	0,375
24	2,0	0,10	30	84,00	20,20	96,15	671,935	17,77	0,270
9	2,0	0,15	20	79,50	19,40	95,60	673,543	18,03	0,293
18	2,0	0,15	25	76,60	20,40	96,30	668,162	18,56	0,233
27	2,0	0,15	30	73,70	22,80	97,20	662,736	18,89	0,000

* SE: Secuencia experimental -- ES, experimental sequence.

Por último, se utilizó la función de deseabilidad para el proceso de optimización. La aplicación de la función de deseabilidad conjuga todas las respuestas en una medición y ofrece la posibilidad de predecir los niveles óptimos de las variables independientes. La combinación de las respuestas en una función de deseabilidad requiere el cálculo de la función de deseabilidad de forma individualizada. En este estudio concreto no existía ningún requisito especial en cuanto al tamaño de partículas de la formulación óptima, de modo que se seleccionó el intervalo de valores de las formulaciones producidas. La formulación óptima de este estudio debe tener un tamaño de partículas entre 169,737 y 715,268 μm , con una captura mínima y máxima de T_{50} y T_{90} y un ángulo de reposo. La deseabilidad individual de cada respuesta se calculó mediante los métodos siguientes³³.

Finally the desirability function was used for the optimization process. The application of the desirability function combines all the responses in one measurement, and gives the possibility to predict the optimum levels for the independent variables. The combination of the responses in one desirability function requires the calculation of the individual desirability function. In this particular study there was no special requirement for the particle size of the optimum formulation, so the range of the values of the produced formulations was selected. The optimum formulation of this study should have a particle size ranging between 169.737 and 715.268 μm , with maximum entrapment and minimum T_{50} , T_{90} and angle of repose. The individual desirability for each response was calculated using the following methods³³.

Se maximizó el valor del porcentaje de captura en el procedimiento de optimización debido a que era deseable obtener los valores más elevados de este parámetro. La función de deseabilidad de este parámetro se calculó mediante la ecuación siguiente:

$$d_1 = \frac{Y_i - Y_{\min}}{Y_{\max} - Y_{\min}} \quad (3)$$

donde d_1 es la deseabilidad individual del porcentaje de captura e Y_i es el resultado experimental. Los valores de Y_{\max} e Y_{\min} para el porcentaje de captura eran 94,40 y 65,28 respectivamente.

El valor T_{50} y T_{90} se minimizó en el procedimiento de optimización, ya que los valores inferiores de estos parámetros suponen una liberación más rápida y completa de las enzimas de los gránulos. El cálculo de la función de deseabilidad se realizó mediante la ecuación:

$$d_2 \text{ ó } d_3 = \frac{Y_{\max} - Y_i}{Y_{\max} - Y_{\min}} \quad (4)$$

donde d_2 es la deseabilidad individual de T_{50} , d_3 es la deseabilidad individual de T_{90} e Y_i es el resultado experimental. Los valores de Y_{\max} e Y_{\min} eran 22,8 y 6,5 para T_{50} y 97,2 y 23,8 para T_{90} respectivamente.

Las formulaciones con un tamaño de partículas dentro del intervalo 169,737-715,268 μm tienen una función de deseabilidad de 1, mientras que las formulaciones con valores fuera de este rango presentan un valor de deseabilidad de 0. Éstos se describen mediante las ecuaciones siguientes:

$$d_4 = 0 \quad \text{para} \quad Y_i < Y_{\min} \quad (5)$$

$$d_4 = 1 \quad \text{para} \quad Y_{\min} < Y_i < Y_{\max} \quad (6)$$

$$d_4 = 0 \quad \text{para} \quad Y_i > Y_{\max} \quad (7)$$

donde d_4 es la deseabilidad individual del tamaño de partículas e Y_i es el resultado experimental.

Se seleccionó la función de deseabilidad parcial no lineal para el ángulo de reposo que era menos importante en la optimización. El valor se minimizó ya que era deseable el menor ángulo de reposo. En este caso, todos los valores

The % entrapment value was maximized in the optimization procedure, as the higher values of this parameter are desirable. The desirability function of this parameter was calculated by using the following equation:

$$d_1 = \frac{Y_i - Y_{\min}}{Y_{\max} - Y_{\min}} \quad (3)$$

where d_1 is the individual desirability of % entrapment and Y_i is the experimental result. The values of Y_{\max} and Y_{\min} for % entrapment were 94.40 and 65.28 respectively.

The T_{50} and T_{90} value were minimized in the optimization procedure, as lower values of these parameters give quicker and complete release of enzyme from the beads. The calculation of the desirability function was carried out using the equation:

$$d_2 \text{ or } d_3 = \frac{Y_{\max} - Y_i}{Y_{\max} - Y_{\min}} \quad (4)$$

where d_2 is the individual desirability of T_{50} , d_3 is individual desirability of T_{90} and Y_i is the experimental result. The values of Y_{\max} and Y_{\min} were 22.8 and 6.5 min for T_{50} and 97.2 and 23.8 min for T_{90} respectively.

Formulations that have a particle size within the range of 169.737-715.268 μm have a desirability function of 1, while the formulations that have values out of this range have a desirability value of 0. These can be described by the following equations:

$$d_4 = 0 \quad \text{for} \quad Y_i < Y_{\min} \quad (5)$$

$$d_4 = 1 \quad \text{for} \quad Y_{\min} < Y_i < Y_{\max} \quad (6)$$

$$d_4 = 0 \quad \text{for} \quad Y_i > Y_{\max} \quad (7)$$

where d_4 is the individual desirability of the particle size and Y_i is the experimental result.

Non-linear partial desirability function was selected for angle of repose which was less important in the optimization. The value was minimized as lower angle of repose was desirable. In this case all the experimental values were acceptable, however, the values far from the target, are little penalized, by choosing $0 < s < 1$ (0.1 in this case) in the following equations:

experimentales eran aceptables; no obstante los valores muy alejados del destino se penalizaron levemente mediante la selección de $0 < s < 1$ ($0,1$ en este caso) en las ecuaciones siguientes:

$$d_5 = 1 \quad \text{si } Y_i \leq Y_{\min} \quad (8)$$

$$d_5 = \left(\frac{Y_{\max} - Y_i}{Y_{\max} - Y_{\min}} \right)^s \quad \text{si } Y_{\min} \leq Y_i \leq Y_{\max} \quad (9)$$

$$d_5 = 0 \quad \text{si } Y_{\max} \leq Y_i \quad (10)$$

donde d_5 es la deseabilidad individual del ángulo de reposo e Y_i es el resultado experimental. Los valores de Y_{\max} e Y_{\min} para el ángulo de reposo eran 26,326 y 16,137 respectivamente.

Los valores de deseabilidad general se calcularon a partir de los valores individuales mediante la ecuación siguiente:

$$D = (d_1 \times d_2 \times d_3 \times d_4 \times d_5)^{1/5} = \left[\prod_{i=1}^5 d_i \right]^{1/5} \quad (11)$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Perfil de liberación dependiente del pH

Normalmente, los fármacos con un mayor peso molecular y que se disuelven con más dificultad en el agua no se liberan de los gránulos de alginato cálcico debido a su estabilidad y capacidad para no dilatarse en entornos ácidos, mientras que se dilatan y se desintegran en el pH intestinal^{23,34,35}. La dilatación y desintegración de gránulos de alginato cálcico depende de la composición del medio de disolución como, por ejemplo, el sodio y el fosfato, y la solubilidad del fármaco capturado en los gránulos de alginato. La papaína no se liberó de los gránulos de alginato debido a un mayor peso molecular. La dilatación y desintegración de los gránulos de alginato en el fluido intestinal se debió a la afinidad del calcio con el fosfato y al intercambio sodio/calcio^{9,36}. El efecto del pH en la liberación de papaína de los gránulos de alginato cálcico en tampones con distinto pH que simulaban el tracto gastrointestinal de los seres humanos se muestra en la Figura 1. El perfil de liberación del lote optimizado en el fluido intestinal simulado sin enzima se muestra en la Figura 2.

$$d_5 = 1 \quad \text{if } Y_i \leq Y_{\min} \quad (8)$$

$$d_5 = \left(\frac{Y_{\max} - Y_i}{Y_{\max} - Y_{\min}} \right)^s \quad \text{if } Y_{\min} \leq Y_i \leq Y_{\max} \quad (9)$$

$$d_5 = 0 \quad \text{if } Y_{\max} \leq Y_i \quad (10)$$

where d_5 is the individual desirability of angle of repose and Y_i is the experimental result. The values of Y_{\max} and Y_{\min} for angle of repose were 26.326 and 16.137 respectively.

The overall desirability values were calculated from the individual values by using the following equation:

$$D = (d_1 \times d_2 \times d_3 \times d_4 \times d_5)^{1/5} = \left[\prod_{i=1}^5 d_i \right]^{1/5} \quad (11)$$

RESULT AND DISCUSSION

pH dependent release profile

Generally, higher molecular weight and poorly water-soluble drugs are not released from calcium alginate beads due to stability and non swelling property in acidic environment while swell and disintegrate in intestinal pH^{23,34,35}. The swelling and disintegration of calcium alginate beads are dependent on compositions of dissolution medium, e.g. sodium and phosphate, and solubility of drug entrapped into alginate beads. Papain was not released from alginate beads due to higher molecular weight. The swelling and disintegration of alginate beads in intestinal fluid were due to the affinity of calcium to phosphate and sodium/calcium exchange^{9,36}. The effect of pH on the release of papain from calcium alginate beads in different pH buffers simulating the human gastrointestinal tract is given in Figure 1. Release profile of optimized batch in simulated intestinal fluid without enzyme is shown in Figure 2.

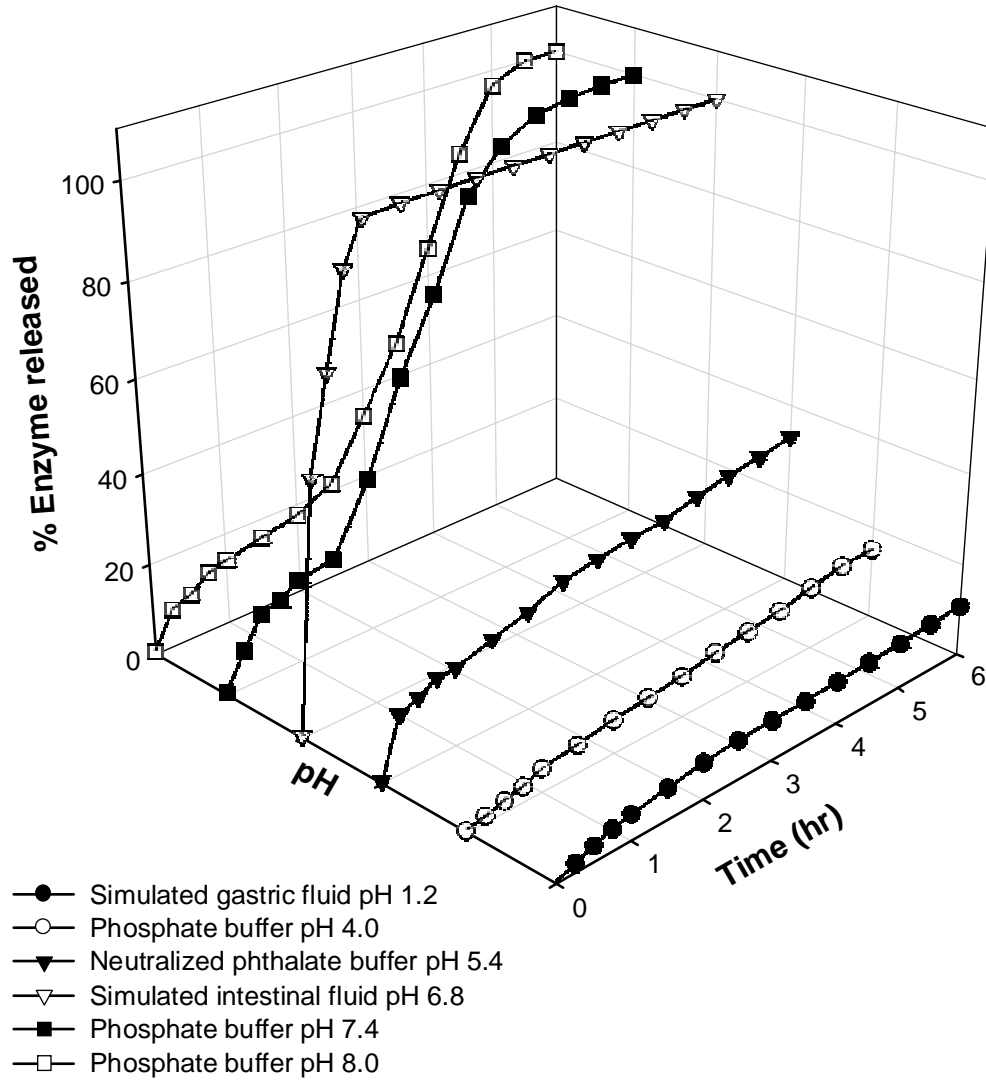
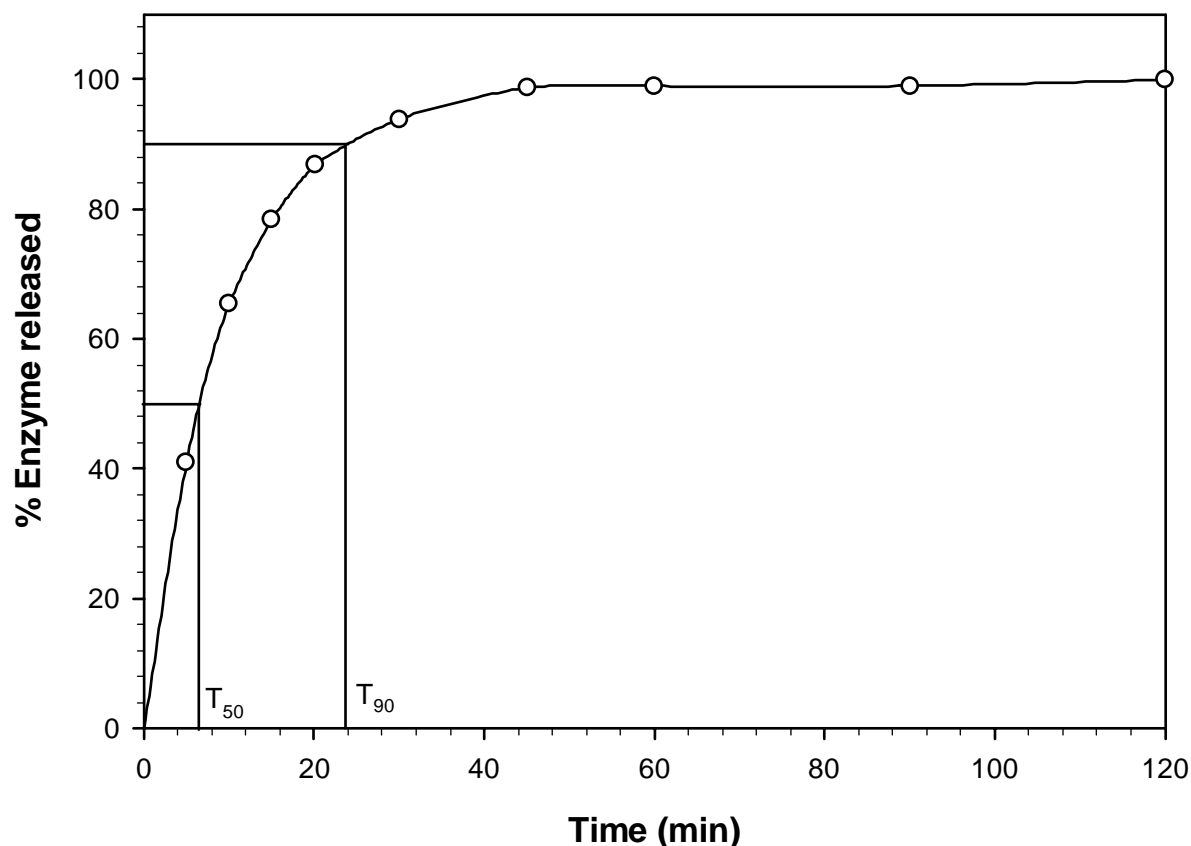
FIGURA 1. Determinación del perfil de liberación dependiente del pH a través de un estudio de disolución «in vitro».**FIGURE 1.** Determination of pH dependent release profile by 'In vitro' dissolution study.

FIGURE 2. Perfil de liberación del lote optimizado (formulación 1) en el fluido intestinal simulado sin enzima.

FIGURE 2.- Release profile of optimized batch (formulation 1) in simulated intestinal fluid without enzyme.



Efecto de los factores sobre las respuestas

Porcentaje de captura

Los resultados del análisis de varianza y los coeficientes de regresión de las variables de respuesta se muestran en la Tabla 3 de la que se derivan que los efectos de los tres factores que inciden sobre el porcentaje de captura fueron significativos desde un punto de vista estadístico ($P < 0,05$). Los resultados que se obtienen de la Tabla 2 mostraron que el mayor valor porcentual de captura se obtuvo a un nivel superior (2% p/v) de la concentración de alginato sódico, sobre todo cuando al elevado nivel de la concentración de alginato sódico se sucedían niveles bajos de los otros dos factores (Experimento 3).

En la adición de la solución de alginato sódico a una solución de cloruro cálcico, se produjo un entrecruzamiento superficial instantáneo con la precipitación del alginato cálcico seguida de una gelación más gradual del interior que provocó la pérdida de enzima de la superficie de los

Effect of the factors on responses

% Entrapment

ANOVA results and regression coefficients of response variables are shown in Table 3 from which it can be concluded that the effects of all three factors on the % entrapment were statistically significant ($P < 0.05$). The results obtained from the Table 2 showed that the highest % entrapment value was obtained at the high level (2% w/v) of the sodium alginate concentration especially when the high level of the sodium alginate concentration was followed by the low levels of the other two factors (experiment 3).

On addition of sodium alginate solution to a calcium chloride solution, instantaneous interfacial crosslinking took place with precipitation of calcium alginate followed by a more gradual gelation of the interior which caused loss of enzyme from the surface of the beads. Loss of surface enzyme was proportional to the degree of crosslinking. Increased viscosity at higher

gránulos. La pérdida de enzima superficial fue proporcional al grado de entrecruzamiento. La mayor viscosidad con concentraciones más elevadas de alginato sódico retrasó la penetración del calcio hacia el interior del gránulo. Esto resultó en un descenso del entrecruzamiento y una mayor eficacia de captura, favorecida en mayor medida por el coeficiente positivo del factor A (Tabla 3). El grado de entrecruzamiento aumentó al incrementar la concentración de cloruro cálcico y el tiempo de endurecimiento³⁷ y resultó en una menor capacidad de captura³⁸, que se corresponde con el coeficiente negativo de los factores B y C de la Tabla 3. La concentración de cloruro cálcico fue el factor más influyente (42,23%) de los tres.

sodium alginate concentration retarded penetration of calcium to the interior of the bead. This resulted in decrease of crosslinking and increased entrapment efficiency which was further supported by the positive coefficient of factor A (Table 3). Degree of crosslinking increased with increase in calcium chloride concentration and hardening time³⁷ and resulted in decreased entrapment³⁸ which correspond to negative coefficient for factor B and C in Table 3. Calcium chloride concentration was the most influential (42.23%) factor amongst all three factors.

TABLA 3. Resultados del análisis de varianza (Valores *P*): efecto de las variables en el porcentaje de captura, T_{50} , T_{90} , el tamaño de partículas y el ángulo de reposo.

TABLE 3. ANOVA results (P values): effect of the variables on % entrapment T50, T90, particle size and angle of repose.

Factores Factors	% de captura % Entrapment		T50		T90		Tamaño de partículas Particle size		Ángulo de reposo Angle of repose	
	Coefficiente Coefficient	P	Coefficiente Coefficient	P	Coefficiente Coefficient	P	Coefficiente Coefficient	P	Coefficiente Coefficient	P
A	2,517	<0,0001*	4,886	<0,0001*	29,908	<0,0001*	248,828	<0,0001*	-3,244	<0,0001*
B	-8,734	<0,0001*	1,417	<0,0001*	8,939	<0,0001*	-18,965	<0,0001*	1,028	<0,0001*
C	-2,467	<0,0001*	1,497	<0,0001*	4,583	0,0071*	-5,089	<0,0001*	0,458	<0,0001*
A ²	-1,532	0,0003*	-1,766	<0,0001*	-11,39	0,0001*	167,526	<0,0001*	-0,028	0,7433
B ²	-3,184	<0,0001*	0,193	0,0764	-4,694	0,0682	10,123	<0,0001*	0,172	0,0485*
C ²	-0,112	0,7569	0,218	0,0474*	-1,744	0,4836	0,183	0,6531	0,019	0,8450
AB	1,720	<0,0001*	0,354	0,0002*	-3,063	0,1194	-1,346	0,0003*	-0,049	0,4462
AC	-0,2245	0,4249	-0,050	0,5386	-1,417	0,4614	-1,229	0,0007*	-0,109	0,0987
BC	0,190	0,4981	0,175	0,0397*	0,533	0,7804	0,401	0,2106	0,185	0,0078*
Constante	85,933	-	15,567	-	79,231	-	261,305	-	20,590	-
r^2_{adj}	0,968	-	0,996	-	0,935	-	0,999	-	0,993	-

Los coeficientes de regresión se expresan mediante valores codificados. * Significativo estadísticamente (*P* < 0,05)
Regression coefficients and in coded values. *, Statistically significant (*P* < 0.05)

T_{50}

El tiempo necesario para la liberación del 50% de la enzima (T_{50}) se empleó para evaluar el inicio de la acción de las formulaciones. Tal y como se aprecia en la Tabla 3, los tres valores tuvieron un importante efecto positivo en el valor de respuesta (es decir, el valor de respuesta aumentó al incrementar el nivel del factor). La concentración de alginato (factor A) tuvo el efecto más significativo (46,26%) sobre el valor T_{50} . No obstante, la liberación inmediata de enzima para que el inicio de la acción fuera más rápido, y obtener así un valor T_{50} más breve, constituía el criterio deseable para la formulación óptima. La liberación de papaína de los gránulos resultó inversamente proporcional al grado de entrecru-

T_{50}

The time required for 50 % of enzyme release (T_{50}) was used to evaluate the onset of action of the formulations. As shown in Table 3, all three factors had significant positive effect on response value (i.e. response value increase with increase in factor level). The concentration of alginate (factor A) had the most significant (46.26%) effect on T_{50} . However, immediate release of enzyme for quicker on set of action and hence shorter T_{50} was the desirable criteria for the optimum formulation. Release of papain from beads was inversely proportional to the degree of crosslinking. Higher calcium concentration and hardening time also resulted in higher T_{50} due to higher degree of crosslinking³⁸.

zamiento. Una concentración de calcio y un tiempo de endurecimiento mayores supuso también un valor de T_{50} superior debido al mayor grado de entrecruzamiento³⁸.

T_{90}
El 90% de la enzima debía liberarse en el menor tiempo posible para producir el máximo efecto en el lugar de la liberación. Los tres factores tuvieron un efecto positivo sobre el valor de respuesta que se puede apreciar en la Tabla 3. La concentración de alginato (factor A) fue el factor con una mayor influencia (45,14%). El valor T_{90} fue proporcional al grado de entrecruzamiento y el tamaño de partículas. A concentraciones de alginato mayores se correspondían gránulos de mayor tamaño con valores T_{90} elevados. Una concentración de calcio y un tiempo de endurecimiento mayores supuso un valor de T_{90} superior debido al mayor grado de entrecruzamiento³⁸.

Tamaño de partículas

Tal y como se muestra en la Tabla 3, los tres parámetros fueron significativos para el tamaño de partículas; de ellos, la concentración de alginato de sodio resultó ser el factor más relevante (54,84%). En el tamaño de los gránulos influyó el tamaño de la abertura a través de la cual se permitió pasar a la solución de alginato (con una cantidad constante) y la viscosidad de la solución de alginato. La viscosidad aumentó con la concentración de alginato de sodio, lo que resultó en partículas de mayor tamaño. La concentración de cloruro cálcico y el tiempo de endurecimiento tuvieron un efecto negativo (es decir, la respuesta se redujo al aumentar los niveles de los factores) en el tamaño de las partículas. Un grado de entrecruzamiento debido a una mayor concentración de cloruro cálcico y un tiempo de endurecimiento mayores causaron la contracción de los gránulos y que el tamaño de partículas fuera menor³⁸.

Ángulo de reposo

Se midió el ángulo de reposo para estimar la capacidad de fluencia de los gránulos. Si el ángulo supera los 50°, el material no fluye satis-

T_{90}

90% of enzyme should be released in minimum time to exert maximum action at the site of release. All three factors had positive effect on response value which can be seen in Table 3. The concentration of alginate (factor A) was the most influencing (45.14%) factor. T_{90} was proportional to the degree of crosslinking and particle size. Higher concentration of alginate yielded larger beads with high T_{90} values. Higher calcium concentration and hardening time resulted in higher T_{90} due to higher degree of crosslinking³⁸.

Particle size

As shown in Table 3, all three parameters were significant for particle size amongst which sodium alginate concentration was the most affecting (54.84%) factor. The sizes of the beads are influenced by the size of the opening through which the alginate solution is allowed to pass (which was kept constant) and viscosity of the alginate solution. Viscosity increased with concentration of sodium alginate which resulted in larger particles. Calcium chloride concentration and hardening time had the negative effect (i.e. response decreases with increase in factor levels) on the particle size. Higher degree of crosslinking due to higher calcium chloride concentration and hardening time caused shrinkage of beads and resulted in smaller particle size³⁸.

Angle of Repose

Angle of repose was measured for estimating flowability of the beads. If the angle exceeds 50°, the material will not flow satisfactorily while materials having values near the minimum, flow easily and well³⁹. The rougher and more irregular the surface of the particles, the higher will be the angle of repose. The angle also increases with decrease in particle size.

Here, too, all three factors exhibited significant effect on angle of repose. Particle size increased with increase in sodium alginate concentration and resulted in decreased angle. This was further confirmed by a negative coefficient of factor A in Table 3. Higher calcium chloride concentration and hardening time resulted in smaller beads with irregular surface due to shrinka-

factoriamente mientras que los materiales con valores cercanos al mínimo fluyen fácil y correctamente³⁹. Cuanto más irregular y rugosa sea la superficie de las partículas, mayor será el ángulo de reposo. El ángulo también aumenta al reducirse el tamaño de partículas.

Aquí también, los tres factores mostraron tener un efecto significativo sobre el ángulo de reposo. El tamaño de partículas aumentó con el incremento de la concentración de alginato sódico y resultó en un ángulo menor. Esto se confirmó de una forma más sólida por la existencia de un coeficiente negativo para el factor A de la Tabla 3. Una concentración de cloruro cálcico y un tiempo de endurecimiento mayores produjeron gránulos de menor tamaño con una superficie irregular debido a la contracción y al ángulo de mayor tamaño mostrado. La concentración de alginato sódico fue el factor con mayor incidencia (61,33%) de los tres.

Interacción de los factores

Un interacción hace que un factor no produzca el mismo efecto en la respuesta cuando se varían los niveles de otro factor⁴⁰. Los resultados del análisis de varianza (Tabla 3) mostraron que la interacción AB influyó de forma significativa en el porcentaje de captura, el valor T_{50} y el tamaño de partículas. La interacción AC influyó significativamente sólo en el tamaño de partículas mientras que la interacción BC influyó en gran medida en el valor T_{50} y en el ángulo de reposo.

El análisis de los resultados de la Tabla 2 por regresión múltiple conduce a ecuaciones que describen adecuadamente la influencia de los factores seleccionados en el porcentaje de captura, los valores T_{50} y T_{90} , el tamaño de partículas y el ángulo de reposo. En la Tabla 3 se muestran los coeficientes de regresión de estas ecuaciones.

Optimización del proceso mediante la función de deseabilidad

Generalmente, la optimización de las formulaciones farmacéuticas tiene la finalidad de encontrar los niveles óptimos de las variables que afectan a un proceso en el que se podrían gene-

ge and showed increased angle. Concentration of sodium alginate concentration was the most influencing (61.33%) factor amongst all three.

Interactions between the factors

An interaction is the failure of a factor to produce the same effect on the response at the different levels of the other factor⁴⁰. The ANOVA results (Table 3) showed that the interaction AB had significant influence on the % entrapment, T_{50} and particle size. The interaction AC had significant influence only on particle size while interaction BC was found to influence significantly on T_{50} and angle of repose.

The analysis of the results of the Table 2 by multiple regression leads to equations that adequately describe the influence of the selected factors on % entrapment, T_{50} , T_{90} , particle size and angle of repose. In Table 3 regression coefficients of these equations are presented.

Optimization of the process using the desirability function

Generally the aim of the optimization of pharmaceutical formulations is to find the optimum levels of the variables, which affect a process, where a product of good characteristics could be produced. Using the desirability function, all the selected responses were combined in one overall response, the overall desirability. As it has been already discussed, the overall desirability response was calculated from the individual desirability of each of the responses using the Eqs. (3)–(11). The results of each of these overall desirability responses are included in the optimization procedure and the equation found out was as follow (coded factors):

$$D = 0.609 - 0.184A - 0.189B - 0.110C - 0.046A^2 - 0.044B^2 - 0.016C^2 + 0.060AB + 0.004AC - 0.048BC \quad (r_{adj}^2 = 0.8530, P < 0.0001) \quad (12)$$

In Figures 3-5 the contour plots that describe the influence of the factors on the overall desirability, % entrapment and T_{50} are presented. The study of these plots showed that the highest values of the desirability could be obtained at low values of all three process variables. Especially the analysis of the Eq. (12) resulted to the optimum

rar productos con unas características buenas. Mediante la función de deseabilidad se conjugaron todas las respuestas seleccionadas en una respuesta general, la deseabilidad general. Como ya se ha visto anteriormente, la respuesta de deseabilidad general se calculó a partir de la deseabilidad individual de cada una de las respuestas mediante las ecuaciones (3)-(11). Los resultados de cada una de estas respuestas de deseabilidad general se incluyen en el procedimiento de optimización y la ecuación descubierta fue la siguiente (factores codificados):

$$D = 0,609 - 0,184A - 0,189B - 0,110C - 0,046A^2 - 0,044B^2 - 0,016C^2 + 0,060AB + 0,004AC - 0,048BC \quad (r_{adj}^2 = 0,8530, P < 0,0001) \quad (12)$$

Las Figuras 3-5 presentan las representaciones gráficas tridimensionales que describen la influencia de los factores de la deseabilidad general, el porcentaje de captura y el valor T_{50} . El estudio de estas representaciones mostró que podían obtenerse los valores más elevados de deseabilidad utilizando valores bajos en las tres variables del proceso. Sobre todo el análisis de la ecuación (12) resultó en la combinación óptima de las variables independientes donde un producto de las características deseadas y los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 4.

combination of the independent variables where a product of desired characteristics may occur and results of this analysis are shown in Table 4.

FIGURA 3. Representaciones gráficas de deseabilidad, porcentaje de captura y T_{50} como función de la concentración de alginato sódico y la concentración de cloruro cálcico, con un tiempo de endurecimiento fijo de 20 min ($C = -1$).

FIGURE 3.- Contour plots of desirability, % entrapment and T_{50} as function of sodium alginate concentration and calcium chloride concentration, with fixed hardening time of 20 min ($C = -1$).

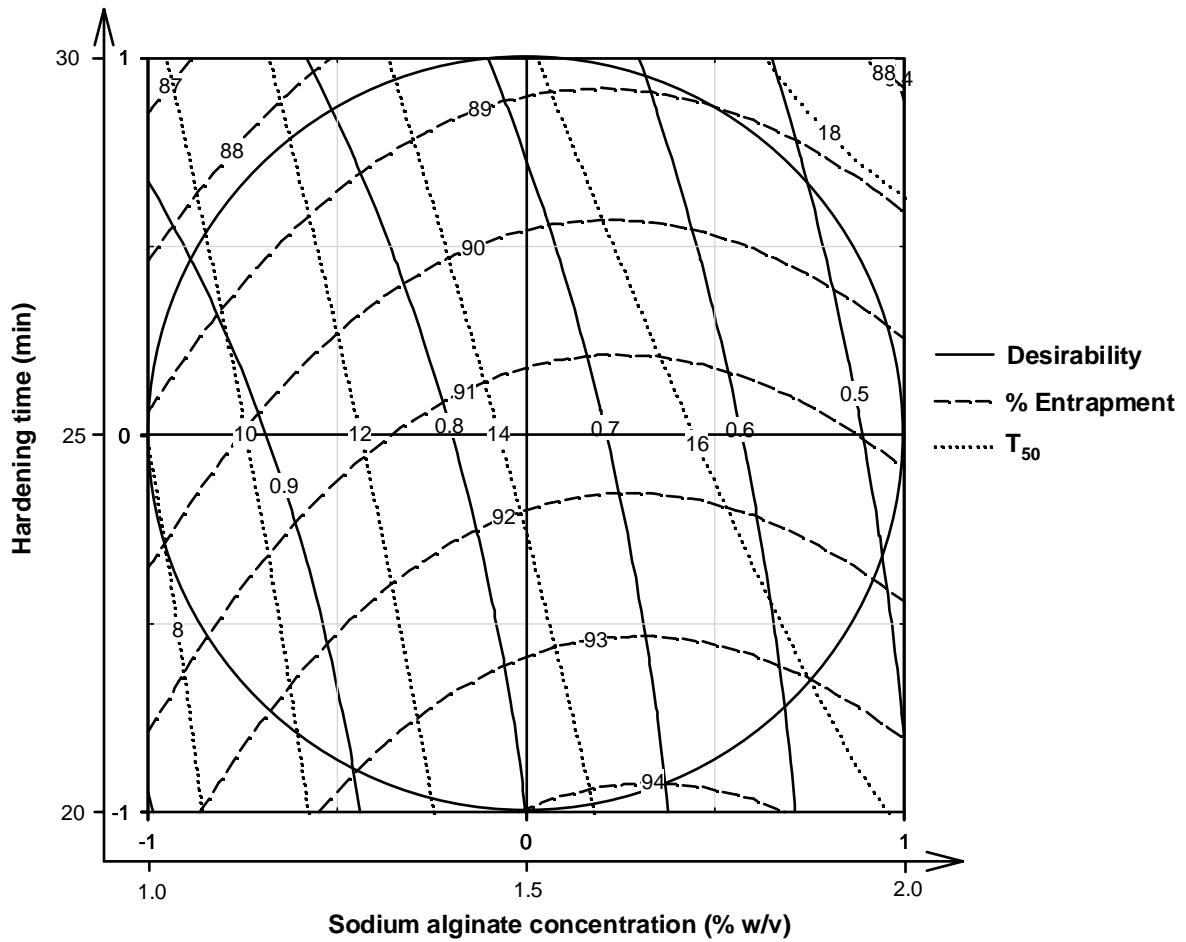


FIGURA 4. Representaciones gráficas de deseabilidad, porcentaje de captura y T_{50} como función de la concentración de alginato sódico y el tiempo de endurecimiento, con una concentración de cloruro cálcico fija de 0,05 M ($B = -1$).

FIGURE 4.- Contour plots of desirability, % entrapment and T_{50} as function of sodium alginate concentration and hardening time, with fixed calcium chloride concentration of 0.05 M ($B = -1$).

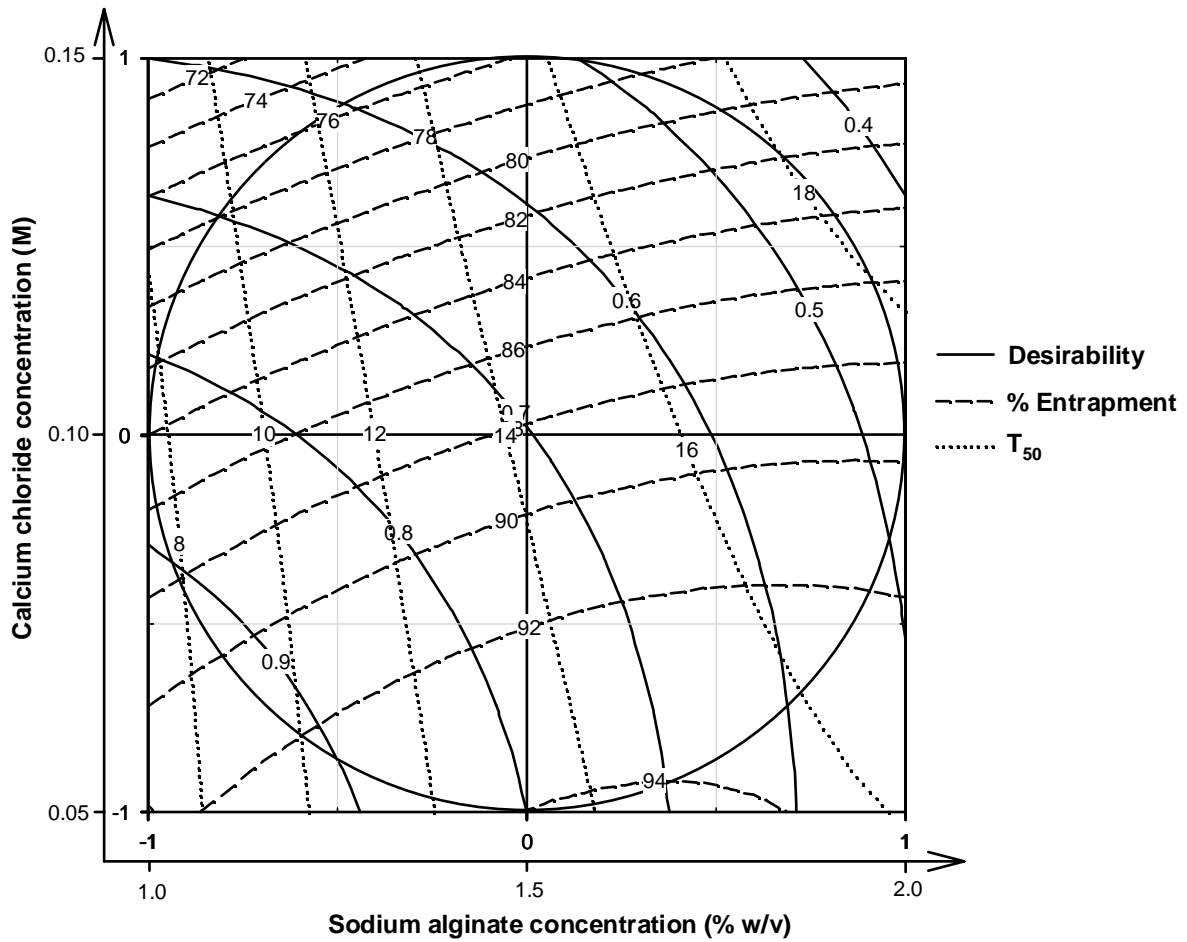


FIGURA 5. Representaciones gráficas de deseabilidad, porcentaje de captura y T_{50} como función de la concentración de cloruro cálcico y el tiempo de endurecimiento, con una concentración de alginato sódico fija de 1,0% p/v ($A = - 1$).

FIGURE 5.- Contour plots of desirability, % entrapment and T_{50} as function of calcium chloride concentration and hardening time, with fixed sodium alginate concentration of 1.0 % w/v ($A = - 1$).

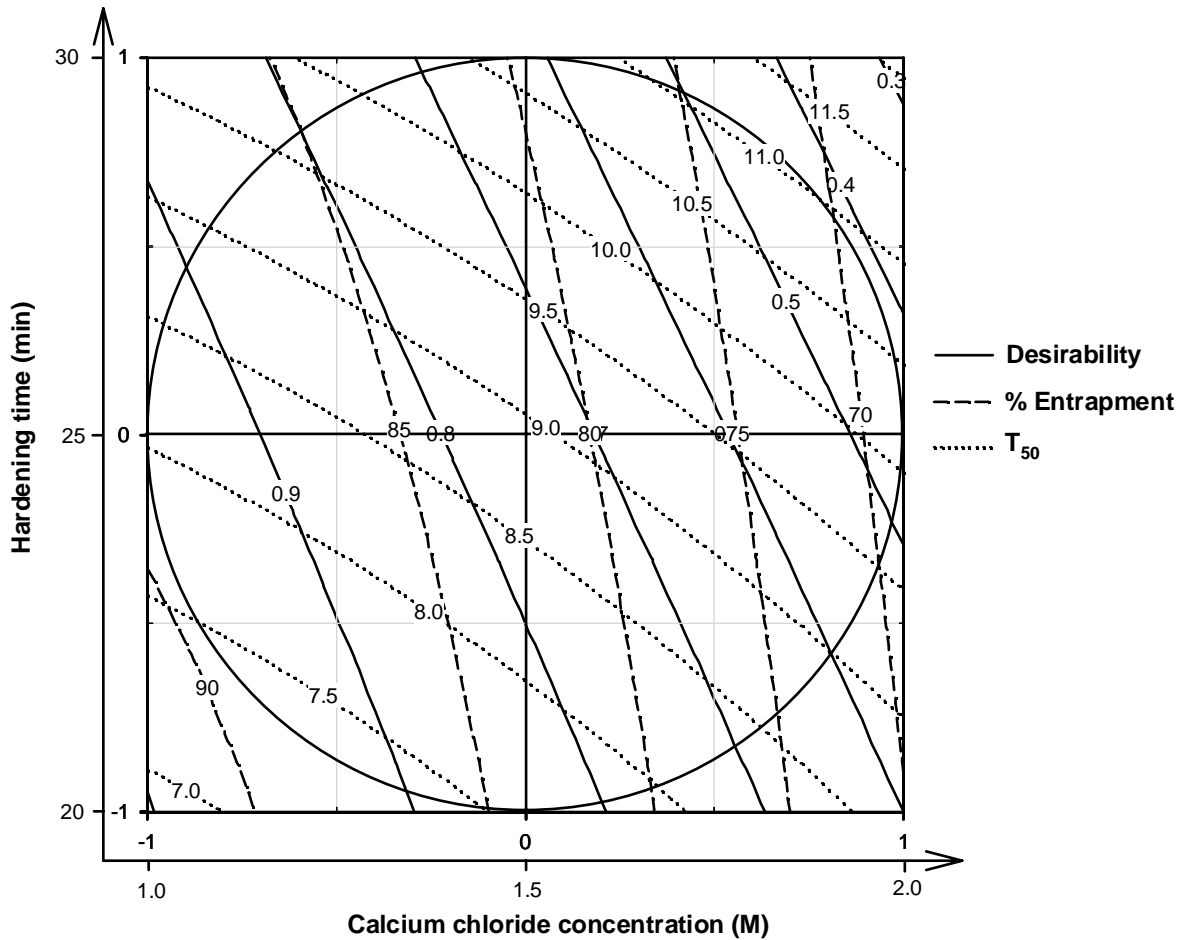


TABLE 4. Niveles óptimos para las variables del proceso independientes.

TABLE 4. Optimum levels for the independent process variables.

Variables independientes Independent variables	Valores óptimos Optimum values
Concentración de alginato sódico Sodium alginate concentration	1% p/v
Concentración de cloruro cálcico Calcium chloride concentration	0,05 M
Tiempo de endurecimiento Hardening time	20 min
Deseabilidad general Overall desirability	0,962

Evaluación de un modelo

Con el fin de evaluar la fiabilidad del modelo, se realizaron cinco experimentos modificando las variables del proceso en valores diferentes a los del modelo. En cada uno de estos experimentos de prueba se estimaron las respuestas mediante las ecuaciones y el procedimiento experimental. En la Tabla 5 se muestra la comparación entre los valores de previstos y experimentales de las respuestas para estos experimentos adicionales. El margen de error se calculó mediante la ecuación siguiente:

$$\text{Margen de error} = \left[\frac{(\text{valor previsto} - \text{valor experimental})}{\text{valor previsto}} \right] \times 100 \quad (13)$$

Se puede apreciar que en todos los casos hubo una correspondencia razonable entre el valor previsto y el experimental dado que se obtuvo un margen de error con un valor bajo. Por esta razón, se puede afirmar que las ecuaciones describen de forma adecuada la influencia de las variables de proceso seleccionadas sobre las respuestas sometidas a estudio.

Evaluation of model

In order to assess the reliability of the model, five experiments were conducted by varying the process variables at values other than that of the model. For each of these test experiments the responses were estimated by using the equations and experimental procedure. In Table 5 the comparison between the experimental and predicted values of the responses for these additional experiments is presented. Bias was calculated by the following equation:

$$\text{Bias} = \left[\frac{(\text{predicted value} - \text{experimental value})}{\text{predicted value}} \right] \times 100 \quad (13)$$

It can be seen that in all cases there was a reasonable agreement between the predicted and the experimental value, since low value of the bias were found. For this reason it can be concluded that the equations describe adequately the influence of the selected process variables on the responses under study.

TABLA 5. Comparación de los valores previstos y experimentales correspondientes a las formulaciones de prueba.**TABLE 5.** Comparison between predicted and experimental values for the test formulations.

Respuestas <i>Responses</i>	Prueba <i>Test</i>	Factores/Niveles <i>Factors/levels</i>			Valores previstos <i>Predicted values</i>	Valores experimentales <i>Experimental values</i>	Margen de error (%) <i>Bias %</i>
		A	B	C			
Porcentaje de captura	1	-1	-0,6	-0,6	88,38	90,72	2,6
	2	-0,6	0	0,4	82,92	81,15	2,1
	3	-0,4	0,6	0	77,88	76,01	2,4
	4	0	-0,4	0,6	87,35	84,58	3,2
	5	0,4	0,4	-0,4	83,94	86,06	2,5
T ₅₀	1	-1	-0,6	-0,6	7,56	7,41	1,9
	2	-0,6	0	0,4	12,65	12,83	1,5
	3	-0,4	0,6	0	14,16	14,47	2,1
	4	0	-0,4	0,6	15,97	16,23	1,7
	5	0,4	0,4	-0,4	17,31	17,09	1,2
T ₉₀	1	-1	-0,6	-0,6	25,01	24,68	1,3
	2	-0,6	0	0,4	59,08	60,33	2,1
	3	-0,4	0,6	0	69,85	72,15	3,3
	4	0	-0,4	0,6	76,90	75,61	1,7
	5	0,4	0,4	-0,4	89,74	88,63	1,2
Tamaño de partículas	1	-1	-0,6	-0,6	196,74	181,71	7,6
	2	-0,6	0	0,4	170,61	180,72	5,9
	3	-0,4	0,6	0	181,17	172,76	4,6
	4	0	-0,4	0,6	267,43	285,91	6,9
	5	0,4	0,4	-0,4	383,66	414,58	8,1
Ángulo de reposo	1	-1	-0,6	-0,6	22,95	22,29	2,9
	2	-0,6	0	0,4	22,74	21,95	3,5
	3	-0,4	0,6	0	22,57	23,56	4,4
	4	0	-0,4	0,6	20,44	19,89	2,7
	5	0,4	0,4	-0,4	19,53	18,90	3,2
Deseabilidad general	1	-1	-0,6	-0,6	0,93	0,94	1,8
	2	-0,6	0	0,4	0,66	0,69	4,9
	3	-0,4	0,6	0	0,53	0,56	5,9
	4	0	-0,4	0,6	0,62	0,60	3,5
	5	0,4	0,4	-0,4	0,50	0,49	2,7

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

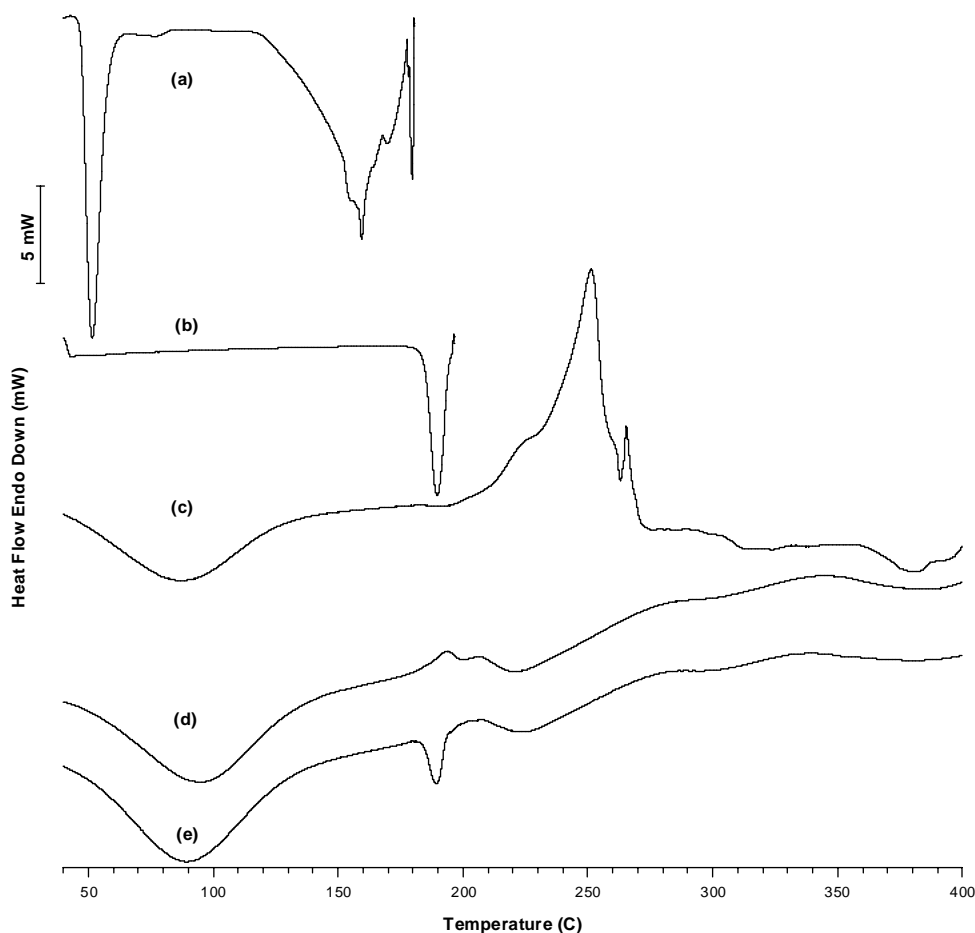
Los termogramas DSC a, b, c, d y e que representan el cloruro cálcico dihidratado, la papaína, el alginato sódico, los gránulos de alginato cálcico vacíos y los gránulos cargados de papaína, respectivamente, se realizaron con las mismas condiciones analíticas mostradas en la Figura 6. Los gránulos de alginato cálcico vacíos no mostraban temperatura exotérmica de degradación del alginato sódico a $\sim 252^\circ\text{C}$ y, a $\sim 221^\circ\text{C}$, se observó una temperatura endotérmica correspondiente a la interacción del alginato y el calcio. La forma del pico de fusión de los gránulos de alginato cargados de papaína era similar a la de los gránulos vacíos, excepto por el hecho de que contenía un pico adicional de papaína. Esto indicó que la papaína se encontraba en la estructura reticular de los gránulos de alginato.

Differential scanning calorimetry (DSC)

The DSC thermograms a, b, c, d and e which represent calcium chloride dihydrate, papain, sodium alginate, blank calcium alginate beads and papain-loaded beads, respectively, made at the same analytical conditions are shown in Figure 6. The degradation exotherm of sodium alginate at $\sim 252^\circ\text{C}$ was absent in blank calcium alginate bead and at $\sim 221^\circ\text{C}$, an endotherm corresponding to alginate-calcium interaction was observed. The melting peak shape of papain-loaded alginate beads was similar to the blank beads except it contained extra peak of papain. This indicated that papain was entrapped in the lattice structure of alginate beads.

FIGURA 6. Los termogramas DSC de (a) cloruro cálcico hexahidratado, (b) papaína, (c) alginato sódico, (d) gránulos de alginato cálcico vacíos y (e) gránulos de alginato cargados de papaína realizados en las mismas condiciones analíticas.

FIGURE 6.- The DSC thermograms of (a) calcium chloride hexahydrate, (b) papain, (c) sodium alginate, (d) blank calcium alginate beads and (e) papain-loaded alginate beads made at the same analytical conditions.



Morfología de los gránulos

La forma esférica de los gránulos cuando están húmedos se pierde normalmente una vez secos, especialmente en el caso de gránulos preparados con una baja concentración de alginato. En alginatos de 1,0% (p/v), los gránulos secos eran muy irregulares y tendían a aglomerarse debido a la baja fuerza mecánica. Con el aumento de la concentración de alginato (2,0% p/v), los gránulos adoptaron la forma de un disco esférico con el centro aplanado. En general, esta forma esférica se conservó cuando la concentración de alginato se elevó hasta el 5,0% (p/v)⁴¹, pero la viscosidad de la solución de 5,0% p/v era demasiado alta para la preparación de los gránulos, así que no fue objeto de estudio. Estos resultados indicaron que la forma de los gránulos de alginato cálcico resultó gravemente afectada en el proceso de secado y que la forma esférica de los gránulos secos mejoró con el incremento de la concentración de alginato. De acuerdo con lo indicado por Skjåk-Bræk et al.⁴², los gránulos de alginato cálcico presentaron una estructura heterogénea con una densa capa superficial y un núcleo menos denso debido al mecanismo de gelación heterogéneo, lo que resultó en el aplanamiento de los gránulos durante el proceso de secado⁴³.

Una característica evidente de la superficie de los gránulos era su alta porosidad al aumentar la concentración de cloruro cálcico (Figura 7; d-f). Este hecho sugirió que se creaban poros en la macromolécula soluble en el agua debido a que la formación de la estructura reticular de alginato cálcico se veía afectada durante la preparación de la unidad y porque se filtró a través de la membrana en el medio⁴⁴. Además, se mejoró la morfología superficial (es decir, se redujo la rugosidad) al aumentar la concentración de alginato sódico (Figura 7; a-c)⁴¹ debido a la alta viscosidad de la solución de alginato sódico.

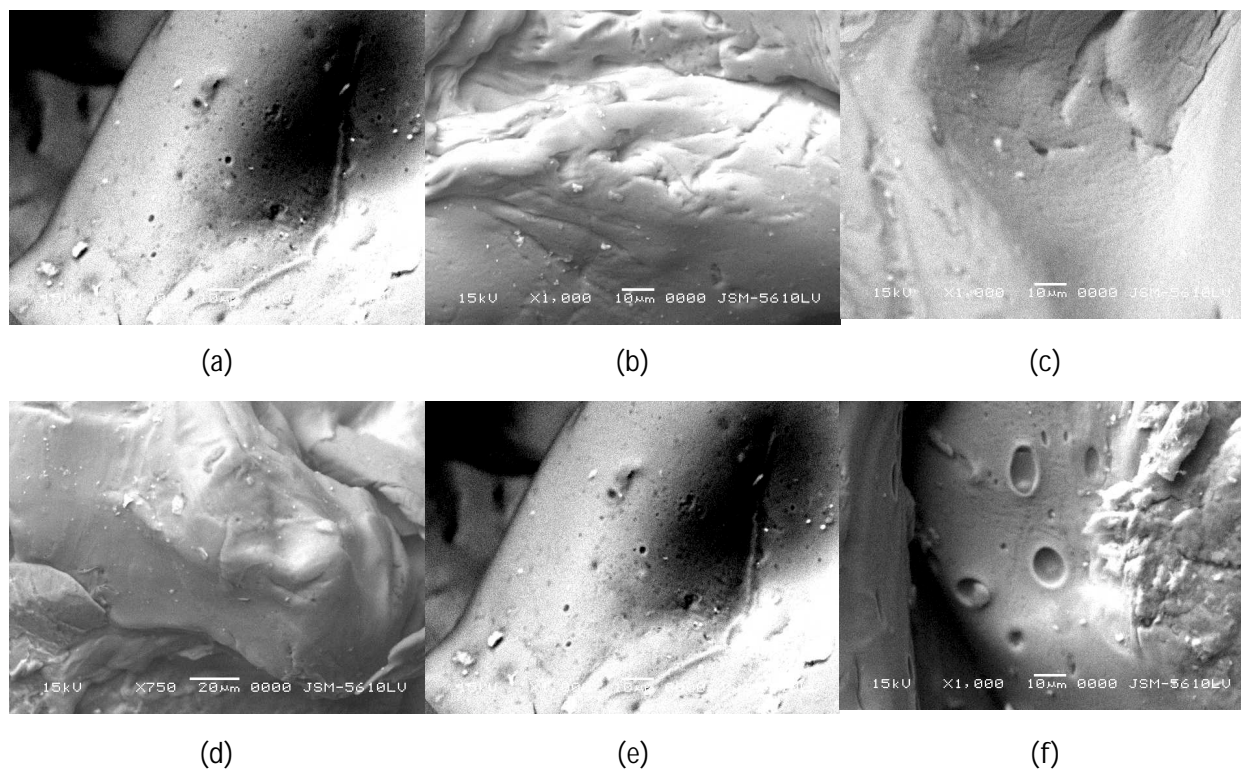
Morphology of the beads

The spherical shape of beads in wet state was usually lost after drying especially for beads prepared with low alginate concentration. In 1.0% (w/v) alginate, the dried beads were very irregular and tend to agglomerate due to low mechanical strength. With the increasing of alginate concentration (2.0% w/v), the shape of beads changed to a spherical disc with a collapsed center. Normally the spherical shape was retained when the alginate concentration was as high as 5.0% (w/v)⁴¹, but viscosity of 5.0% w/v solution was too high for bead preparation under present experimental conditions so it was not studied. These results indicated that the shape of calcium alginate beads was seriously destroyed in the drying process, and the spherical shape of dried beads improved with the increase of alginate concentration. It was reported by Skjåk-Bræk et al.⁴² that calcium alginate beads usually have a heterogeneous structure with dense surface layer and loose core due to the heterogeneous gelation mechanism, which resulted in the collapse of beads during the drying process⁴³.

One noticeable characteristic of the beads surface was its high porosity when the concentration of calcium chloride increased (Figure 7; d-f). This suggested that the water-soluble macromolecule created pores both because it affected the calcium alginate network formation during the unit preparation and because it was leached from the membrane into the medium⁴⁴. Further, the surface morphology was improved (i.e. decrease in roughness) with increase in sodium alginate concentration (Figure 7; a-c)⁴¹ due to the high viscosity of the sodium alginate solution.

FIGURA 7. Micrografías SEM y morfología superficial de gránulos de alginato cálcico: (a–c) Efecto de la concentración de alginato sódico sobre la morfología superficial (concentración de cloruro cálcico 0,15 M) (a) 1,0% p/v; (b) 1,5% p/v y (c) 2,0% p/v de concentración de alginato sódico. (d–f) Efecto de la concentración de cloruro cálcico sobre la morfología superficial (concentración de alginato sódico 1,5 % p/v) (d) 0,10 M; (e) 0,15 M y (f) 0,20 M de concentración de cloruro cálcico.

FIGURE 7.- SEM micrographs and surface morphology of calcium alginate beads: (a–c) Effect of sodium alginate concentration on surface morphology (calcium chloride concentration 0.15 M) (a) 1.0% w/v; (b) 1.5% w/v and (c) 2.0% w/v sodium alginate concentration. (d–f) Effect of calcium chloride concentration on surface morphology (sodium alginate concentration 1.5 % w/v) (d) 0.10 M; (e) 0.15 M and (f) 0.20 M calcium chloride concentration.



CONCLUSIONES

La capacidad de captura farmacológica de la papaína mejoró de forma significativa al reducir la concentración de cloruro cálcico y el tiempo de endurecimiento, así como al incrementar la concentración de alginato sódico. La concentración de alginato sódico, la concentración de cloruro cálcico y el tiempo de endurecimiento afectan al porcentaje de captura, los valores T_{50} y T_{90} , el tamaño de partículas y el ángulo de reposo de los gránulos de forma significativa. También se apreció que las condiciones de interacción eran importantes desde una perspectiva estadística. Además, el análisis de textura de las formulaciones de gránulos mostró que una mayor concentración de alginato sódico y cloruro cálcico afectan a la morfología superficial, así como a la forma de los gránulos. La captura de

CONCLUSIONS

It was found that the drug entrapment capacity of papain was significantly enhanced by decreasing calcium chloride concentration and hardening time as well as by increasing in sodium alginate concentration. Sodium alginate concentration, calcium chloride concentration and hardening time affect % entrapment, T_{50} , T_{90} , particle size and angle of repose of the beads significantly. Interaction terms were also found to be statistically significant. Furthermore, texture analysis of the beads formulations illustrated that the higher concentration of sodium alginate and calcium chloride affect the surface morphology as well as shape of the beads. Enzyme entrapment was confirmed with the help of differential scanning calorimetry. The optimization of the process using the desirability func-

la enzima se confirmó con ayuda de la calorimetría diferencial de barrido. La optimización del proceso mediante la función de deseabilidad resultó en los valores óptimos de los factores con los que se podía alcanzar el objetivo de la producción de gránulos con características aceptables. Los estudios de disoluciones en un intervalo de pH similares al del tracto gastrointestinal de los seres humanos demostró que la velocidad de liberación del fármaco desde diferentes gránulos en pequeños entornos intestinales simulados depende principalmente de la concentración de alginato sódico y el tamaño de partículas. De acuerdo con las metodologías proporcionadas y según el lugar de aplicación de la papaína en el tracto gastrointestinal, es posible fabricar de forma fácil y sistemática gránulos adecuados a este fin. La aplicación de un solo polímero para la formación de gránulos permite al formulador predecir y producir gránulos sensibles al pH de diferentes geometrías, resistencia y características de liberación. Más concretamente, algunos de los problemas de formulación encontrados en la administración de fármacos o enzimas lábiles a la acción de ácidos o que irritan el aparato digestivo pueden resolverse mediante la aplicación de gránulos entrecruzados de varias unidades que responden ante el pH. Los resultados derivados de este estudio pueden ser de gran valor para aquellos científicos del campo farmacéutico especializados en la administración en lugares específicos, así como a la administración oral de enzimas, péptidos, proteínas y agentes ulcerogénicos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento al AICTE (All India Council for Technical Education, Consejo para la educación técnica) de India por la financiación ofrecida al Dr. R. C. Mashru dentro del programa de I+D.

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Perimann GE, Larand L. Proteolytic enzymes. *Methods in Enzymology*, 1970; pp 226-244.
2. Atkinson B, Mavituna F. *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*, The Natural Press, Hong Kong, China, 1985; pp 508-509.
3. Shin CG, Kakusho T, Aral K, Seki M. *Bull Chem Soc Jpn* 1995; 68: 3549-3555.
4. Ulmann D, Bordusa F, Salchert K, Jakubke HD. *Tetrahedron Asymmetry* 1996; 7: 2047-2054.
5. Xin GW, Ye YH, Li ZX. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao* 1998; 19: 1602-1607.

tion resulted to the optimum values of the factors at which the goal of the production of beads with acceptable characteristics could be fulfilled. Dissolution studies over a pH range similar to the human gastrointestinal tract demonstrated that the rate of drug release from the different beads in simulated small intestinal environments depends mainly on sodium alginate concentration and particle size. Based on the provided methodologies and depending on the site of action for papain within the gastrointestinal tract, desirable beads can be easily and reproducibly manufactured. The application of a single polymer for the formation of beads allows the formulator to predict and produce pH-sensitive beads of different geometries, strengths and release characteristics. More specifically, some of the formulation problems encountered for the delivery of gastric-irritating or acid-labile enzyme or drugs can be overcome by the application of multiple unit cross-linked pH-responsive beads. The results of this study may be of value to those pharmaceutical scientists who are engaged in site-specific delivery, as well as the oral delivery of enzymes, peptides, proteins and ulcerogenic agents.

ACKNOWLEDGEMENT

Authors are thankful to the AICTE (India) for funding under R&D scheme to Dr. R. C. Mashru.

6. Uhlig H. *Industrial Enzymes and their Applications*, A Wiley-Intersciences Publication John Wiley & Sons. Inc., New York, Singapore, Toronto, 1998; pp 147-150.
7. Smith EL, Kimmel JR. Ch. 5 Papain. In: Bayer PD, Lardy H, Myrback L (ed.) *The Enzymes*, Academic Press, New York & London, 1960; pp 133-312.
8. Singh R, Awasthi S, Vyas SP. New development on hydrogels: potential in drug delivery. *Die Pharm* 1993; 48: 728-731.
9. Ostberg T, Lund EM, Graffner C. Calcium alginate matrices for oral multiple unit administration. IV Release characteristics in different media. *Int J Pharm* 1994; 112: 241-248.
10. Monshipouri M, Rudolph AS. Liposome-encapsulated alginate: controlled hydrogel particle formation and release. *J Microencapsulation* 1995; 12: 117-127.
11. Garcia AM, Ghaly ES. Preliminary spherical agglomerates of water soluble drug using natural polymer and crosslinking technique. *J Control Release* 1996; 40: 179-186.
12. Kim H, Fassihi R. Application of a binary polymer system in drug release rate modulation. I. Characterization of release mechanism. *J Pharm Sci* 1997; 86: 316-322.
13. Yang L, Fassihi R. Modulation of Diclofenac release from a totally soluble controlled release drug delivery system. *J Control Release* 1997; 44: 135-140.
14. Heinamaki J, Marvola M, Happonen I, Westmarck E. The fate of multiple unit enteric coated formulations in the stomach of the dog. *Int J Pharm* 1988; 42: 105-115.
15. Lin S-Y. Release kinetics of drug from different combined retios of micropellets. *J Microencapsulation* 1993; 10: 319-327.
16. Ritschel WA. Targeting in the gastrointestinal tract: new approaches. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1991; 13: 313-336.
17. Chen H, Langer R. Magnetically-responsive polymerized liposomes as potential oral delivery vehicles. *Pharm Res* 1997; 14: 537-540.
18. Desai MP, Labhasetwar V, Walter E, Levy RJ, Amidon GL. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharm Res* 1997; 14: 1568-1573.
19. Technical information - alginates, Pronove Biopolymer, 1994; pp 3-14.
20. Alginate as immobilization material for cells, Pronove Biopolymer, 1994; pp 1-4.
21. Park PG, Shalaby WSW, Park H. Ch. 5. *Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery*, Technomic, Lancaster, 1993; pp 99-140.
22. Kibat PG, Igari Y, Wheatley MA, Eisen HN, Langer R. Enzymatically activated microencapsulated liposomes can provide pulsative drug release. *FASEB J* 1990; 4: 2533-2539.
23. Yotsuyanagi T, Ohkubo T, Ohhashi T, Ikeda K. Calcium-induced gelation of alginic acid and pH-sensitive reswelling of dried gels. *Chem Pharm Bull* 1987; 35: 1555-1563.
24. Perka C, Spitzer R-S, Lendenhayn K, Sittinger M, Schultz O. Matrix-mixed culture: new methodology for chondrocyte culture and preparation of cartilage transplants. *J Biomed Mater Res* 2000; 49: 305-311.
25. Lanza RP, Ecker D, Huntreiber WM, Staruk JE, Marsh J, Chick WL. A simple method for transplanting discordant islets into rats using alginate gel spheres. *Transplantation* 1995; 59: 1485-1487.
26. Zimmerberg J, Cohen FS, Finkelstein A. Micromolar Ca^{2+} stimulates fusion of lipid vesicles with planar bilayers containing a calcium-binding protein. *Science* 1980; 210: 906-908.
27. Chowdary KPR, Babu KVVS. A comparative evaluation of ethyl cellulose, gelatin and calcium alginate microcapsules prepared by complex emulsion methods. *Ind J Pharm Sci* 1988; 50: 173-175.
28. Bodmeier R, Chen H, Paeratakul O. A novel approach to the oral delivery of micro- or nanoparticulates. *Pharm Res* 1989; 3: 413-417.
29. Rajaonarivony M, Vauthier C, Couaraze G, Puisieux F, Couvreur P. Development of a new drug carrier made from alginate. *J Pharm Sci* 1993; 82: 912-917.
30. Pillay V, Dangor CM, Govender T, Moopanar KR, Hurbans N. Ionotropic gelation: encapsulation of indomethacin in calcium alginate gel discs. *J Microencapsulation* 1998; 15: 215-226.
31. Pillay V, Dangor CM, Govender T, Moopanar KR, Hurbans N. Drug release modulation from crosslinked calcium alginate microdiscs. 1. Evaluation of the concentration dependency of sodium alginate on drug entrapment capacity, morphology and dissolution rate. *Drug Deliv* 1998; 5: 25-34.
32. Pillay V, Dangor CM, Govender T, Moopanar KR, Hurbans N. Drug release modulation from crosslinked calcium alginate microdiscs. 2. Swelling, compression and stability of the hydronamically-sensitive calcium alginate matrix and the associated drug release mechanisms. *Drug Deliv* 1998; 5: 35-46.
33. Lewis G, Mathieu D, Phan-Tan-Luu R. *Pharmaceutical Experimental Design*, Marcel Dekker, New York, 1999; pp 265-276.
34. Kim C-K, Lee E-J. The controlled release of blum dextran from alginate beads. *Int J Pharm* 1992; 79: 11-19.
35. Lee B-J, Min G-H. Preparation and release characteristics of polymer-reinforced and coated alginate beads. *Arch Pharm Res* 1995; 18: 183-188.
36. Ostberg T, Vesterhus L, Graffner C. Calcium alginate matrices for oral multiple unit administration: II. Effect of process and formulation factors on matrix properties. *Int J Pharm* 1993; 97: 183-193.
37. Lee B-J, Min G-H. Oral controlled release of melatonin using polymer-reinforced and coated alginate beads. *Int J Pharm* 1996; 144: 37-46.

38. Wang K, He Z. Alginate-konjac glucomannan-chitosan beads as controlled release matrix. *Int J Pharm* 2002; 244: 117-126.
39. Carter SJ (eds.). *Tutorial Pharmacy*, CBS Publishers & Distributors, New Delhi, India, 1986; pp 225-226.
40. Montgomery DC. Ch 1. Introduction. *Design and Analysis of Experiments*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2001; pp 1-20.
41. Shu XZ, Zhu KJ. The release behavior of brilliant blue from calcium-alginate gel beads coated by chitosan: the preparation method effect. *Eur J Pharm Biopharm* 2002; 53: 193-201.
42. Skjak-Brae G, Grasdalen KH, Draget KI, Smidsrod O. Inhomogeneous polysaccharide ionic gels. *Carbohydr Polym* 1989; 10: 31-54.
43. Polk A, Amsden B, Yao KD, Peng T, Goosen MFA. Controlled release of albumin from chitosan-alginate microcapsules. *J Pharm Sci* 1994; 83: 178-185.
44. Iannuccelli V, Coppi G, Bernabei MT, Camerini R. Air compartment multiple-unit system for prolonged gastric residence. Part I. Formulation study. *Int J Pharm* 1998; 174: 47-54.