

Pepsina capturada en gránulos gelificados de κ -carragenato reticulados mediante actividad ionotrópica para una mejora de la estabilidad: Optimización y caracterización fisicoquímica mediante el diseño de Box-Behnken

Ionotropically cross-linked κ -carrageenan gel beads of pepsin for stability improvement: optimization and physicochemical characterization using Box-Behnken design

SANKALIA MG*, SANKALIA JM, SUTARIYA VB Y MASHRU RC.

Centre of Relevance and Excellence in Novel Drug Delivery Systems, Pharmacy Department, G. H. Patel Building, Donor's Plaza, The M. S. University of Baroda, Fatehgunj, Vadodara – 390 002, Gujarat, India.

Teléfono: +91-265-2434187 / 2794051. Fax: +91-265-2418928.

Correo electrónico: sankalia_mayur@hotmail.com

RESUMEN

En este trabajo se examina la influencia de los parámetros de proceso, particularmente la concentración de κ -carragenato, la concentración de cloruro potásico y el tiempo de endurecimiento, en pepsinas capturadas en gránulos de κ -carragenato reticulados mediante actividad ionotrópica para la mejora de su estabilidad mediante la metodología de superficie de respuesta. Se utilizó un diseño de Box-Behnken para investigar el efecto de las variables de proceso en la captura, el tiempo necesario para la liberación del 50% de las enzimas (T_{50}), el tiempo necesario para la liberación del 90% de las enzimas (T_{90}) y el tamaño de partícula. Los gránulos se prepararon mediante el vertido de gotas de κ -carragenato con pepsina en una solución de cloruro potásico agitada magnéticamente. El perfil de liberación enzimática *in vitro* de los gránulos se ajustó a varios modelos cinéticos de liberación para comprender el mecanismo de liberación. La caracterización topográfica se realizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y la captura se confirmó a través de espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y calorimetría diferencial de barrido (DSC). La prueba de estabilidad se realizó según las indicaciones de ICH para las zonas III y IV. Una matriz polimérica preparada con un 3,0% p/v de κ -carragenato y 0,3 M de cloruro potásico mediante el método de gelificación ionotrópica, con un tiempo de endurecimiento de 10 minutos provocó la producción de gránulos caracterizados por un disco esférico con un centro aplanado, una ausencia de agregados, una captura de más del 80% y un valor T_{90} inferior a 40 minutos. Se observó que la vida de almacenamiento de los gránulos cargados con pepsina aumentó hasta los 3,24 años en comparación con los 0,97 años de la formulación convencional. Se puede concluir que la metodología propuesta se puede utilizar para preparar gránulos de κ -carragenato cargados con pepsina para la mejora de la estabilidad. Además, se concluyó que la selección adecuada de la concentración de carragenato con control de la velocidad de liberación y su potencial interactivo para la reticulación es importante, y determinará el tamaño y la forma general de los gránulos, la duración y el patrón de los perfiles de disolución y la capacidad de carga de la enzima.

PALABRAS CLAVE: Biopolímero. Carragenato. Disolución. Hidrogel. Gelificación ionotrópica. Pepsina. Estabilidad. Análisis térmico.

ABSTRACT

This work examines the influence of process parameters, namely κ -carrageenan concentration, potassium chloride concentration, and hardening time, on pepsin entrapped in ionotropically crosslinked κ -carrageenan beads for improvement of its stability using response surface methodology. A Box-Behnken design was employed to investigate the effect of process variables on the entrapment, time required for 50% enzyme release (T_{50}), time required for 90% enzyme release (T_{90}), and particle size. The beads were prepared by dropping the κ -carrageenan containing pepsin into a magnetically stirred potassium chloride solution. In vitro enzyme release profile of the beads was fitted to various release kinetics models in order to understand the release mechanism. Topographical characterization was carried out by SEM, and entrapment was confirmed by FTIR and DSC. Stability testing was carried out according to the ICH guidelines for zones III and IV. A polymeric matrix prepared by 3.0% w/v κ -carrageenan and 0.3 M potassium chloride using the ionotropic gelatin method, with a hardening time of 10 min resulted in the production of beads characterized by a spherical disk shaped with a collapsed center, an absence of aggregates, an entrapment of more than 80%, and a T_{90} of less than 40 min. The shelf-life of the pepsin-loaded beads was found to increase to 3.24 years compared with 0.97 years for the conventional formulation. It can be inferred that the proposed methodology can be used to prepare pepsin-loaded κ -carrageenan beads for stability improvement. In addition, the proper selection of rate-controlling carrageenan 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, and the enzyme loading capacity.

KEYWORDS: Biopolymer. Carrageenan. Dissolution. Hydrogel. Ionotropic gelation. Pepsin. Stability. Thermal analysis.

Fecha de recepción: 17-11-2006

Fecha de aceptación: 28-06-2007

INTRODUCCIÓN

Las enzimas proteolíticas se clasifican en función de sus mecanismos catalíticos. Todas las proteasas pertenecen a unas de estas cuatro clases mecanicistas: serina, cisteína, metalo o aspartil proteasas¹. La pepsina (EC 3.4.23, Figura 1) es una enzima monomérica que pertenece a la familia de las proteasas aspárticas que se sintetiza como un zimógeno en el revestimiento de células epiteliales del estómago². Se caracteriza por la presencia de dos residuos de ácido aspártico en su centro activo y es inhibida por la pepstatina, un pentapéptido sintetizado de forma natural por cepas de *streptomyces*. Tras la secreción en el entorno ácido del lumen, el zimógeno (pepsinógeno) experimenta una serie de cambios adaptativos acompañados de la auto-segmentación del prosegmento, dando lugar la forma madura y activa de la enzima³. El pepsinógeno y su forma madura, la pepsina, se diferencian en su estructura primaria en 44 residuos de aminoácidos en el N-terminal del zimógeno que se eliminan tras la activación. La parte de pepsina del zimógeno contiene 327 aminoácidos², tiene una masa molecular de 36 kDa⁴ y, como todas las proteasas aspárticas de los mamíferos, es un monómero bilobal que contiene un eje doble aproximado de simetría entre los dos dominios de lámina β . El prosegmento abarca el centro activo; por tanto, restringe el acceso de sustratos y convierte al zimógeno en inactivo. A diferencia de su zimógeno precursor,

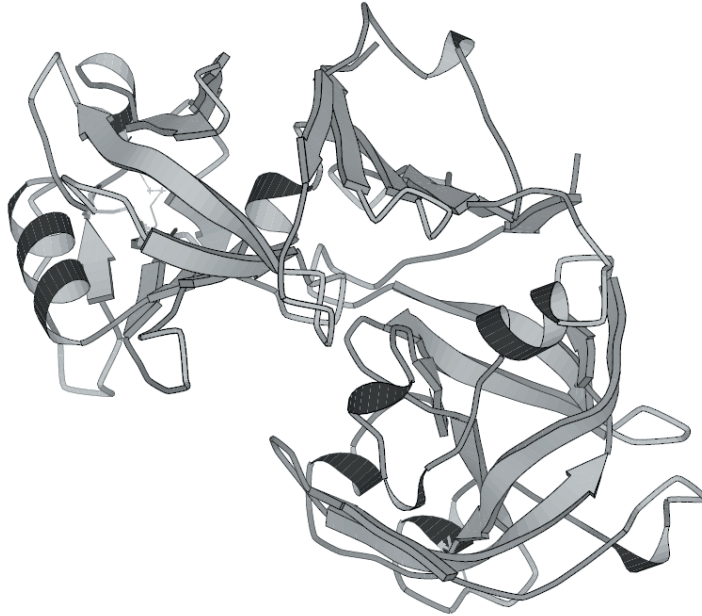
INTRODUCTION

Proteolytic enzymes are classified on the basis of their catalytic mechanisms. All the proteases belong to one of four mechanistic classes and are either serine, cysteine, metallo or aspartyl proteases¹. Pepsin (EC 3.4.23, Figure 1) is a monomeric enzyme belonging to the aspartic protease family that is synthesized as a zymogen in the epithelial cells lining of the stomach². It is characterized by the presence of two aspartic acid residues at the active site and is inhibited by pepstatin, a pentapeptide naturally synthesized by strains of streptomyces. Upon secretion into the acidic environment of the lumen, the zymogen (pepsinogen) undergoes a series of conformational changes accompanied by self-cleavage of the prosegment, resulting in the active, mature form of the enzyme³. Pepsinogen and its mature form, the pepsin, differ in primary sequence by 44 amino acid residues at the N-terminus of the zymogen that are removed upon activation. The pepsin portion of the zymogen contains 327 amino acids², with a molecular mass of 36 kDa⁴ and like all mammalian aspartic proteinases, it is a bilobal monomer, containing an approximate 2-fold axis of symmetry between two β -sheet domains. The prosegment covers the active site thereby restricting substrate access and rendering the zymogen inactive. Unlike its zymogen precursor, conformational changes of pepsin at pH values higher than 6 causes irreversible decreases in catalytic activity⁵.

los cambios adaptativos de la pepsina en valores de pH superiores a 6 producen descensos irreversibles de la actividad catalítica⁵.

FIGURA 1.- Estructura en 3D de pepsina humana (homo sapiens) 3a (código PDB: 1psn; 326 residuos) refinado a una resolución de 2,20 Å.

FIGURE 1.- 3D structure of human (homo sapiens) pepsin 3a (PDB code: 1psn; 326 residues) refined at 2.20 Å resolution.



Las formulaciones farmacéuticas con pepsina y otras enzimas digestivas se deben almacenar a una temperatura comprendida entre 2–8 °C u 8–25 °C. En estas condiciones, la vida de almacenamiento deben ser de 1 año aproximadamente. La estabilidad de las formulaciones con pepsina se puede mejorar mediante la captura de la pepsina en hidrogeles biodegradables reticulados mediante actividad ionotrópica. Además, las enzimas capturadas son menos propensas a la interferencia con los excipientes de la formulación y son estables a temperaturas elevadas. Las formas de dosificación de varias unidades son especialmente útiles para la administración de enzimas, péptidos/proteínas y vacunas⁶. Estas ventajas tienen un elevado interés comercial para la industria farmacéutica. Por tanto, se llevó a cabo una investigación para desarrollar una formulación de pepsina con una larga vida de almacenamiento mediante su captura en gránulos de κ-carragenato biodegradables reticulados mediante actividad ionotrópica, consiguiendo un uso eficiente y mejorado de la enzima. En el

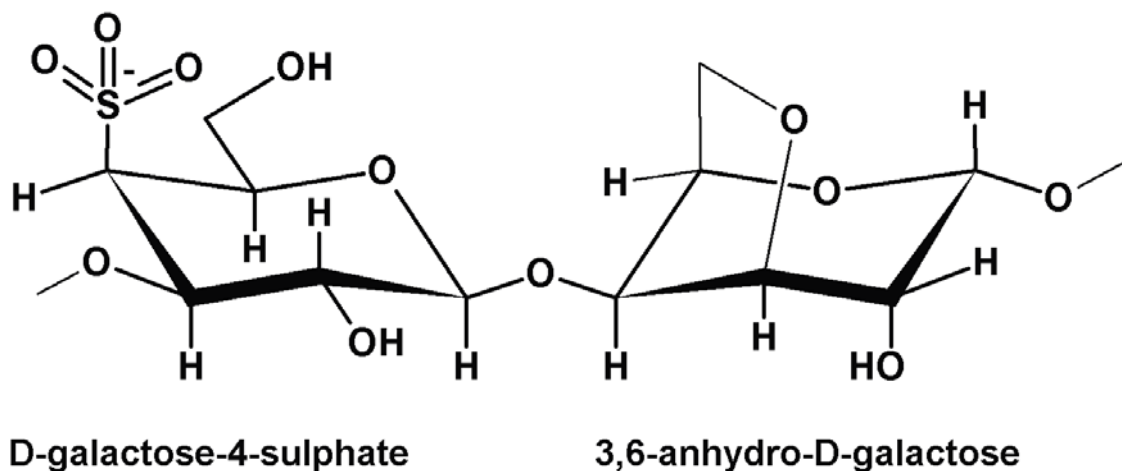
Pharmaceutical formulations containing pepsin and other digestive enzymes need to be stored at 2–8°C or 8–25°C, under which conditions they must have a shelf-life of about 1 year. The stability of pepsin-containing formulations can be improved by entrapping them in ionotropically cross-linked biodegradable hydrogels. Moreover, entrapped enzymes are less prone to interference from the excipients of the formulation and are stable at higher temperatures. Multiple unit dosage forms are particularly useful for delivery of enzymes, peptides/proteins and vaccines⁶. These advantages are of great commercial interest to the pharmaceutical industry. Hence research was carried out to develop an extended shelf-life formulation of pepsin by entrapment in ionotropically crosslinked biodegradable κ-carrageenan beads, leading to better and efficient utilization of the enzyme. This paper also deals with *in vitro* dissolution studies and physicochemical characterization for evaluating the beads and their release behavior.

presente trabajo también se tratan estudios de disoluciones *in vitro* y la caracterización fisicoquímica para la evaluación de los gránulos y su comportamiento de liberación.

El uso de carragenatos es cada vez mayor en los estudios de formulaciones farmacéuticas⁷ como, por ejemplo, en microcápsulas para una administración continuada⁸ o en esferas reticuladas para una liberación controlada^{9,10}. Son polisacáridos de elevado peso molecular que se forman de manera natural extraídos de algas rojas. Se componen de copolímeros alternantes de β -D-galactosa y 3,6-anhidro- α -D-galactosa unidos por enlaces 1-3 y 1-4, respectivamente. Estas unidades se asocian alternando enlaces glicosídicos α -1,4 y β -1,4. En función del alga de la que se extraigan y de la técnica utilizada en la preparación, se producen tres tipos de carragenatos principales (Figura 2): kappa (κ)-carragenato, lambda (λ)-carragenato e iota (ι)-carragenato. Debido a la naturaleza iónica de estos polímeros, su gelificación está significativamente influenciada por la presencia de electrolitos. El κ -carragenato forma un gel con iones de potasio, pero también se gelifica en condiciones libres de sal. No obstante, los geles preparados en presencia de iones metálicos resultaron ser considerablemente más fuertes que aquéllos obtenidos en condiciones libres de sal. La estructura de los \bullet -carragenatos permite que segmentos de dos moléculas de carragenato formen las denominadas hélices dobles, que unen las moléculas de la cadena (es decir, K+) en una red tridimensional (un gel). Las temperaturas de fusión y gelificación del \bullet -carragenato dependen de diversos factores como, por ejemplo, la procedencia (alga roja), su concentración y, por tanto, su viscosidad, la presencia o ausencia de iones gelificantes, la concentración de iones gelificantes (principalmente K+), la presencia de otros cationes y la presencia de azúcares y/o resinas.

Carrageenans are being used increasingly in pharmaceutical formulation studies⁷, for example in microcapsules for sustained delivery⁸ or in cross-linked spheres for controlled release^{9,10}. They are naturally occurring high molecular weight polysaccharides extracted from red seaweed. They are made up of alternating copolymers of 1,3-linked β -D-galactose and 1,4-linked 3,6-anhydro- α -D-galactose. These units are joined by alternating α -1,4 and β -1,4 glycosidic linkages. Depending on the algae from which they are extracted and the technique used in the preparation, three main types of carrageenans (Figure 2) are produced: kappa (κ)-carrageenan, lambda (λ)-carrageenan, and iota (ι)-carrageenan. Because of the ionic nature of these polymers, their gelation is strongly influenced by the presence of electrolytes. κ -Carrageenan forms a gel with potassium ions but also undergoes gelation under salt-free conditions. However, gels prepared in the presence of metallic ions were substantially stronger than those obtained under salt-free conditions. The structure of \bullet -carrageenan allows segments of two carrageenan molecules to form so-called double helices, which bind the chain molecules (i.e., K+) in a three-dimensional network, a gel. The gelling and melting temperatures of \bullet -carrageenan depend on many factors like the source (red algae) from which it has been derived, its concentration and hence viscosity, the presence or absence of gelling ions, the concentration of gelling ions (mainly K+), the presence of other cations, and the presence of sugars and/or gums.

FIGURA 2.- Estructura química de κ -carragenato.
FIGURE 2.- Chemical structure of κ -carrageenan.



Cuando un polielectrolito, como el carragenato, se combina con un ión univalente/multivalente de la carga opuesta, puede formar un hidrogel físico conocido como hidrogel ionotrópico. El hidrogel ionotrópico, que puede degradarse y finalmente desintegrarse y disolverse, se mantiene unido mediante enredos moleculares y/o fuerzas secundarias, incluidas las fuerzas hidrófugas, fuerzas de enlaces H y fuerzas iónicas¹¹. Todas estas interacciones son reversibles y se pueden interrumpir mediante cambios en las condiciones físicas como, por ejemplo, la fuerza iónica, el valor de pH, la temperatura, la aplicación de tensión o la adición de solutos específicos que compitan con el ligando polimérico del sitio de afinidad de una proteína. Debido a estas características, el κ -carragenato se emplea como una matriz de captura para células y enzimas, así como para aditivos farmacéuticos y alimentarios. En el pasado, se realizaron investigaciones con gránulos de κ -carragenato de potasio reticulados convencionales para el desarrollo de un sistema de administración de fármacos de varias unidades^{9,12-14}. No obstante, no existe ninguna referencia en la literatura a trabajos relacionados con el uso de gránulos de κ -carragenato reticulados mediante actividad ionotrópica para capturar una proteína/enzima para prolongar su vida de almacenamiento. Por tanto, éste ha sido el objetivo elegido para el presente estudio.

When a polyelectrolyte, like carrageenan, is combined with a univalent/multivalent ion of the opposite charge, it may form a physical hydrogel known as an ionotropic hydrogel. Ionotropic hydrogel, which may degrade and eventually disintegrate and dissolve, are held together by molecular entanglements and/or secondary forces including ionic, H-bonding and hydrophobic forces¹¹. All these interactions are reversible and can be disrupted by changes in physical conditions such as the ionic strength, pH value, temperature, application of stress, or the addition of specific solutes that compete with the polymeric ligand for the affinity site on a protein. Because of these characteristics, κ -carrageenan is used as an entrapment matrix for enzymes and cells and as a pharmaceutical and food adjuvant. In the past, conventional crosslinked potassium- κ -carrageenan beads have been investigated for the development of multiple unit drug delivery systems^{9,12-14}. However, no reference to any work on the use of ionotropically cross-linked κ -carrageenan beads for entrapping a protein/enzyme to extend its shelf-life could be found in the literature. Hence this was the objective of the study.

MATERIAL AND METHODS

Materials

Bovine hemoglobin powder (Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, India) and trichloroacetic acid (TCA), hydrochloric acid (HCl), and

MATERIAL Y MÉTODOS

Materiales

El polvo de hemoglobina bovina (Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, India), el ácido tricloroacético (Qualigens Fine Chemicals, Mumbai, India), el ácido clorhídrico (HCl) y el bromuro potásico (KBr, grado IR) (Qualigens Fine Chemicals, Mumbai, India) se utilizaron como se recibieron sin modificación alguna. La pepsina purificada, el κ -carragenato, el cloruro potásico, el hidróxido sódico (NaOH), el reactivo fosfomolibdotúngstico y el ácido cítrico se adquirieron en S. D. Fine-Chem Ltd., Mumbai, India. El resto de productos químicos y disolventes eran de grado analítico y se utilizaron sin una posterior purificación. Durante todo el estudio, se utilizó agua desionizada sometida a doble destilación.

Caracterización del carragenato

El carragenato proporcionado procedía de musgo perlado de Irlanda (*Chondrus Crispus*), del que se tiene conocimiento que contiene carragenatos tipo kappa (fracción gelificante) y lambda (fracción no gelificante) como principales constituyentes. La prueba de la muestra de carragenato se realizó según la prueba de identificación B (prueba de constancia del gel) y D (estudio FTIR) de USP-27 NF-22, y se apreció que se trataba de kappa-carragenato con una fracción no gelificante (lambda-carragenato) inferior al 5 por ciento. Además, el kappa-carragenato se confirmó mediante la observación del fenómeno de sinéresis, que no se observa en los geles de iota-carragenato. El tamaño de partícula del carragenato se determinó con el analizador de tamaño de partícula por difracción láser (MAN 0244/ HYDRO 2000 SM, Malvern Instruments Ltd., Reino Unido), y se utilizó acetonitrilo como vehículo. Además, se observó que el 90% de las partículas tenían un tamaño inferior a 156,96 μm . La densidad de partícula se determinó con el método de desplazamiento de líquido (en el que se utilizó benceno) y se obtuvo un resultado de 0,89 g/cm^3 . La viscosidad de la solución al 1,5% en agua destilada desionizada a 25 °C se calculó con el viscosímetro de Oswald y el resultado obtenido fue 40 cp.

potassium bromide (KBr, IR grade) (Qualigens Fine Chemicals, Mumbai, India) were used as received. Purified pepsin, κ -carrageenan, potassium chloride, sodium hydroxide (NaOH), phosphomolybdotungstic reagent, and citric acid were purchased from S. D. Fine-Chem Ltd., Mumbai, India. All the other chemicals and solvents were of analytical grade and were used without further purification. Through out the study, the water used was deionized double-distilled water.

Characterization of carrageenan

The carrageenan procured was derived from Irish moss (*Chondrus Crispus*), which is known to contain kappa (gelling fraction) and lambda (non-gelling fraction) carrageenan as major constituents. Carrageenan sample was tested according to the identification test B (gel constancy test) and D (FTIR study) of USP-27 NF-22, and was found to be kappa-carrageenan with non-gelling fraction (lambda-carrageenan) of less than 5 percent. Moreover, the kappa-carrageenan was confirmed by observing the syneresis phenomenon, which is not observed with iota-carrageenan gels. Particle size of carrageenan was determined with the laser diffraction particle size analyzer (MAN 0244/ HYDRO 2000 SM, Malvern Instruments Ltd., UK) using acetonitrile as a vehicle and was found to contain 90% particle of the size less than 156.96 μm . Particle density was determined by liquid displacement method using benzene and was found to be 0.89 g/cm^3 . Viscosity of the 1.5% solution in deionized distilled water at 25°C was calculated using Oswald viscometer and was found to be 40 cp.

Preparation of beads

A concentrated solution of κ -carrageenan in distilled water was prepared by heating a dispersion of the powder to 70°C to get homogenous solution and cooled to 40°C. The required quantity of the enzyme (200 mg pepsin in 50 ml of final $\hat{\epsilon}$ -carrageenan solution) was dissolved in a small quantity of water and mixed with the concentrated κ -carrageenan solution. The final concentration of κ -carrageenan was adjusted to the range of 2.5-3.5% w/v and was used after being degassed under vacuum. The beads were

Preparación de los gránulos

Se preparó una solución concentrada de κ -carragenato en agua destilada mediante el calentamiento de una dispersión de polvo a 70 °C para obtener una solución homogénea y se enfrió hasta los 40 °C. La cantidad necesaria de enzima (200 mg de pepsina en 50 ml de solución de κ -carragenato final) se disolvió en una pequeña cantidad de agua y se mezcló con la solución de κ -carragenato concentrada. La concentración final de κ -carragenato se ajustó en un intervalo comprendido entre 2,5 y 3,5% p/v, y se utilizó tras su desgasificación en vacío. La preparación de los gránulos se realizó mediante el vertido de gotas de la solución de κ -carragenato (10 ml) con pepsina desde un dispositivo de goteo similar al de una jeringa con una aguja hipodérmica de punta plana con un calibre de 18G \times 1/2" en una solución de cloruro potásico agitada magnéticamente (40 ml) a una velocidad de 5ml/min y se dejó que se endureciera durante un período de tiempo específico. Los distintos niveles de factores independientes (κ -carragenato, cloruro potásico y tiempo de endurecimiento) y las respuestas condicionadas (% de captura, T_{50} , T_{90} y tamaño de partícula) utilizados en el estudio aparecen en la Tabla 1. Los gránulos se recolectaron mediante la decantación de la solución de cloruro potásico, se lavaron con agua desionizada y se secaron a peso constante en un desecador de vacío (Tarsons Products Pvt. Ltd., Kolkata, India) a temperatura ambiente durante 48 horas.

prepared by dropping the κ -carrageenan solution (10 ml) containing pepsin from the dropping device such as syringe using a 18G \times 1/2" flat-tip hypodermic needle into a magnetically stirred potassium chloride solution (40 ml) at a rate of 5 ml/min and were allowed to harden for specific time. Different levels of independent factors (κ -carrageenan, potassium chloride and hardening time) and the dependent responses (% entrapment, T_{50} , T_{90} , and particle size) used in the study are listed in Table 1. The beads were collected by decanting the potassium chloride solution, washed with deionized water and dried to a constant weight in a vacuum desiccator (Tarsons Products Pvt. Ltd., Kolkata, India) at room temperature for 48 h.

TABLA 1. Variables de proceso y respuestas con restricciones para el diseño de Box-Behnken.
TABLE 1. Process variables and responses with constraints for box-behnken design.

Factores <i>Factors</i>	Niveles codificados <i>Coded levels</i>	Niveles reales <i>Actual levels</i>
A: Concentración de κ -carragenato (%p/v) <i>A: κ-Carrageenan Concentration (%w/v)</i>	-1 0 1	2,50 3,00 3,50
B: Concentración de cloruro potásico (M) <i>B: Potassium Chloride Concentration (M)</i>	-1 0 1	0,3 0,5 0,7
C: Tiempo de endurecimiento (min) <i>C: Hardening Time (min)</i>	-1 0 1	10 20 30
Respuestas <i>Responses</i>	Restricción <i>Constraint</i>	
M_1 : % de captura <i>M₁: % Entrapment</i>	>80%	
M_2 : T_{50} (min) <i>M₂: T₅₀ (min)</i>	-	
M_3 : T_{90} (min) <i>M₃: T₉₀ (min)</i>	<40 min	
M_4 : Tamaño de partícula (mm) <i>M₄: Particle size (mm)</i>	-	

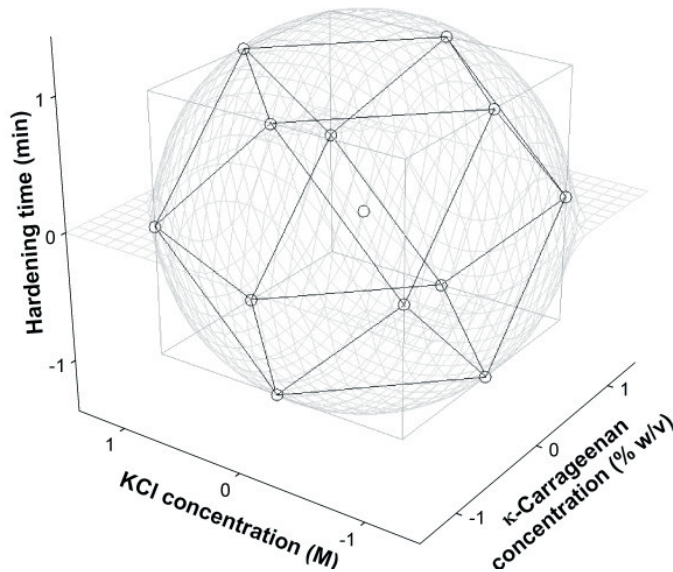
Diseño de Box-Behnken

Los diseños Box-Behnken (BBD) son métodos de superficie de respuesta de un dominio esférico cuya propiedad más interesante es que cada factor sólo tiene 3 niveles^{15,16}. Se prueba cada combinación de valores extremos de dos variables, y el resto de variables adquieren un valor codificado de cero. El BBD es un diseño esférico en el que todos los puntos se encuentran en una esfera de radio $\sqrt{2}$ y en el centro del borde de un cubo (Figura 3). Además, el diseño de Box-Behnken no contiene ningún punto en los vértices de la región del cubo creada por los límites superiores e inferiores de cada variable. Su geometría es la misma que la del diseño Doehlert de 3 factores, pero con una orientación distinta¹⁷. Otra propiedad ventajosa del diseño de Box-Behnken es que los factores de inflación suelen ser reducidos (1,01 para la matriz presente), siempre que se añadan suficientes puntos centrales. Por tanto, los estimadores son casi independientes y la matriz es casi ortogonal.

Box-Behnken design

Box-Behnken designs (BBD) are response surface methods for a spherical domain whose most interesting property is that each factor takes only 3 levels^{15,16}. Each combination of the extreme values of two of the variables is tested, the remaining variables taking a coded level of zero. BBD is a spherical design, with all points lying on a sphere of $\sqrt{2}$ radius and on the center of the edge of a cube (Figure 3). Also, the Box-Behnken design does not contain any points at the vertices of the cubic region created by the upper and the lower limits for each variable. Its geometry is the same as that of the 3 factor Doehlert design, but in a different orientation¹⁷. Another advantageous property of the Box-Behnken design is that inflation factors are normally low (1.01 for the present matrix), provided sufficient center points are added. The estimators are thus nearly independent, and the matrix nearly orthogonal.

FIGURA 3.- Vista en tres dimensiones del diseño de Box-Behnken.
FIGURE 3.- Three-dimensional view of Box-Behnken design.



Los diseños factoriales de tres niveles se pueden utilizar para conseguir la captura máxima y un T_{90} de mayor duración. No obstante, estos diseños implican un gran número de análisis ($N=3^f$, donde f es el número de variables independientes) en comparación con el número total de coeficientes cuadráticos a determinar (m). Es posible utilizar diseños compuestos centrales (CCD) como alternativa para moderar esta situación. Los análisis adicionales (punto inicial y central del diseño) se presentan para aumentar los diseños factoriales de dos niveles para estimar los coeficientes de la ecuación modelo eficazmente. El número de análisis que se deberán realizar en los CCD, ortogonales y rotables, es $N=2^f+2f+1$ (sin repeticiones), que es considerablemente inferior al número de los diseños factoriales de tres niveles. Por este motivo, el CCD se utiliza de forma generalizada en la optimización experimental. No obstante, Box y Behnken¹⁵, que propusieron algunos diseños de tres niveles nuevos para el estudio de variables cuantitativas, idearon un diseño más eficaz. Estos diseños, más uniformes que cualquiera de los otros, mostraron unas funciones de interpolación excelentes. El número total de análisis sin necesidad de repeticiones para utilizar el BBD es 13, que es un número incluso inferior al de un CCD. Por tanto, el BBD consigue la máxima eficacia (relación entre el número de coeficientes sometidos a evaluación (m) y el número de análisis (N))

Three-level full factorial designs can be used to attain the maximum entrapment and a longer T_{90} . However, these designs involve a very large number of runs ($N=3^f$, where f is the number of the independent variables) compared with the total number of quadratic coefficients to be determined, m . Central composite designs (CCD) can alternatively be used to alleviate this situation. Extra runs (star and center points of design) are introduced to augment two-level factorial designs to estimate the coefficients of the model equation efficiently. The number of runs to be made in both orthogonal and rotatable CCD are $N=2^f+2f+1$ (without replications), which is considerably lower than for three-level factorial designs. For this reason, CCD is widely used in experimental optimization. However, a more efficient design was devised by Box and Behnken¹⁵, who proposed some new three level designs for the study of quantitative variables. These designs, being more uniform than any other, show excellent interpolation features. The total number of runs without replication needed for using BBD is 13, which is even smaller than for a CCD. Thus, a BBD leads to the maximum efficiency (ratio between the number of coefficients to be evaluated, m , and the number of runs, N , in the design). CCD usually has axial points outside the 'cube' (unless alpha, the axial spacing needed to ensure orthogonality, is specified as less than or equal to one). BBD do not have axial points,

del diseño). En el CCD suelen aparecer puntos axiales fuera del “cubo” (salvo alfa, el espacio axial necesario para garantizar la ortogonalidad que se especifica como inferior o igual a uno). En el BBD no aparecen puntos axiales, por lo que todos los puntos del diseño están dentro del área de operación segura. El BBD también garantiza que no se establezcan todos los factores en sus niveles elevados de forma simultánea¹⁵. Además, cada factor sólo requiere tres niveles en lugar de los cinco necesarios en el CCD (salvo alfa, que es igual a uno), lo que puede resultar más práctico experimentalmente y menos costoso de llevar a cabo que el CCD con el mismo número de factores. Por este motivo, el BBD es un diseño que se aplica con mucha frecuencia en distintos ámbitos científicos¹⁸⁻²².

Antes de utilizar el diseño, se llevaron a cabo un determinado número de ensayos preliminares para determinar las condiciones del proceso que daría lugar a los gránulos. En el presente estudio, la matriz del BBD contiene 13 puntos (con $f=3$). Para determinar el error experimental, se repitió tres veces el experimento en el punto central en distintos días. Los valores del porcentaje de captura media, T_{50} , T_{90} y el tamaño de partícula de los puntos replicados centrales fueron $76,86\pm 0,21\%$, $33,82\pm 0,22$ min, $44,09\pm 0,32$ min y $1,93\pm 0,04$ mm, respectivamente. Además, se observó una buena reproducibilidad del proceso. Para predecir la zona óptima, se ajustó una función polinómica de segundo grado para establecer la correlación entre las variables y las respuestas. El comportamiento del sistema se explicó mediante la siguiente ecuación cuadrática:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \sum \beta_{ii} x_i^2 \quad (1)$$

donde Y es la respuesta prevista, β_0 es el término de desviación (constante del modelo), β_i es la desviación lineal, β_{ii} es la desviación al cuadrado, β_{ij} es el efecto de la interacción y x_i es el valor codificado sin dimensión de las variables independientes (X_i). A partir de la ecuación cuadrática, se generaron las superficies de respuesta, y se identificó la región superpuesta de las respuestas con restricción como la región óptima en la que se podrían producir los gránulos con los criterios deseados. Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) para determinar la significación de la ecuación ajustada. Todos los tratamientos analíticos se realizaron con software

thus all design points fall within the safe operating zone. BBD also ensure that all factors are never set at their high levels, simultaneously¹⁵. Also, each factor requires only three levels instead of the five required for CCD (unless alpha is equal to one), which may be experimentally more convenient and less expensive to run than CCD with the same number of factors. For this reason, BBD are highly applied in very different scientific frames¹⁸⁻²².

Before using the design, a number of preliminary trials were conducted to determine the process conditions that yielded beads. In the present study, the BBD matrix contains 13 points (with $f=3$). To determine the experimental error, the experiment at the center point was repeated three times on different days. The mean percent entrapment, T_{50} , T_{90} , and particle size at the center-replicated points were $76.86\pm 0.21\%$, 33.82 ± 0.22 min, 44.09 ± 0.32 min, and 1.93 ± 0.04 mm, respectively, and indicated good reproducibility of the process. For predicting the optimal region, a second-order polynomial function was fitted to correlate the relationship between the variables and the responses. The behavior of the system was explained using the following quadratic equation:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \sum \beta_{ii} x_i^2 \quad (1)$$

where Y is the predicted response, β_0 is the offset term (model constant), β_i is the linear offset, β_{ii} is the squared offset, β_{ij} is the interaction effect, and x_i is the dimensionless coded value of the independent variables (X_i). From the quadratic equation, response surfaces were generated, and the overlapping region of the responses with constraint was identified as the optimum region where the beads matching the desired criteria could be produced. Analysis of variance (ANOVA) was carried out to determine the significance of the fitted equation. All analytical treatments were performed using NCSS software²³. The quality of fit of the polynomial model equation was expressed by the adjusted coefficient of determination R^2_{adj} . All experimental designs were randomized to exclude any bias. The process variables, their coded experimental values, and the responses are listed in Table 2, while the design is also shown geometrically in Figure 3.

del NCSS²³. La calidad del ajuste de la ecuación del modelo polinómico se expresó a través del coeficiente ajustado de determinación R^2_{adj} . Todos los diseños experimentales se escogieron al azar para excluir cualquier predisposición. Las variables de proceso, sus valores experimentales codificados y las respuestas aparecen en la Tabla 2, y el diseño expresado geoméricamente aparece en la Figura 3.

TABLA 2. Matriz del diseño de Box-Behnken y resultados de las respuestas medidas.

TABLE 2. Matrix of Box-Behnken design and results for the measured responses.

Factores/Niveles <i>Factors/ levels</i>				Respuestas <i>Responses</i>			
SE ^a	κ-carragenato (%p/v)	Cloruro potásico (M)	Tiempo de endurecimiento (min)	Captura % Entrapment	T ₅₀ (min)	T ₉₀ (min)	Tamaño de partícula (mm)
ES ^a	κ-carrageenan (% w/v)	Potassium chloride (M)	Hardening time (min)		T ₅₀ (min)	T ₉₀ (min)	Particle size (mm)
5	-1	-1	0	64,90±0,11	19,20±0,15	29,70±0,15	1,83±0,03
11	1	-1	0	84,80±0,09	35,90±0,16	49,30±0,15	2,36±0,04
2	-1	1	0	57,48±0,12	32,65±0,19	46,10±0,21	1,65±0,04
14	1	1	0	77,85±0,11	48,30±0,14	67,80±0,19	2,21±0,05
7	-1	0	-1	66,06±0,09	22,30±0,24	32,50±0,24	1,71±0,05
9	1	0	-1	85,70±0,11	38,47±0,18	51,90±0,23	2,33±0,04
1	-1	0	1	60,47±0,10	29,10±0,20	44,10±0,20	1,66±0,05
12	1	0	1	81,69±0,11	45,50±0,19	62,00±0,29	2,20±0,04
3	0	-1	-1	81,41±0,13	24,50±0,19	35,30±0,20	2,11±0,05
6	0	-1	1	77,20±0,10	33,05±0,16	46,05±0,15	2,05±0,05
15	0	1	-1	73,81±0,09	37,86±0,17	50,83±0,12	1,86±0,03
8	0	1	1	69,32±0,12	44,60±0,12	62,95±0,27	1,81±0,05
13	0	0	0	77,03±0,12	33,70±0,12	44,15±0,17	1,95±0,02
4	0	0	0	76,93±0,13	34,07±0,24	43,74±0,25	1,89±0,04
10	0	0	0	76,63±0,12	33,69±0,22	44,38±0,20	1,95±0,05

^a ES: Secuencia experimental.

^a ES, experimental sequence.

Ajuste de la curva

Se evaluó el patrón de liberación *in vitro* para comprobar la bondad del ajuste con respecto a la cinética de liberación de orden cero (Ec. 2), la cinética de liberación de primer orden^{24,25} (Ec. 3), la raíz cuadrada de la ecuación de tiempo de Higuchi²⁶ (Ec. 4), la ecuación de ley exponencial de Korsmeyer-Peppas^{27,28} (Ec. 5) y la raíz cúbica de la ecuación de tiempo de Hixson-Crowell²⁹ (Ec. 6). La bondad del ajuste se evaluó con los valores de r (coeficiente de correlación). Para obtener una mejor comprensión, se realizó el análisis residual³⁰ de los modelos anteriores en la formulación optimizada.

Curve fitting

The *in vitro* release pattern was evaluated to check the goodness of fit to the zero-order release kinetics (Eq. 2), first-order release kinetics^{24,25} (Eq. 3), Higuchi's square root of time equation²⁶ (Eq. 4), Korsmeyer-Peppas' power law equation^{27,28} (Eq. 5), and Hixson-Crowell's cube root of time equation²⁹ (Eq. 6). The goodness of fit was evaluated using the r (correlation coefficient) values. To obtain a better understanding residual analysis³⁰ of the above models was performed on the optimized formulation.

$$Q_1 = Q_0 + K_0 t \quad (2)$$

donde Q_1 es la cantidad de fármaco disuelto en tiempo t , Q_0 es la cantidad inicial de fármaco de la solución (por lo general $Q_0=0$), K_0 es la constante de liberación de orden cero y t es el tiempo de liberación.

$$Q_1 = Q_0 e^{-k_1 t} \quad (3)$$

donde Q_1 es la cantidad de fármaco disuelto en tiempo t , Q_0 es la cantidad inicial de fármaco de la solución, K_1 es la constante de liberación de primer orden y t es el tiempo de liberación.

$$Q_t = K_H \sqrt{t} \quad (4)$$

donde Q_1 es la cantidad de fármaco disuelto en tiempo t , K_H es la constante de disolución de Higuchi y t es el tiempo de liberación.

$$Q_1/Q_\infty = K_K t^n \quad (5)$$

donde Q_1 es la cantidad de fármaco disuelto en tiempo t , Q_∞ es la cantidad de fármaco disuelto tras tiempo infinito (todo el fármaco cargado en la formulación), Q_1/Q_∞ es la liberación fraccionada del fármaco en tiempo t , K_K es una constante que incorpora las características estructurales y geométricas de la forma de dosificación, n es el exponente de liberación (difusional), que depende del mecanismo de liberación y la forma de la matriz probada³¹, y t es el tiempo de liberación. En la Tabla 3 aparece una interpretación del exponente difusional.

$$Q_1 = Q_0 + K_0 t \quad (2)$$

where Q_1 is the amount of drug dissolved in time t , Q_0 is the initial amount of drug in the solution (usually $Q_0=0$), K_0 is the zero-order release constant, and t is the release time.

$$Q_1 = Q_0 e^{-k_1 t} \quad (3)$$

where Q_1 is the amount of drug dissolved in time t , Q_0 is the initial amount of drug in the solution, K_1 is the first-order release constant, and t is the release time.

$$Q_t = K_H \sqrt{t} \quad (4)$$

where Q_1 is the amount of drug dissolved in time t , K_H is the Higuchi dissolution constant, and t is the release time.

$$Q_1/Q_\infty = K_K t^n \quad (5)$$

where Q_1 is the amount of drug dissolved in time t , Q_∞ is the amount of drug dissolved after infinite time (all the drug loaded in the formulation), Q_1/Q_∞ is the fractional release of the drug in time t , K_K is a constant incorporating the structural and geometric characteristics of the dosage form, n is the release (diffusional) exponent, which depends on the release mechanism and the shape of the matrix tested³¹, and t is the release time. An interpretation of the diffusional exponent is given in Table 3.

TABLA 3. Interpretación del exponente de liberación de la ley exponencial de Korsmeyer-Peppas.
TABLE 3. Interpretation of Korsmeyer-Peppas power law release exponent.

Exponente de liberación (n) <i>Release exponent (n)</i>	Mecanismos de transporte de fármaco <i>Drug transport mechanism</i>	Velocidad expresada en función de tiempo <i>Rate as a function of time</i>
0,5	Difusión de Fickian <i>Fickian diffusion</i>	$t^{-0.5}$
$0,5 < n < 1,0$	Transporte anómalo <i>Anomalous transport</i>	t^{-n-1}
1,0	Transporte caso II <i>Case-II transport</i>	Liberación de orden cero <i>Zero order release</i>
Superior a 1,0 <i>Higher than 1.0</i>	Transporte supercaso II <i>Super Case-II transport</i>	t^{-n-1}

$$Q_0^{1/3} - Q_1^{1/3} = K_s t \quad (6)$$

donde Q_0 es la cantidad inicial de fármaco de la forma farmacéutica de dosificación, Q_1 es la cantidad restante de fármaco de la forma farmacéutica de dosificación en tiempo t , K_s es una constante que incorpora la relación superficie-volumen y t es el tiempo de liberación.

Para comprender el mecanismo de liberación, los datos de liberación del lote optimizado se ajustaron a una ecuación empírica propuesta por Kopcha³² (Ec. 7),

$$M = At^{1/2} + Bt \quad (7)$$

En esta ecuación (Ec. 7), M ($\leq 70\%$) es el porcentaje de fármaco liberado en tiempo t , mientras que A y B son los términos de erosión y difusión, respectivamente. De acuerdo con esta ecuación, si la proporción difusión-erosión se corresponde con $A/B=1$, el mecanismo de liberación implica difusión y erosión por igual. Si $A/B>1$, la difusión prevalece. La erosión predomina si $A/B<1$.

Caracterización de los gránulos

Estimación de la pepsina

La actividad de la pepsina se midió mediante el método modificado de Anson³³, en el que se determinó la cantidad de péptidos (no precipitables mediante TCA) y se sometió a estudio con el reactivo fosfomolibdotúngstico. Para preparar 2,0% (p/v) de solución de sustrato de hemoglobina, se diluyeron 2,5 g de hemoglobina en 100 mL de agua destilada, se mezcló enérgicamente y, a continuación, se filtró con un filtro de lana de vidrio. Antes del ensayo, se mezclaron 80 mL del filtrado con 20 ml de 0,3 M HCl. Se añadió 1,0 ml de solución de enzimas diluida adecuadamente a 5,0 ml de la solución de sustrato anterior (equilibrada en un baño de agua a 37 °C durante 20 min), se mezcló e incubó a 37 °C durante 10 minutos exactamente. Se añadieron 10 ml de 5% p/v TCA y se mezcló enérgicamente durante 1 minuto con un vortex. La mezcla resultante se filtró dos veces con el mismo papel de filtro (previamente con 5% p/v TCA) a continuación, se lavó con agua y por último se secó. Los primeros 5 ml del filtrado

$$Q_0^{1/3} - Q_1^{1/3} = K_s t \quad (6)$$

where Q_0 is the initial amount of drug in the pharmaceutical dosage form, Q_1 is the remaining amount of drug in the pharmaceutical dosage form at time t , K_s is a constant incorporating the surface-volume relation, and t is the release time.

In order to understand the release mechanism, the release data of the optimized batch were fitted to an empirical equation proposed by Kopcha³² (Eq. 7),

$$M = At^{1/2} + Bt \quad (7)$$

In this equations (Eq. 7), M ($\leq 70\%$) is the percentage of drug released at time t , while A and B are, respectively, the diffusion and erosion terms. According to this equation, if the diffusion to erosion ratio $A/B=1$, then the release mechanism involves diffusion and erosion equally. If $A/B>1$, then diffusion prevails, while erosion predominates when $A/B<1$.

Characterization of beads

Estimation of pepsin

The activity of pepsin was measured by the modified method of Anson³³ wherein the quantity of peptides, non-precipitable by TCA, was determined and assayed using the phosphomolybdotungstic reagent. To prepare 2.0% (w/v) hemoglobin substrate solution, 2.5 g of hemoglobin was dissolved in 100 mL of distilled water and mixed vigorously, and then filtered with a glass wool filter. Before assay, 80 mL of filtrate was mixed with 20 ml of 0.3 M HCl. Properly diluted enzyme solution (1.0 ml) was added to 5.0 ml of the above substrate solution which had been equilibrated in a 37°C water bath for 20 min, mixed, incubated at 37°C for exactly 10 min. A 10 ml of 5% w/v TCA was added and mixed vigorously for 1 min by a vortex. The resultant mixture was filtered twice through the same filter paper previously washed with 5% w/v TCA, then with water and dried. First 5 ml of the filtrate was discarded and 3 ml of the above filtrate was transferred to a flask containing 20 ml of water. Then, 1 ml of 20% w/v NaOH and 1 ml of phosphomolybdotungstic reagent were

se descartaron y, a continuación, se transfirieron 3 ml del filtrado anterior a un matraz con 20 ml de agua. A continuación, se añadió 1 ml de 20% p/v NaOH y 1 ml de reactivo fosfomolibdotúngstico y se dejó reposar durante 15 min para que desarrollara el color completamente. La absorbancia de la solución resultante se midió a 540 nm (UV-1601, Shimadzu, Japan) a temperatura ambiente. El blanco se preparó de acuerdo con el procedimiento anterior, con la salvedad de que añadió solución de TCA antes de la solución enzimática.

Determinación de la eficacia de captura

La eficacia de captura se determinó mediante la disolución de los gránulos cargados de enzimas en fluido gástrico simulado (SGF) agitado magnéticamente (500 rpm) sin enzimas (USP XXVI, 2,0 g de cloruro sódico y 7,0 ml de ácido clorhídrico en 1000 ml de agua, pH ajustado a 1,2 aprox.) a temperatura ambiente durante unos 90 min. La solución resultante se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min (Remi Instruments Ltd, Mumbai, India) y el sobrenadante se sometió a estudio (n=3) en busca de contenido enzimático mediante el método anterior. La eficacia de captura se calculó como:

$$\text{Eficacia de captura} = \frac{\text{Enzima cargada}}{\text{Carga enzimática teórica}} \times 100 \quad (8)$$

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

El tiempo necesario para la liberación del 50% (T_{50}) y el 90% (T_{90}) de la enzima se utilizó para evaluar la aparición y la duración de la acción, respectivamente. Para una mayor optimización, se realizó un estudio de disolución de todos los lotes en 500 ml de SGF sin enzimas con el aparato de disolución 2 USP XXVI (TDT-60T, Electrolab, Mumbai, India) a $37 \pm 0,5$ °C con una velocidad de palas de 75 rpm. Las muestras pesadas con precisión (n=3) equivalentes a 20 mg de pepsina aproximadamente se sometieron a un estudio de disolución *in vitro*, se recopilaron alícuotas de 2 ml y se sometieron a estudio cada 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 y 120 min. Los valores T_{50} y T_{90} se obtuvieron al extrapolar el porcentaje de enzima liberado en relación a una línea de tiempo.

added, and was allowed to stand for 15 min for full color development. The absorbance of the resultant solution was measured at 540 nm (UV-1601, Shimadzu, Japan) at the room temperature. The blank was prepared according to the above procedure, except TCA solution was added before the enzyme solution.

Determination of entrapment efficiency

The entrapment efficiency was determined by dissolving the enzyme-loaded beads in a magnetically stirred (500 rpm) simulated gastric fluid (SGF) without enzyme (USP XXVI, 2.0 g of sodium chloride, and 7.0 ml of hydrochloric acid in 1000 ml water, pH adjusted to about 1.2) at room temperature for about 90 min. The resulting solution was centrifuged at 2500 rpm for 10 min (Remi Instruments Ltd, Mumbai, India) and the supernatant was assayed (n=3) for enzyme content by the above method. The entrapment efficiency was calculated as:

$$\text{Entrapment efficiency} = \frac{\text{Enzyme loaded}}{\text{Theoretical enzyme loading}} \times 100 \quad (8)$$

Determination of T_{50} and T_{90}

Time required for 50% (T_{50}) and 90% (T_{90}) enzyme release were used to evaluate the onset and duration of action, respectively. For optimization purpose, the dissolution study of all the batches was carried out in 500 ml of SGF without enzymes using the USP XXVI dissolution apparatus 2 (TDT-60T, Electrolab, Mumbai, India) at 37 ± 0.5 °C with a paddle speed of 75 rpm. Accurately weighed samples (n=3) equivalent to about 20 mg of pepsin were subjected to an *in vitro* dissolution study, aliquots of 2 ml were collected, and assayed at 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 and 120 min. The T_{50} and T_{90} values were found by extrapolating the percent enzyme released versus time plot.

Particle size measurements

The particle sizes of 50 gel beads were measured using a gauge type micrometer (0.01 mm least count, Durga Scientific Pvt. Ltd., Vadodara, India) for each formulation, and the mean particle size was determined.

Mediciones del tamaño de partícula

Se midieron los tamaños de las partículas de 50 gránulos de gel con el micrómetro tipo extensímetro (recuento mínimo 0,01 mm, Durga Scientific Pvt. Ltd., Vadodara, India) para cada formulación y se determinó el tamaño medio de las partículas.

Efecto del pH en el perfil de liberación

Para estudiar el efecto del valor de pH en el perfil de liberación de pepsina, se llevó a cabo un estudio de disolución *in vitro* como anteriormente, en 500 ml de medios con distinto pH (SGF sin enzimas pH 1,2; tampón fosfato pH 4,0; fluido intestinal simulado (SIF) sin enzimas pH 6,8; tampón fosfato pH 7,4; y tampón fosfato pH 8,0) en el lote optimizado. Se introdujeron muestras pesadas con precisión (n=3) equivalentes a unos 20 mg de pepsina 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 papel de filtro whatman® número 42 y se sometieron a estudio en busca de contenido enzimático tal como se hizo con anterioridad.

Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

El espectro de transmisión IR se obtuvo con un espectrofotómetro FTIR (FTIR-8300, Shimadzu, Japan). Se mezcló un total de 2% (p/p) de la muestra con respecto al disco de bromuro potásico (KBr; S. D. Fine Chem Ltd., Mumbai, India) con KBr seco. La mezcla se trituro hasta conseguir un polvo fino con un motero de ágata antes de comprimirlo en un disco de KBr bajo una presión hidráulica de 10.000 psi. Cada disco de KBr se analizó 16 veces a 4 mm/s con una resolución de 2 cm⁻¹ sobre un intervalo de número de ondas de 400–4000 cm⁻¹ con el método de apodización Happ–Genzel. Se registraron los picos característicos.

Calorimetría diferencial de barrido (CDB)

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

Effect of pH on release profile

To study the effect of the pH value on the pepsin release profile, an *in vitro* dissolution study was carried out as before, using 500 ml of media of different pH (SGF without enzyme pH 1.2, phosphate buffer pH 4.0, simulated intestinal fluid (SIF) without enzyme pH 6.8, phosphate buffer pH 7.4, and phosphate buffer pH 8.0) on the optimized batch. Accurately weighed samples (n=3) equivalent to about 20 mg of pepsin were introduced into the 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 h. The samples were filtered through whatman® filter paper #42 and assayed for enzyme content as before.

Fourier transform infra-red (FTIR) spectroscopy

IR transmission spectra were obtained using a FTIR spectrophotometer (FTIR-8300, Shimadzu, Japan). A total of 2% (w/w) of the sample, with respect to the potassium bromide (KBr; S. D. Fine Chem Ltd., Mumbai, India) disk, was mixed with dry KBr. The mixture was ground into a fine powder using an agate mortar before it was compressed into a KBr disk under a hydraulic press at 10,000 psi. Each KBr disk was scanned at 16 times at 4 mm/s at a resolution of 2 cm⁻¹ over a wavenumber range of 400–4000 cm⁻¹, using Happ–Genzel apodization. The characteristic peaks were recorded.

Differential scanning calorimetry (DSC)

Differential scanning calorimetric analysis was used to characterize the thermal behavior of the isolated substances, empty and enzyme loaded beads. DSC thermograms were obtained using an automatic thermal analyzer system (DSC-60, Shimadzu, Japan). Temperature calibration was performed using indium as the standard. Samples were crimped in a standard aluminum pan and heated from 40°C to 400°C at a heating rate of 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 the reference.

mediante un sistema de análisis térmico automático (DSC-60, Shimadzu, Japón). La calibración de la temperatura se realizó utilizando indio como estándar. Las muestras se colocaron en una cubeta de aluminio estándar y se calentaron de 40 °C a 400 °C con una velocidad 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 portamuestras de latón mediante pasta de carbono. Las imágenes SEM se tomaron con un microscopio electrónico de barrido (JSM-5610LV, Jeol Ltd., Tokyo, 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 5 kV, con la imagen de electrones secundarios (SEI) como detector.

Preparación de la formulación de las cápsulas y estudio de estabilidad

Se introdujeron manualmente gránulos de carragenato pesados con precisión equivalentes a 20 mg de pepsina en una cápsula de gelatina blanda. La junta del cuerpo de la cápsula y el tapón se sellaron cuidadosamente mediante la presión del mecanismo de cierre. Las cápsulas se empaquetaron en botellas de polietileno de alta densidad (HDPE) con tapones de polipropileno (PP) (polietileno esponjoso y forro interior sensible a la presión). Las cápsulas se sometieron a pruebas de estabilidad de acuerdo con las indicaciones de la Conferencia Internacional sobre Armonización (International Conference on Harmonization) para las zonas III y IV. Los contenedores empaquetados de cápsulas preparadas, la formulación comercial y la pepsina pura se conservaron para detectar su estabilidad acelerada (40±2 °C/75±5% humedad relativa) y a largo plazo (30±2 °C/65±5% humedad relativa) en desecadores con una solución saturada de sal durante 12 meses. En el caso de la estabilidad acelerada y a largo plazo, los desecadores con soluciones de yoduro potásico y cloruro sódico

Scanning electron microscopy (SEM)

The purpose of the SEM study was to obtain a topographical characterization of beads. The beads were mounted on brass stubs using carbon paste. SEM photographs were taken using a scanning electron microscope (JSM-5610LV, Jeol Ltd., Tokyo, Japan) at the required magnification at room temperature. A working distance of 39 mm was maintained, and the acceleration voltage used was 5 kV, using the secondary electron image (SEI) as the detector.

Preparation of capsule formulation, packaging, and stability study

Accurately weighed carrageenan beads equivalent to 20 mg of pepsin were filled into a hard gelatin capsule manually. The joint of the capsule body and cap was carefully sealed by pressing the locking mechanism. The capsules were packed in high density polyethylene (HDPE) bottles with polypropylene (PP) caps (foamed polyethylene and pressure sensitive liner). The capsules were subjected to stability testing according to the International Conference on Harmonization guidelines for zones III and IV. The packed containers of prepared capsules, marketed formulation, and bulk pepsin were kept for accelerated (40±2°C/75±5% relative humidity) and long term (30±2°C/65±5% relative humidity) stability in desiccators with a saturated salt solution for up to 12 months. For accelerated and long-term stability, desiccators containing saturated sodium chloride and potassium iodide solutions were kept into ovens at 40 and 30°C to maintain a constant relative humidity of 74.68±0.13 and 67.98±0.23, respectively. A visual inspection (for discoloration of capsule content), dissolution testing, and pepsin content estimation were carried out every 15 days for the entire period of the stability study.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of the factors on responses

Percent entrapment

The ANOVA results and regression coefficients of the response variables are shown in Table

saturadas se conservaron en hornos a 40 y 30 °C para mantener una humedad relativa constante comprendida entre $74,68 \pm 0,13$ y $67,98 \pm 0,23$, respectivamente. Se llevaron a cabo una inspección visual (para la decoloración del contenido de la cápsula), una prueba de disolución y una estimación de contenido de pepsina cada 15 días durante el período completo del estudio de estabilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de los factores sobre las respuestas

Porcentaje de captura

Los resultados del análisis ANOVA y los coeficientes de regresión de las variables de respuesta aparecen en la Tabla 4. Las tres variables de proceso resultaron significativas estadísticamente ($P < 0,05$). A partir de los gráficos de contorno de la superficie de respuesta para el porcentaje de captura (Figura 4) y la Tabla 4, se puede concluir que la concentración de κ -carragenato fue el factor más influyente que afectó de forma positiva (es decir, la respuesta aumentó y el nivel de factor descendió). No obstante, la concentración de cloruro potásico y el tiempo de endurecimiento se vieron afectados negativamente en un nivel significativo (es decir, la respuesta descendió y el nivel de factor aumentó). Se obtuvo más del 80% de captura (experimentos 11, 9, 12 y 3) en una concentración de κ -carragenato elevada, especialmente si iba seguida de niveles bajos de los otros dos factores.

4. All three process variables were statistically significant ($P < 0.05$). From the contour plots of the response surface for percent entrapment (Figure 4) and Table 4, it can be concluded that concentration of κ -carrageenan was the most influential factor, affecting positively (i.e. response increases with increase in factor level). However, the potassium chloride concentration and hardening time affected negatively (i.e. response decreases with increase in factor level) to a significant level. More than 80% entrapment (experiment 11, 9, 12, and 3) was obtained at a high κ -carrageenan concentration especially when it was followed by low levels of the other two factors.

TABLA 4. Resultados del análisis ANOVA (valores *P*): Efecto de las variables en el % de captura, t_{50} , t_{90} y tamaño de partícula.

TABLE 4. ANOVA results (*P* values): Effect of the variables on % entrapment, t_{50} , t_{90} , and particle size.

Factores <i>Factors</i>	% de captura <i>% Entrapment</i>		T_{50}		T_{90}		Tamaño de partícula <i>Particle size</i>	
	Coficiente ^a <i>Coefficient^a</i>	<i>P</i>	Coficiente ^a <i>Coefficient^a</i>	<i>P</i>	Coficiente ^a <i>Coefficient^a</i>	<i>P</i>	Coficiente ^a <i>Coefficient^a</i>	<i>P</i>
Intercepción <i>Intercept</i>	76,86	<0,0001*	33,82	<0,0001*	44,09	<0,0001*	1,93	<0,0001*
<i>A</i>	10,14	<0,0001*	8,12	<0,0001*	9,83	<0,0001*	0,28	<0,0001*
<i>B</i>	-3,73	<0,0001*	6,35	<0,0001*	8,42	<0,0001*	-0,11	0,0005*
<i>C</i>	-2,29	<0,0001*	3,64	<0,0001*	5,57	<0,0001*	-0,04	0,0421*
<i>A</i> ²	-3,78	<0,0001*	-0,48	0,0297*	1,49	0,0154*	0,05	0,0499*
<i>B</i> ²	-1,83	0,0001*	0,68	0,0084*	2,65	0,0014*	0,03	0,1296
<i>C</i> ²	0,40	0,0403*	0,51	0,0254*	2,05	0,0043*	-0,01	0,7683
<i>AB</i>	0,12	0,4262	-0,26	0,1498	0,53	0,2428	0,01	0,6806
<i>AC</i>	0,40	0,0356*	0,06	0,7248	-0,38	0,3877	-0,02	0,3036
<i>BC</i>	-0,07	0,6350	-0,45	0,0326*	0,34	0,4272	0,00	0,9173
<i>r</i> ² _{adj.}	0,9990	-	0,9986	-	0,9946	-	0,9749	-

Los coeficientes de regresión se expresan mediante valores codificados.

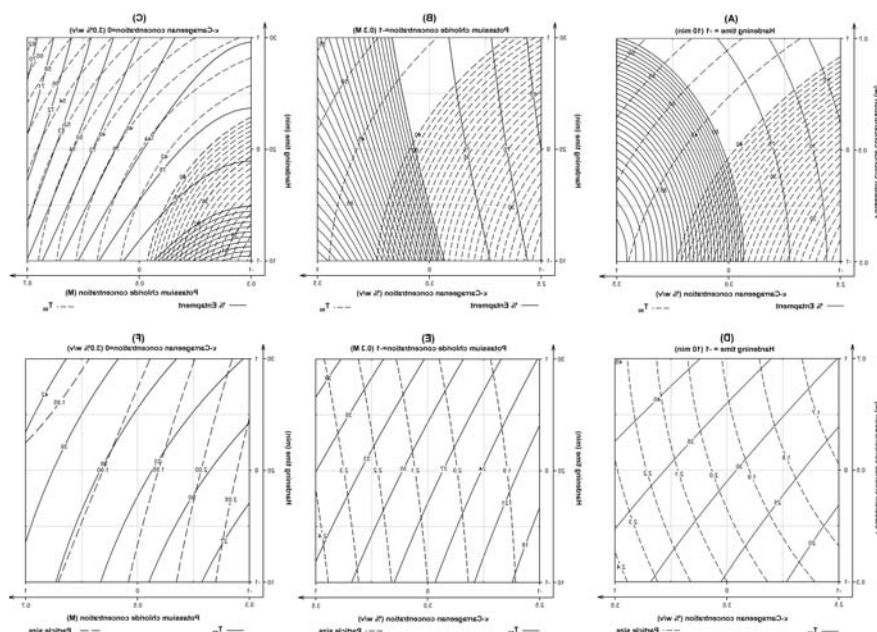
* Significativo estadísticamente (*P* < 0,05)

^a Regression coefficients are in coded values.

* Statistically significant (*P* < 0,05)

FIGURA 4.- Los gráficos de contorno de % de captura, T_{90} , T_{50} y tamaño de partícula expresados como una función de concentración de κ -carragenato, concentración de cloruro potásico y tiempo de endurecimiento.

FIGURE 4.- Contour plots of % entrapment, T_{90} , T_{50} , and particle size as a function of κ -carrageenan concentration, potassium chloride concentration, and hardening time.



Los posibles motivos de una captura de pepsina elevada pueden ser (1) una mayor solubilidad en agua (Sipahigil et al.⁹ demostraron que un fármaco completamente soluble siempre se captura en una proporción mayor) y (2) el mayor peso molecular (estructura molecular “de gran tamaño”) de la pepsina, que dificulta la difusión fuera de los microporos desde la superficie gelificada durante el endurecimiento de la matriz gelificada de carragenato.

Además de la solución de κ -carragenato en una solución de cloruro potásico, se produce una reticulación interfacial instantánea, seguida de una gelificación más gradual del interior, lo que provoca una pérdida de enzimas de los gránulos. Se observó que la pérdida de enzimas era proporcional al grado de reticulación. El aumento de la viscosidad con el aumento de la concentración de κ -carragenato puede retrasar la penetración de potasio en el interior del gránulo, lo que provocó el descenso de la reticulación (además del descenso de la rugosidad de la superficie; Figura 5D-E) y, por tanto, el aumento de la eficacia de captura. El grado de reticulación aumentó con el aumento de la concentración de potasio y el tiempo de contacto; por tanto, la eficacia de captura descendió.

T_{50} y T_{90}

Tal como aparece en la Figura 4 y la Tabla 4, los tres factores tuvieron un efecto positivo importante en ambos valores de respuesta. Se observó que la concentración de κ -carragenato (factor A) resultó ser el factor más influyente. Los valores T_{50} y T_{90} menores resultaron ser los criterios deseados para la formulación óptima para la liberación completa e inmediata de la pepsina funcional en el estómago. Por tanto, en el experimento 5 (puntos de nivel mínimos del BBD) se obtuvieron los gránulos con un valor T_{90} tan bajo como 29,70 min (Tabla 2). Los valores T_{50} y T_{90} resultaron ser proporcionales al tamaño de partícula y el grado de reticulación. A medida que aumentaba la concentración (y por tanto la viscosidad) del κ -carragenato, se obtenían gránulos de mayor tamaño (este tema se trata en la siguiente sección, *Tamaño de partícula*), cuya disolución completa tardó bastante tiempo produciendo unos valores T_{50} y T_{90} más elevados. El aumento de las velocidades de li-

The probable reasons for high pepsin entrapment might be (1) a higher water solubility (it has been reported by Sipahigil et al.⁹ that a freely soluble drug is always entrapped in a higher ratio) and (2) the higher molecular weight (“bulky” macromolecular structure) of pepsin, which makes it difficult to diffuse out of the micropores from the gel surface during the hardening of the carrageenan gel matrix.

On addition of κ -carrageenan solution to a potassium chloride solution, instantaneous interfacial cross-linking takes place, followed by a more gradual gelation of the interior which causes loss of enzyme from the beads. The loss of enzyme was found to be proportional to the degree of cross-linking. The increase in viscosity with increase in κ -carrageenan concentration may retard the penetration of potassium to the interior of the bead, resulted in decreased crosslinking (also decreased surface roughness; Figure 5D-E) and hence increased entrapment efficiency. The degree of cross-linking increased with increasing potassium concentration and contact time, and so the entrapment efficiency decreased.

T_{50} and T_{90}

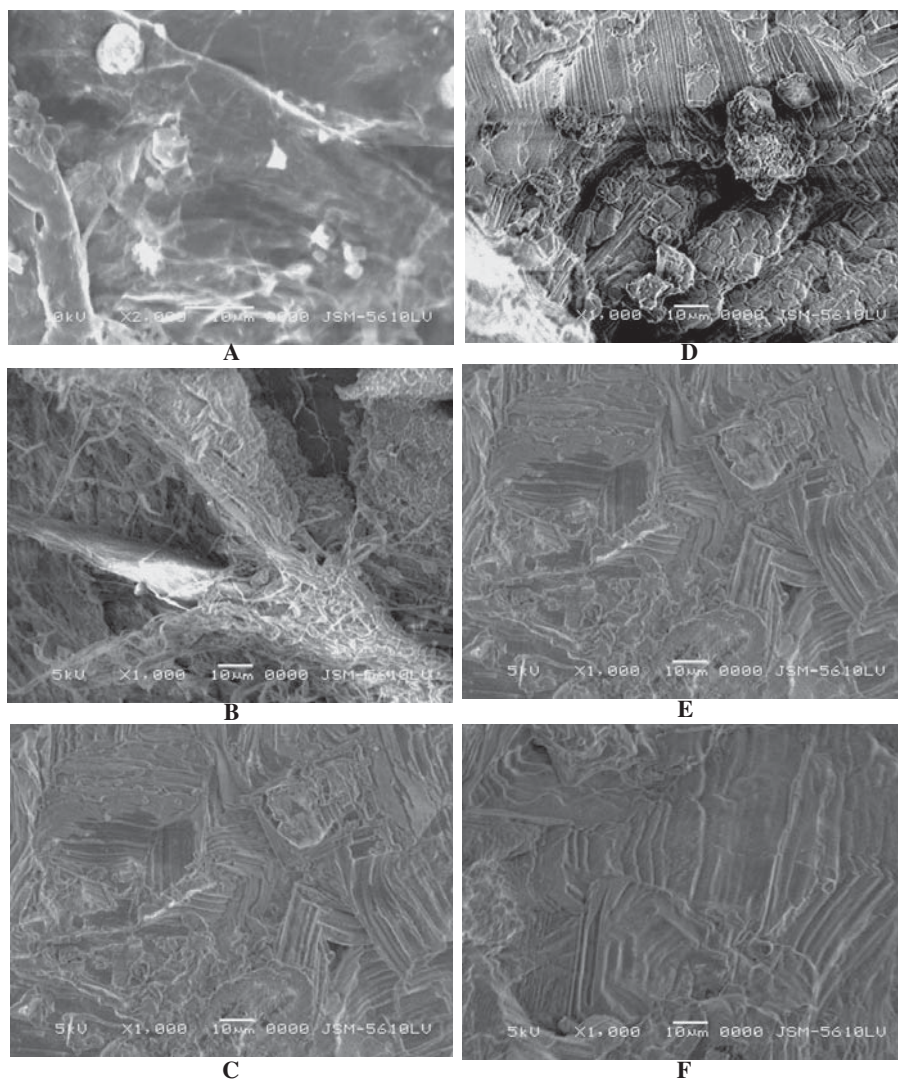
As shown in Figure 4 and Table 4, all three factors had a significant positive effect on both response values. The κ -carrageenan concentration (factor A) was found to be most influential factor. Shorter T_{50} and T_{90} values were the desired criteria for the optimum formulation for immediate and complete release of functional pepsin in the stomach. Thus, experiment 5 (least level points of BBD) resulted the beads with a T_{90} value as low as 29.70 min (Table 2). The T_{50} and T_{90} values were found to be proportional to the particle size and degree of cross-linking. As the concentration, and hence the viscosity, of κ -carrageenan increased, larger beads (discussed in the next section, *Particle size*) were obtained that took long time for complete dissolution, and this resulted in higher T_{50} and T_{90} . The increase in the *in vitro* release rates of pepsin from carrageenan beads prepared with low concentrations potassium chloride solutions may be due to the less cross-linked structure of the beads, which may result in a more porous matrix (Figure 5A-C) and higher drug release^{9,10}. A longer hardening time caused penetration of potassium into the interior of the

beración *in vitro* de la pepsina de los gránulos de carragenato preparados con concentraciones bajas de soluciones de cloruro potásico se puede deber a la estructura con una menor reticulación de los gránulos, lo que produjo una matriz más porosa (Figura 5A-C) y una mayor liberación del fármaco^{9,10}. Un tiempo de endurecimiento mayor provocó la penetración de potasio en el interior de los gránulos, lo que causó un aumento de la reticulación y, por tanto, unos valores T_{50} y T_{90} mayores.⁹

bead, which resulted in increased cross-linking, and hence higher T_{50} and T_{90} values.⁹

FIGURA 5. Micrografías SEM y morfología superficial de gránulos de carragenato: (A–C) Efecto de la concentración de cloruro potásico (concentración de κ -carragenato 3,0% p/v; A=0) (A) 0,3 M (B=-1), (B) 0,5 M (B=0) y (C) 0,7 M (B=1) concentración de cloruro potásico. (D–F) Efecto de la concentración de κ -carragenato (concentración de cloruro potásico 0,7 M; B=1) (D) 2,5% p/v (A=-1), (E) 3,0% w/v (A=0) y (F) 3,5% p/v (A=1) concentración de κ -carragenato.

FIGURE 5. SEM micrographs and surface morphology of carrageenan beads: (A–C) Effect of potassium chloride concentration (κ -carrageenan concentration 3.0% w/v; A=0) (A) 0.3 M (B=-1), (B) 0.5 M (B=0), and (C) 0.7 M (B=1) potassium chloride concentration. (D–F) Effect of κ -carrageenan concentration (potassium chloride concentration 0.7 M; B=1) (D) 2.5% w/v (A=-1), (E) 3.0% w/v (A=0), and (F) 3.5% w/v (A=1) κ -carrageenan concentration.



Tamaño de partícula

Tal como se muestra en la Tabla 4, la concentración de κ -carragenato (factor A; el más influyente) obtuvo un coeficiente positivo, mientras que la concentración de cloruro potásico y el tiempo de endurecimiento obtuvieron un coeficiente negativo. A diferencia de los hallazgos de Sipahigil⁹ y Bhardwaj³⁴, las tres variables de proceso resultaron ser significativas estadísticamente ($P < 0,05$). El tamaño del gránulo se vio influenciado por la apertura a través de la cual puede pasar el κ -carragenato, además del surfactante, la velocidad de extrusión (que se mantuvo constante), la tensión de superficie y la viscosidad de la solución de carragenato. El aumento de la viscosidad a concentraciones más elevadas de κ -carragenato produjo partículas de mayor tamaño. Una concentración de cloruro potásico elevada y un tiempo de endurecimiento mayor produjeron partículas de menor tamaño debido a un elevado grado de reticulación. Aunque el efecto negativo de la concentración de cloruro potásico resultó ser de una magnitud inferior, contribuyó a la morfología de los gránulos (Figura 5A-C).

Interacciones entre los factores

Un interacción hace que un factor no produzca el mismo efecto en la respuesta cuando se varían los niveles de otro factor. Los resultados del análisis ANOVA (Tabla 4) mostraron que la interacción AC y BC tuvo una influencia importante en el porcentaje de captura y el valor T_{50} , respectivamente. No obstante, el resto de términos de interacción no resultaron ser significativos estadísticamente. El análisis de los resultados por regresión múltiple (Tabla 4) produjo las ecuaciones que describen de forma adecuada la influencia de los factores seleccionados en el porcentaje de captura, T_{50} , T_{90} y el tamaño de partícula.

Optimización del proceso mediante las superficies de respuesta

En general, la finalidad de una optimización es encontrar los niveles óptimos de las variables que afectan a un proceso, a través del cual es posible generar y reproducir fácilmente un

Particle size

As depicted in Table 4, the κ -carrageenan concentration (factor A; most influential) had positive coefficient, while the potassium chloride concentration and hardening time had negative coefficient. In contrast to the findings of Sipahigil⁹ and Bhardwaj³⁴, all three process variables were statistically significant ($P < 0.05$). The bead size is influenced by the opening through which the κ -carrageenan is allowed to pass, addition of surfactant, and extrusion rate (which was kept constant); the surface tension; and the viscosity of the carrageenan solution. The increased viscosity at higher concentrations of κ -carrageenan resulted in larger particles. A high potassium chloride concentration and long hardening time resulted in a smaller particle size due to high degree of cross-linking. Though the negative effect of potassium chloride concentration was of a lower magnitude, it contributed to the morphology of the beads (Figure 5A-C).

Interactions between the factors

An interaction is the failure of a factor to produce the same effect on the response at different levels of the other factor. The ANOVA results (Table 4) showed that interaction AC and BC had significant influence on percent entrapment and T_{50} , respectively. However, other interaction terms were non-significant statistically. Analysis of the results using multiple regression (Table 4) leads to equations that adequately describe the influence of the selected factors on the percent entrapment, T_{50} , T_{90} , and particle size.

Optimization of the process using the response surfaces

Generally the aim of an optimization is to find the optimum levels of the variables that affect a process through which a product of desired characteristics may be produced easily and reproducibly. Using the response surface of selected responses with constraint (percent entrapment $> 80\%$ and $T_{90} < 40$ min), it was possible to identify the optimum region. The contour plots that describe the influence of the independent factors on the percent entrapment and T_{90} are presented

producto con las características deseadas. Con la superficie de respuesta de las respuestas con restricción seleccionadas (porcentaje de captura > 80% y $T_{90} < 40$ min), fue posible identificar la región óptima. En la Figura 4;A-C aparecen los gráficos de contorno que describen la influencia de los factores independientes del porcentaje de captura y T_{90} . Un estudio de estos gráficos mostró que los gránulos con las características deseadas se podrían producir en el nivel medio (0) de la concentración de κ -carragenato y en el nivel inferior (-1) de la concentración de cloruro potásico y el tiempo de endurecimiento (experimento 3), y éste se consideró el lote que cumplía todas las restricciones favorables para la preparación de los gránulos.

Evaluación del modelo mediante la validación cruzada

Con el fin de evaluar la fiabilidad del modelo, se realizaron cinco experimentos modificando las variables de proceso en valores diferentes a los del modelo. En cada uno de estos experimentos de prueba se estimaron las respuestas mediante ecuaciones polinómicas cuadráticas derivadas y el procedimiento para llevar a cabo una comparación de ambas respuestas (Tabla 5). El porcentaje de error relativo se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de error relativo} = \frac{\text{valor previsto} - \text{valor experimental}}{\text{valor previsto}} \quad (9)$$

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.

in Figure 4;A-C. A study of these plots showed that the beads with desired characteristic could be produced at medium level (0) of κ -carrageenan concentration and lowest levels (-1) of both potassium chloride concentration and hardening time (Experiment 3), which was considered as the batch fulfilling all the constraints favorable for beads preparation.

Evaluation of model using cross-validation

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 using derived quadratic polynomial equations and experimental procedure for comparison between both responses (Table 5). Percent relative error was calculated using the following equation:

$$\text{Percent relative error} = \frac{\text{predicted value} - \text{experimental value}}{\text{predicted value}} \quad (9)$$

It can be seen that in all cases there was a reasonable agreement between the predicted and the experimental value since the bias values found were low. 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 respuestas entre valores experimentales y previstos del conjunto de validación cruzada.

TABLE 5. Comparison of responses between predicted and experimental values for the cross-validation set.

Respuestas <i>Responses</i>	Prueba <i>Test</i>	Factores/Niveles <i>Factors/levels</i>			Valores experimentales <i>Experimental values</i>	Valores predichos <i>Predicted values</i>	% de error relativo <i>% Relative error</i>
		A	B	C			
		% de captura <i>% Entrapment</i>	1	-0,7			
	2	0,3	0	-0,7	81,28	79,33	2,4
	3	0,3	0	-0,3	80,25	82,74	-3,1
	4	0	-0,3	0,7	76,43	74,74	2,2
	5	1	0,7	0,7	78,64	76,04	3,3
T ₅₀	1	-0,7	-1	-0,7	19,46	18,78	3,5
	2	0,3	0	-0,7	33,90	34,71	-2,4
	3	0,3	0	-0,3	35,16	36,28	-3,2
	4	0	-0,3	0,7	34,87	33,89	2,8
	5	1	0,7	0,7	48,65	49,92	-2,6
T ₉₀	1	-0,7	-1	-0,7	29,70	30,68	-3,3
	2	0,3	0	-0,7	44,35	43,33	2,3
	3	0,3	0	-0,3	45,72	47,14	-3,1
	4	0	-0,3	0,7	46,63	47,85	-2,6
	5	1	0,7	0,7	67,77	66,75	1,5
Tamaño de partícula <i>Particle size</i>	1	-0,7	-1	-0,7	1,91	1,94	-1,2
	2	0,3	0	-0,7	2,04	2,00	1,9
	3	0,3	0	-0,3	2,03	2,05	-1,1
	4	0	-0,3	0,7	1,94	1,90	1,8
	5	1	0,7	0,7	2,17	2,14	1,4

Ajuste de la curva y mecanismo de liberación

Curve fitting and release mechanism

En la Figura 6A aparece un perfil de disolución *in vitro* del lote optimizado. Los valores del exponente de liberación (*n*) y la constante cinética (*K*) se obtuvieron mediante cinética de orden cero, cinética de primer orden, la raíz cuadrada de la ecuación de tiempo de Higuchi, la ecuación de ley exponencial de Korsmeyer-Peppas y la raíz cúbica de la ecuación de tiempo de Hixson-Crowell que aparecen en la Tabla 6. Los datos de liberación enzimática mostraron un buen ajuste con la cinética de liberación de la ley exponencial de Korsmeyer-Peppas (Ec. 5), que se puede confirmar mediante la comparación de los valores del coeficiente de correlación (*r*) con los del resto de modelos. Los valores del exponente de liberación de Korsmeyer-Peppas (*n*), determinados para las distintas formulaciones sometidas a estudio, oscilaron entre 1,30 y 2,42, lo que sugirió una liberación mediante un transporte supercaso II. Los valores de la constante cinética

An *in vitro* dissolution profile of the optimized batch is shown in Figure 6A. Values of release exponent (*n*) and kinetic constant (*K*) were derived using zero-order kinetics, first-order kinetics, Higuchi's square root of time equation, Korsmeyer-Peppas power law equation and Hixson-Crowell's cube root of time equation and presented in Table 6. The enzyme release data show a good fit to the Korsmeyer-Peppas power law release kinetics (Eq. 5), which can be confirmed by comparing the values of correlation coefficient (*r*) with that of the other models. The values of the Korsmeyer-Peppas release exponent (*n*) determined for the various formulations studied ranged from 1.30 to 2.42, suggesting release by super case-II transport. The kinetic constant (*K_k*) values ranged from 0.003 to 0.83, with a low *K_k* value suggesting near-to-zero release from the beads initially. If one considers the correlation coefficient (*r*) values of the zero-order and

(K_k) oscilaron entre 0,003 y 0,83, con un valor K_k bajo, lo que sugirió una liberación cercana a cero de los gránulos al principio. Si se tienen en cuenta los valores del coeficiente de correlación (r) de los modelos de liberación de Korsmeyer-Peppas y orden cero, ambos modelos describen los datos de disolución bastante bien. En los casos en los que existan modelos contrapuestos (con valores r similares), los análisis residuales se pueden utilizar para realizar una distinción entre ellos³⁰. La Figura 6B es el gráfico residual de la formulación optimizada. Los residuales son elevados para los modelos de Hixson-Crowell, Higuchi, primer orden y orden cero (mientras que son menores para el modelo Korsmeyer-Peppas) y muestran desviación sistemática: los modelos predicen en exceso al principio y predicen en defecto en las etapas posteriores del proceso de disolución. Esto indica que la ley exponencial de Korsmeyer-Peppas es el modelo que mejor se ajusta para describir el comportamiento de disolución de la pepsina procedente de los gránulos de κ -carragenato.

Korsmeyer-Peppas release models, both these models describe the dissolution data reasonably well. Where there are competing models (with similar r values), residuals analysis can be used to distinguish between them³⁰. Figure 6B is the residual plot for the optimized formulation. The residuals are high for the zero-order, first-order, Higuchi, and Hixson-Crowell models (while least for the Korsmeyer-Peppas model) and shows systematic deviation: the models overpredict initially and underpredict at the later stages of the dissolution process. This indicates that the Korsmeyer-Peppas power law is the best-fit model in describing the dissolution behavior of pepsin from κ -carrageenan beads.

FIGURA 6. (A) Perfil de liberación *in vitro* de la formulación optimizada (experimento 3) en SGF sin enzimas. B) Gráfico residual de distintos modelos de liberación para la misma formulación.
FIGURE 6. (A) 'In vitro' release profile of optimized formulation (experiment 3) in SGF without enzyme. (B) Residual plot of different release models for the same formulation.

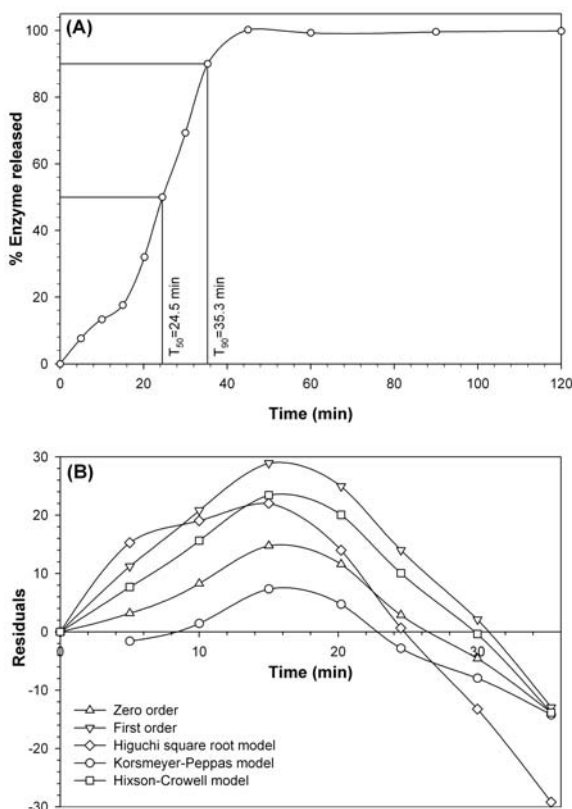


TABLA 6. Comparación de distintos modelos de cinética de disolución
TABLE 6. Comparison of Different Dissolution Kinetics Models

SE ^a	Modelo de liberación Release model										
	Orden cero Zero-order		Primer orden First-Order		Matriz de Higuchi Higuchi matrix		Korsmeyer-Peppas Korsmeyer-Peppas			Hixson-Crowell Hixson-Crowell	
	K_o	r_0	K_1	r_1	K_H	r_H	n	K_k	r_k	K_s	r_s
5	2,53	0,96	-0,08	0,90	13,06	0,87	1,33	0,83	0,97	-0,02	0,94
11	1,55	0,95	-0,05	0,80	9,24	0,81	1,64	0,12	0,97	-0,01	0,88
2	1,65	0,94	-0,05	0,83	9,68	0,81	1,94	0,04	0,98	-0,01	0,90
14	1,09	0,93	-0,04	0,79	7,58	0,79	2,22	0,01	0,97	-0,01	0,89
7	2,40	0,94	-0,05	0,85	11,05	0,81	1,43	0,54	0,97	-0,01	0,89
9	1,47	0,94	-0,05	0,71	8,83	0,80	1,69	0,09	0,98	-0,01	0,85
1	1,79	0,94	-0,04	0,86	9,51	0,79	1,77	0,10	0,97	-0,01	0,89
12	1,16	0,93	-0,04	0,86	8,02	0,80	2,42	0,00	0,98	-0,01	0,91
3	2,16	0,95	-0,04	0,84	10,23	0,82	1,30	0,74	0,97	-0,01	0,89
6	1,65	0,95	-0,05	0,83	9,74	0,81	1,81	0,07	0,99	-0,01	0,90
15	1,41	0,91	-0,03	0,82	7,75	0,76	1,80	0,06	0,97	-0,01	0,86
8	1,16	0,94	-0,04	0,84	8,09	0,80	2,14	0,01	0,94	-0,01	0,91
13	1,66	0,94	-0,05	0,85	9,78	0,81	2,00	0,04	0,99	-0,01	0,90

^a ES: Secuencia experimental.

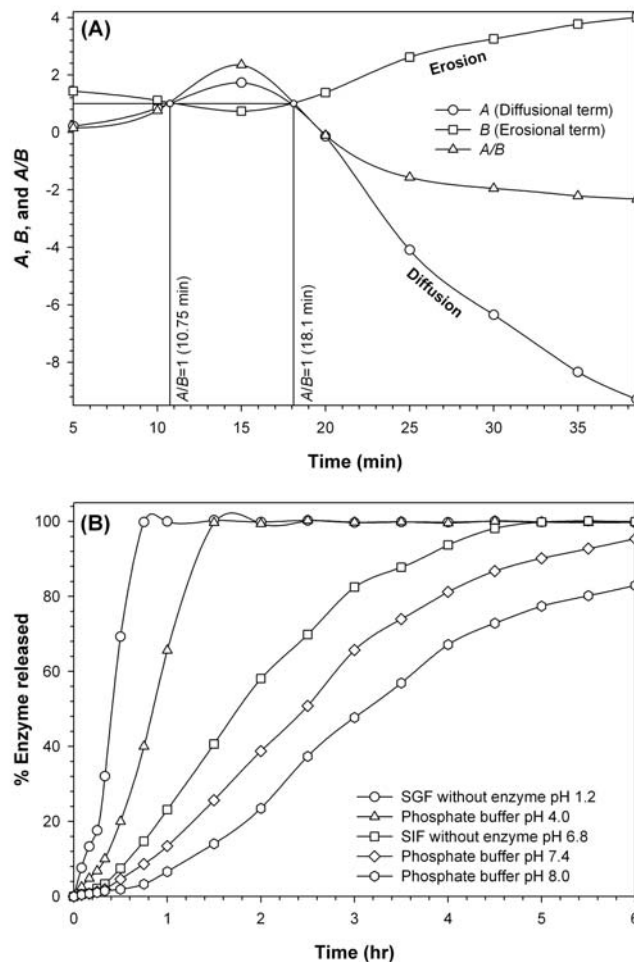
^a ES, experimental sequence.

Por último, para saber si la liberación enzimática se debió a la erosión o a la difusión, los datos de liberación de la formulación optimizada se ajustaron al modelo Kopcha (Ec. 7) y se determinaron los valores de los parámetros como, por ejemplo, A , B y A/B en distintos intervalos de tiempo (Figura 7A). Durante el estudio de disolución, el gel de carragenato seco se expande, pero no puede conservar la matriz gelificada debido a la baja solidez del gel y comienza a erosionarse. Inicialmente, hasta los 15 minutos, el término de difusión A aumentó y fue predominante. No obstante, el término de erosión (B) aumentó en el transcurso del tiempo debido a que la erosión a través de las partículas hidratadas o la capa del proceso de difusión resulta más sencilla. El perfil Kopcha correspondiente demostró que, transcurridos 15 minutos, la liberación del fármaco era posterior a la erosión de la matriz predominante. Esto explica la naturaleza bifásica (difusional primero y erosional después) del perfil de liberación *in vitro* del lote optimizado (Figura 6A). El fenómeno de erosión y difusión del hidrogel de κ -carragenato se puede explicar de la forma que aparece a continuación.

Finally, in order to know whether the enzyme release was due to erosion or diffusion, the release data of the optimized formulation were fitted to the Kopcha model (Eq. 7) and the values of parameters like A , B , and A/B at different time intervals were determined (Figure 7A). During a dissolution study, the dry carrageenan gel swell but unable to maintain the gel matrix due to low gel strength and start to erode. Initially, up to 15 min, the diffusion term A increased and was predominant. However, the erosion term, B , increased in the course of time because erosion through the hydrated particles or the layer in process of diffusion is easier. The corresponding Kopcha profile showed that after 15 min drug release was subsequent to predominant matrix erosion. This explains the biphasic nature (diffusional first and erosional latter) of the ‘*in vitro*’ release profile of the optimized batch (Figure 6A). The diffusion and erosion phenomena of the κ -carrageenan hydrogel can be explained as follows.

FIGURA 7. (A) Parámetros del modelo de Kopcha (A , B y A/B) frente al perfil de tiempo del lote optimizado (experimento 3). (B) Efecto del pH en el perfil de liberación de pepsina capturada en gránulos de κ -carragenato.

FIGURE 7. (A) Kopcha model parameters (A , B , and A/B) versus time profile for optimized batch (experiment 3). (B) Effect of pH on release profile of pepsin entrapped in κ -carrageenan beads.



Cuando un hidrogel seco comienza a absorber agua, las primeras moléculas de agua que entran en la matriz hidratan los grupos hidrófilos más polares. A medida que los grupos polares se hidratan, la red se expande y se exponen los grupos hidrófugos, que también interactúan con las moléculas de agua. Después de que las zonas hidrófugas y polares hayan interactuado con las moléculas de agua y se hayan fijado a ellas, la red se empapa de agua adicional, debido a la fuerza de transmisión osmótica de las cadenas de la red hacia una dilución infinita. Esta expansión adicional se opone a los enlaces cruzados físicos o covalentes, lo que genera una fuerza de retracción de la red elástica. A medida que la red se expande, los enlaces cruzados o las cadenas de la red comienzan a desintegrarse a una velocidad dependiente de la composición, la velocidad de

When a dry hydrogel begins to absorb water, the first water molecules entering the matrix will hydrate the most polar, hydrophilic groups. As the polar groups are hydrated, the network swells, and exposes hydrophobic groups, which also interact with water molecules. After the polar and hydrophobic sites have interacted with and bound water molecules, the network will imbibe additional water, due to the osmotic driving force of the network chains towards infinite dilution. This additional swelling is opposed by the covalent or physical cross-links, leading to an elastic network retraction force. As the network swells, the network chains or cross-links begin to disintegrate at a rate depending on the composition, rate of solvent intake, and equilibrium between the osmotic pressure and the mechanical strength of the hydrogel³⁵.

la ingesta de disolvente y el equilibrio entre la presión osmótica y la resistencia mecánica del hidrogel³⁵.

Caracterización de la formulación óptima

Efecto del pH en el perfil de liberación

El efecto del pH en la liberación de pepsina de los gránulos de κ -carragenato en tampones de distintos valores de pH (1,2; 4,0; 6,8; 7,4 y 8,0) que simulan el tracto gastrointestinal humano aparece en la Figura 7B. La liberación de pepsina de los gránulos de κ -carragenato en SGF se podría atribuir a la presencia de grupos de sulfatos totalmente acidificados en la molécula de carragenato que permiten la conservación de un determinado grado de ionización, incluso en niveles de pH bajos³⁶. La expansión y la desintegración de los gránulos de κ -carragenato dependen de las composiciones del medio de disolución, la fuerza iónica, el valor de pH, la temperatura, la solubilidad del fármaco capturado en los gránulos, la aplicación de tensión o la adición de solutos específicos que compitan con el ligando polimérico del sitio de afinidad de una proteína. A medida que el valor de pH aumenta, el grado de ionización del hidrogel de κ -carragenato descende. En valores de pH elevados, el nivel de expansión de equilibrio se retrasa y el perfil de liberación sostenida se consigue tras la difusión. Este estudio confirma la administración en lugares específicos de la pepsina en el estómago. Por tanto, los gránulos de κ -carragenato son altamente recomendables para la administración de fármacos (i) localmente activos en el estómago, (ii) cuya ventana de absorción se localice en el estómago o en la parte superior del intestino delgado, (iii) inestables en el entorno del colon o el intestino, y/o (iv) con una baja solubilidad en valores de pH elevados. Por otra parte, los gránulos de κ -carragenato revestidos con material resistente a los ácidos, pero susceptible a los álcalis, se pueden utilizar para la administración sostenida de fármacos (i) localmente activos en el intestino delgado, (ii) cuya ventana de absorción se localice en el intestino delgado, (iii) inestables en un entorno ácido o estomacal, y/o (iv) con una baja solubilidad en valores de pH bajos.

Characterization of optimal formulation

Effect of pH on release profile

The effect of pH on the release of pepsin from κ -carrageenan beads in buffers of different pH values (1.2, 4.0, 6.8, 7.4, and 8.0) simulating the human gastrointestinal tract is presented in Figure 7B. The release of pepsin from κ -carrageenan beads in SGF could be attributed to the presence in the carrageenan molecule of strongly acidic sulphate groups that allow a certain degree of ionization to be maintained even at low pH values³⁶. The swelling and disintegration of κ -carrageenan beads are dependent on the compositions of the dissolution medium, ionic strength, pH value, temperature, solubility of the drug entrapped in the beads, application of stress, or addition of specific solutes that compete with the polymeric ligand for the affinity site on the protein. As the pH value increases, the degree of ionization of the κ -carrageenan hydrogel decreases. At an elevated pH, the equilibrium swelling level is delayed and the sustained-release profile is achieved subsequent to the diffusion. This study confirms the site-specific pepsin delivery to the stomach. Thus, κ -carrageenan beads are highly desirable for delivery of drugs (i) that are locally active in the stomach, (ii) have an absorption window in the stomach or in the upper small intestine, (iii) are unstable in the intestinal or colonic environment, and/or (iv) have a low solubility at high pH values. Alternatively, κ -carrageenan beads coated with acid-resistant but alkaline-susceptible material can be used for sustained delivery of drugs (i) that are locally active in the small intestine, (ii) have an absorption window in the small intestine, (iii) are unstable in an acidic or stomach environment, and/or (iv) have a low solubility at low pH values.

Fourier transform infra-red (FTIR) spectroscopy

FTIR spectra of κ -carrageenan powder, carrageenan blank beads, pepsin-loaded carrageenan beads, a physical mixture of pepsin and blank beads, and pepsin are shown in Figure 8. The FTIR spectrum of κ -carrageenan powder shows various distinct peaks: very broad band spreading in 3150-3600 cm^{-1} (strong; s) due to polyhydroxy ($-\text{OH}$)_n groups; 2964 cm^{-1} (s), 2920 cm^{-1} (s), and 2852 cm^{-1} (medium; m) due to C-H

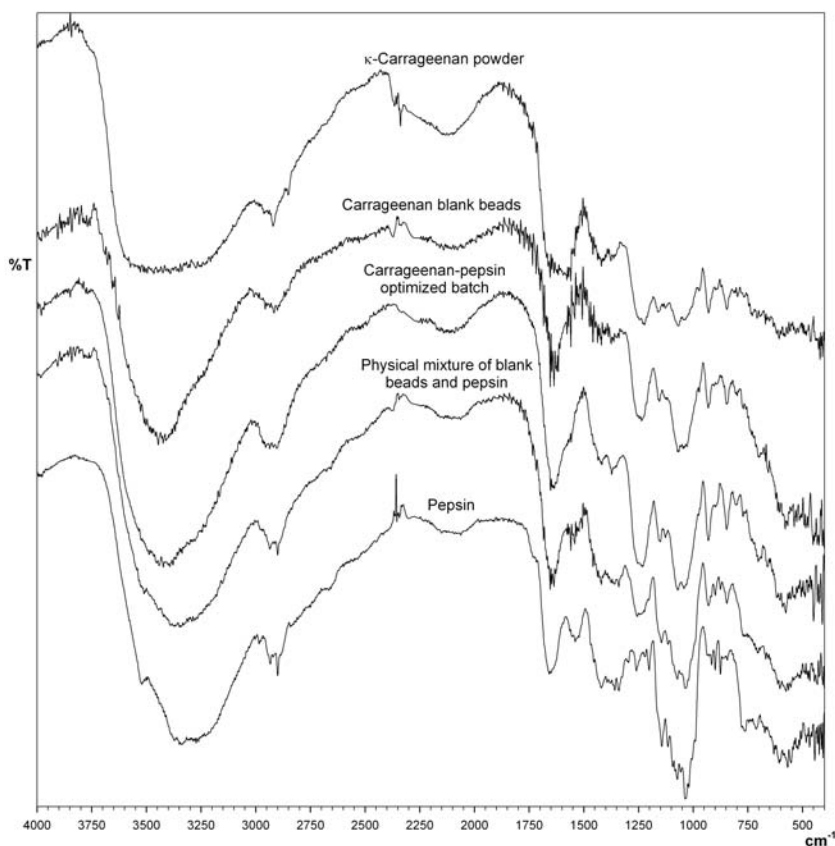
Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

En la Figura 8 aparecen el espectro FTIR del polvo de κ -carragenato, los gránulos vacíos de carragenato, los gránulos de carragenato cargados de pepsina, una mezcla física de gránulos vacíos y pepsina, y la pepsina. El espectro FTIR del polvo de κ -carragenato muestra distintos picos: banda muy ancha diseminada en 3150-3600 cm^{-1} (fuerte; s) debido a los grupos polihidróxi ($-\text{OH}$)_n; 2964 cm^{-1} (s), 2920 cm^{-1} (s) y 2852 cm^{-1} (medio; m) debido al estiramiento del grupo C-H; 1425 cm^{-1} (s) y 1375 cm^{-1} (s) debido a la deformación del grupo C-H; 1222 cm^{-1} (s) debido al estiramiento del grupo S=O de la sal de éster sulfatada; 1070 cm^{-1} debido al estiramiento del grupo C-O de los éteres cíclicos; 929 cm^{-1} (s) debido al estiramiento del grupo C-O de los grupos polihidróxi asociados a los carbonos; etc. La reticulación del carragenato mediante K^+ fue señalada por un descenso de la intensidad del estiramiento del grupo S=O (1222 cm^{-1}) del grupo de ésteres de sulfato, que resultó tener la misma intensidad que el estiramiento del grupo C-O (1070 cm^{-1}) de los éteres cíclicos del polvo de κ -carragenato. Además, el pico del grupo de ésteres de sulfato se desplazó 14 cm^{-1} , desde 1222 cm^{-1} hasta 1236 cm^{-1} . Esto posiblemente se debió a la reacción de algún éster de sulfato con carga negativa con K^+ con carga positiva, lo que provocó cambios fisicoquímicos en el carragenato. En la pepsina también se observaron distintos picos: una banda predominante a 3220-3380 cm^{-1} (s) debido al estiramiento del grupo N-H de las amidas de sustitución N secundarias; 2980 cm^{-1} (débil; w) debido al estiramiento del grupo C-H; bandas medias a 1550 cm^{-1} debido a C=C; 880 cm^{-1} (s) y 875 cm^{-1} (s) debido a la deformación del grupo C-H fuera del plano aromático de sustitución *p* de los residuos aromáticos del triptófano o la tirosina; 2895 cm^{-1} (s) y 2938 cm^{-1} (s) debido al estiramiento del grupo C-H; 1418 cm^{-1} (m), 1327 cm^{-1} (m) y 1337 cm^{-1} (m) debido a la deformación del grupo C-H de las cadenas alquil de aminoácidos (especialmente del grupo isopropílico de la leucina); 1662 cm^{-1} (w) debido al estiramiento del grupo C=O del anión de carboxilato y el grupo amídico; y los picos fuertes entre 1030-1150 cm^{-1} , bandas débiles a 545-615 cm^{-1} y 400-450 cm^{-1} debido al estiramiento del grupo C-S de sulfuros y disulfuros.

stretching; 1425 cm^{-1} (s) and 1375 cm^{-1} (s) due to C-H deformation; 1222 cm^{-1} (s) due to S=O stretch of sulfate ester salt; 1070 cm^{-1} due to C-O stretch of cyclic ethers; 929 cm^{-1} (s) due to C-O stretching of polyhydroxy groups attached to carbons; etc. Cross-linking of carrageenan by K^+ was indicated by a decrease in the intensity of S=O stretching (1222 cm^{-1}) of the sulfate ester group, which was of the same intensity as the C-O stretching (1070 cm^{-1}) of cyclic ethers for the κ -carrageenan powder. Moreover, the peak of the sulfate ester group was displaced by 14 cm^{-1} , from 1222 cm^{-1} to 1236 cm^{-1} . This was probably because some negatively charged sulfate ester reacted with positively charged K^+ resulting in physicochemical changes in the carrageenan. The pepsin also showed various distinct peaks: one predominant band at 3220-3380 cm^{-1} (s) due to N-H stretching of secondary N-substituted amides; 2980 cm^{-1} (weak; w) due to C-H stretching; medium bands at 1550 cm^{-1} due to C=C; 880 cm^{-1} (s) and 875 cm^{-1} (s) due to *p*-substituted aromatic out-of-plane C-H deformation of aromatic residues of tryptophan or tyrosine; 2895 cm^{-1} (s) and 2938 cm^{-1} (s) due to C-H stretching; 1418 cm^{-1} (m), 1327 cm^{-1} (m), and 1337 cm^{-1} (m) due to C-H deformation of alkyl chains of amino acids (particularly of isopropyl group of leucine); 1662 cm^{-1} (w) due to C=O stretching of the carboxylate anion and amide group; and strong peaks between 1030-1150 cm^{-1} , weak bands at 545-615 cm^{-1} , and 400-450 cm^{-1} due to C-S stretching of sulfides and disulfides. With the incorporation of pepsin, the spectrum of the beads was similar to that of the κ -carrageenan blank beads. However, the physical mixture of pepsin and blank beads showed the peaks due to both pepsin and κ -carrageenan. This confirms pepsin entrapment in the κ -carrageenan beads at the molecular level.

Con la incorporación de la pepsina, el espectro de los gránulos fue similar al de los gránulos de κ -carragenato. No obstante, en la mezcla física de la pepsina y los gránulos vacíos se observaron picos debido tanto a la pepsina como al κ -carragenato. Esto confirma que la captura de pepsina en los gránulos de κ -carragenato se produce en el nivel molecular.

FIGURA 8. El espectro FTIR del polvo de κ -carragenato, los gránulos vacíos de carragenato, los gránulos de carragenato de pepsina, la mezcla física de pepsina y gránulos vacíos y la pepsina.
FIGURE 8. The FTIR spectra of κ -carrageenan powder, carrageenan blank beads, pepsin loaded carrageenan beads, physical mixture of pepsin and blank beads, and pepsin.



Calorimetría diferencial de barrido (CDB)

En la Figura 9 aparecen los termogramas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) del cloruro potásico, la pepsina, el κ -carragenato, los gránulos vacíos y los gránulos cargados de pepsina. En el cloruro potásico se observaron dos picos exotérmicos no significativos a 323° y 374°. La pepsina mostró 4 picos endotérmicos a 146°, 204,7°, 219,5° y 255,4°, seguidos de una gran degradación exotérmica a 347°. En el termograma del κ -carragenato se observó un gran pico endotérmico a 85 °C debido a la presencia de moléculas de agua. En los gránulos

Differential scanning calorimetry (DSC)

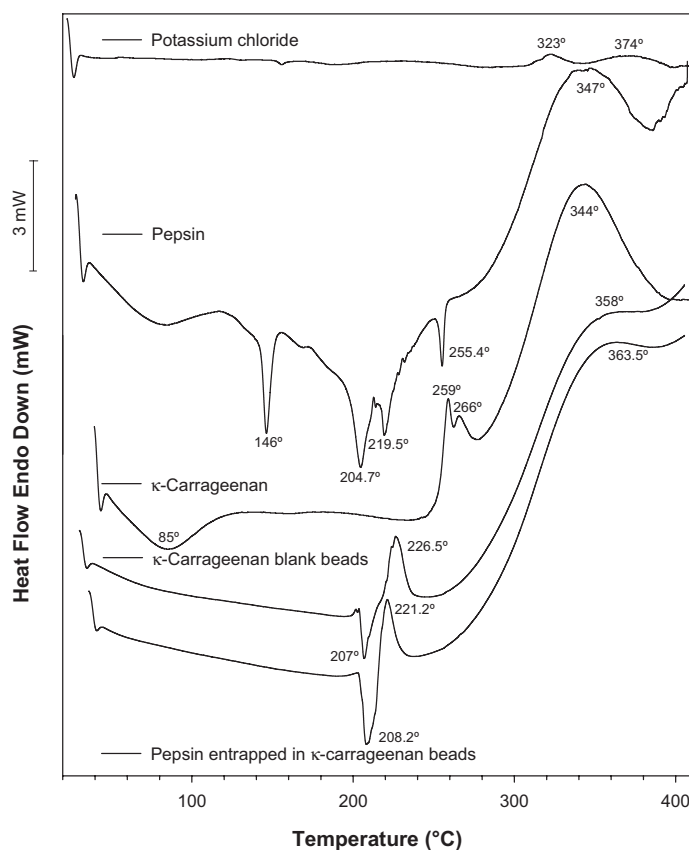
The DSC thermograms of potassium chloride, pepsin, κ -carrageenan, blank beads, and pepsin-loaded beads are shown in Figure 9. Potassium chloride showed two non-significant exothermic peaks at 323° and 374°. Pepsin exhibited 4 endothermic peaks at 146°, 204.7°, 219.5°, and 255.4° followed by a broad degradation exotherm at 347°. A broad endothermic peak at 85°C due to the presence of water molecules was observed in the thermogram of κ -carrageenan. Two minor peaks at 259° and 266°C in the degradation exotherm of κ -carrageenan were absent for the

vacíos y los gránulos cargados de pepsina no se observaron dos picos menores a 259° y 266°C en la degradación exotérmica del κ -carragenato, mientras que en los gránulos vacíos se observó un pico exotérmico importante a 344 °C desplazado a temperaturas más elevadas (358 °C). Esto demostró que los gránulos de κ -carragenato-KCl son más estables que los de κ -carragenato. No obstante, se observaron dos picos adicionales (uno endotérmico a 207° y uno exotérmico a 226,5 °C) en el termograma de los gránulos vacíos debido a la interacción del κ -carragenato de potasio. El termograma de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de los gránulos cargados de enzimas fue similar al de los gránulos vacíos, con la salvedad de que todos los picos correspondientes se desplazaron a una temperatura más elevada, lo que se podría deber a la presencia de pepsina. No obstante, no se observaron picos análogos en la pepsina. Esto confirma que la mayoría de las enzimas se dispersaron uniformemente en el nivel molecular en los gránulos.

blank beads and pepsin-loaded beads, while a major exothermic peak at 344°C was found to be shifted towards higher temperature (358°C) in blank beads. This showed that, κ -carrageenan-KCl beads are more stable than κ -carrageenan. However, two additional peaks (one endothermic at 207° and one exothermic at 226.5°C) were observed in the thermogram of the blank beads due to the potassium- κ -carrageenan interaction. The DSC thermogram of the enzyme-loaded beads was similar to that of the blank beads except all the corresponding peaks were shifted to higher temperature, which might be due to the presence of pepsin. However, it did not showed any peak analogous to pepsin. This confirms that most of the enzyme was dispersed uniformly at the molecular level in the beads.

FIGURA 9. Los termogramas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) del cloruro potásico, la pepsina, el polvo de κ -carragenato, los gránulos vacíos y los gránulos de carragenato cargados de pepsina realizados en las mismas condiciones analíticas.

FIGURE 9. The DSC thermograms of potassium chloride, pepsin, κ -carrageenan powder, blank beads, and pepsin loaded carrageenan 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 carragenato. En los gránulos preparados con un 2,5% (p/v) de carragenato, los gránulos secos eran muy irregulares y tendían a aglomerarse debido a la baja fuerza mecánica. A medida que la concentración de κ -carragenato aumenta (3,5% p/v), la forma del gránulo se mantiene considerablemente. No obstante, la forma de los gránulos cambió a discos esféricos con un centro aplanado (Figura 10) durante el proceso de secado. Esto puede deberse posiblemente a la agregación de fibras helicoidales a los paquetes y a la eliminación de agua del gel³⁷. En general, esta forma esférica se conservó cuando la concentración de carragenato se elevó hasta el 5,0% (p/v), pero la viscosidad de la solución de 5,0% p/v era demasiado alta en las condiciones experimentales presentes para la preparación de los gránulos, así que dicha solución no fue objeto de estudio. Los hidrogeles reticulados alcanzan un nivel de expansión de equilibrio en soluciones acuosas que depende principalmente de la densidad de reticulación. En algunos casos, en función de la composición del disolvente y de la concentración de sólidos durante la formación del gel, se puede producir la separación de fases y se pueden formar “macroporos” o “vacíos” rellenos de agua, que se pueden observar en la Figura 5. Una característica evidente de la superficie de los gránulos era el elevado grado de reticulación al aumentar las concentraciones de cloruro potásico (Figura 5A-C). Además, se mejoró la morfología de la superficie (es decir, la rugosidad descendió) gracias al aumento de la concentración de κ -carragenato (Figura 5D-F) debido a la elevada viscosidad de la solución de κ -carragenato.

Morphology of the beads

The spherical shape of the beads in wet state was usually lost after drying especially for beads prepared with low carrageenan concentration. For the beads prepared with 2.5% w/v carrageenan, the dried beads were very irregular and tend to agglomerate due to low mechanical strength. As the κ -carrageenan concentration increased (3.5% w/v) the shape of beads retained considerably. However, the shape of beads changed to spherical disks with a collapsed center (Figure 10) during the drying process. This may possibly be because of aggregation of the helical fibers into bundles and the squeezing out of some water from the gel³⁷. Normally the spherical shape was retained when the carrageenan concentration was as high as 5.0% (w/v), but viscosity of 5.0% w/v solution was too high for bead preparation under present experimental conditions so such a solution was not studied. Cross-linked hydrogels reach an equilibrium swelling level in aqueous solutions, which depends mainly on the cross-linking density. In some cases, depending on the solvent composition, temperature, and concentration of solids during gel formation, phase separation can occur, and water-filled “voids” or “macropores” can form, which can be observed in Figure 5. One noticeable characteristic of the beads surface is high degree of cross-linking when the concentration of potassium chloride increased (Figure 5A-C). Further, the surface morphology was improved (i.e. roughness decreased) with increasing κ -carrageenan concentration (Figure 5D-F) due to the high viscosity of the κ -carrageenan solution.

FIGURA 10. Fotografía de gránulos de κ -carragenatos húmedos con forma de disco esférico y centro aplanado durante el proceso de secado.
FIGURE 10. Photograph of wet κ -carrageenan beads showing spherical disk shape with collapsed center during drying process.



Estudio de estabilidad

Para la formulación desarrollada, el factor de similitud (f_2) se calculó mediante la comparación de los perfiles de disolución en cada condición de almacenamiento con el control en la condición inicial. Los valores f_2 oscilaron entre 67 y 95, con entre un 2% y un 5% de diferencia media. La extrapolación de la vida de almacenamiento por encima del período para el que es posible procesar datos se realizó de acuerdo con las indicaciones ICH Q1EStep4 (Evaluación de datos de estabilidad). Para ello, un enfoque para analizar los datos de un atributo cuantitativo que se espera que cambie con el tiempo permite determinar el momento en el que el 95% del límite de confianza unilateral para la curva media cortará el criterio de aceptación (no más de un 5% de cambio en el ensayo desde su valor inicial). Los datos de estabilidad a largo plazo de la formulación desarrollada, la formulación comercial y la pepsina pura se extrapolaron de forma lineal (mediante cinética de orden cero) para calcular la vida de almacenamiento (Figura 11), que resultó ser de 3,24 años, 0,97 años y

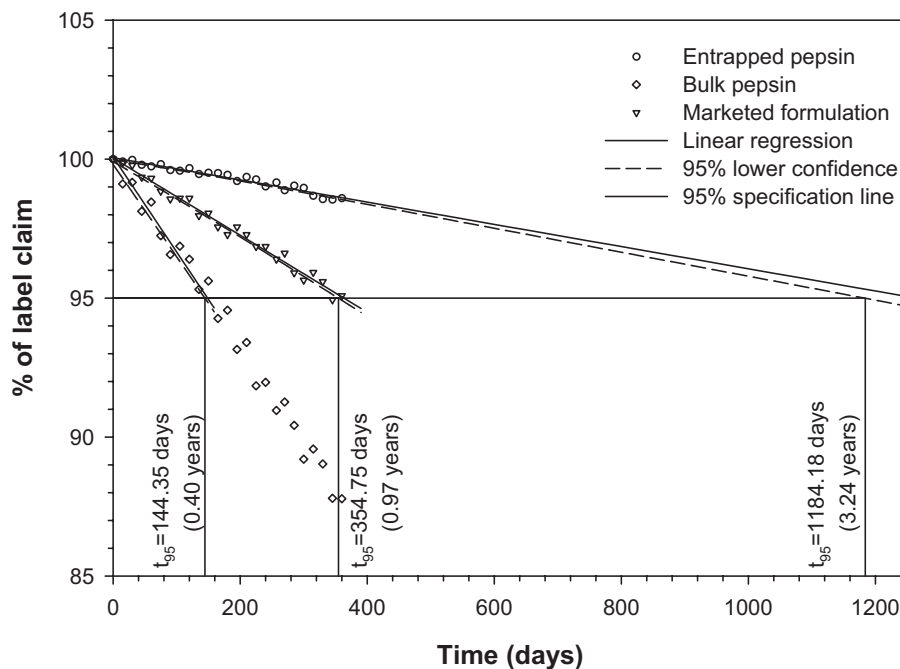
Stability study

For the formulation developed, the similarity factor (f_2) was calculated by a comparison of the dissolution profiles in each storage condition with the control at the initial condition. The f_2 values ranged from 67 to 95 with a 2 to 5% average difference. Extrapolation of the shelf-life beyond the period for which long-term data can be proposed as per the ICH Q1EStep4 (Evaluation of Stability Data) guidelines. For this, an approach to analyzing the data on a quantitative attribute that is expected to change with time is to determine the time at which the 95% one-sided confidence limit for the mean curve intersects the acceptance criterion (not more than 5% change in assay from its initial value). The long-term stability data of the developed formulation, the marketed formulation, and the bulk pepsin were linearly extrapolated (by zero-order kinetics) to calculate the shelf-life (Figure 11), which was found to be 3.24 years, 0.97 year, and 0.40 year respectively. Hence, the stability of the entrapped pepsin was significantly improved than the conventional dosage forms.

0,40 años, respectivamente. Por tanto, la estabilidad de la pepsina capturada mejoró de forma significativa en comparación con las formas de dosificación convencionales.

FIGURA 11. Extrapolación de los datos de estabilidad a largo plazo para el cálculo de la vida de almacenamiento.

FIGURE 11. Extrapolation of long-term stability data for shelf-life calculation.



CONCLUSIONES

Los gránulos de κ -carragenato reticulados mediante actividad ionotrópica mostraron una prometedora mejora de la estabilidad de la pepsina capturada y pueden ocupar un lugar en el diseño de sistemas de administración de fármacos multiparticulares. La optimización del proceso con las superficies de respuesta dio lugar a una captura superior al 81% y un T_{90} inferior a 36 min en las variables de proceso optimizadas (experimento 3). Los valores T_{50} y T_{90} aumentaron a medida que aumentaban las tres variables de proceso. Se observó que el porcentaje de captura y el tamaño de partícula eran directamente proporcionales a la concentración de κ -carragenato e inversamente proporcionales a la concentración de cloruro potásico y el tiempo de endurecimiento. El análisis matemático de las distintas modalidades ha demostrado que la liberación enzimática a partir de los gránulos de carragenato sigue la ecuación de ley exponencial de Korsmeyer-Peppas con un mecanismo de transporte

CONCLUSIONS

Ionotropically cross-linked κ -carrageenan beads exhibited promising stability improvement of entrapped pepsin and can find a place in the design of multiparticulate drug delivery systems. Optimization of the process using the response surfaces resulted in more than 81% entrapment and a T_{90} less than 36 min at optimized process variables (experiment 3). The T_{50} and T_{90} values were increased with increases in all three process variables. The percentage entrapment and particle size were found to be directly proportional to the κ -carrageenan concentration and inversely proportional to the potassium chloride concentration and hardening time. Mathematical analysis of the different drug release modalities has evidenced that enzyme release from the carrageenan beads follows Korsmeyer-Peppas power law equation with a super case-II transport mechanism. Further, the investigation of the release profile using Kopcha model revealed that the enzyme release up to 15 min is by diffusion followed by erosion.

supercaso II. Además, la investigación del perfil de liberación mediante el modelo Kopcha reveló que la liberación enzimática hasta los 15 min se realizaba mediante difusión seguida de erosión. Los estudios de calorimetría diferencial de barrido y FTIR mostraron una dispersión uniforme de la pepsina en los gránulos de carragenato, en el nivel molecular. El análisis de textura descubrió la relación directamente proporcional del grado de reticulación y la concentración de cloruro potásico. Además, la rugosidad de la superficie descendió con el aumento de la concentración de κ -carragenato. El estudio de estabilidad a largo plazo y acelerado demostró una vida de almacenamiento considerablemente mejorada de la pepsina capturada en carragenato, en comparación con la forma de dosificación convencional. Los resultados de los experimentos presentados pueden resultar valiosos para las industrias farmacéuticas que estén estudiando formulaciones de enzimas digestivas.

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro agradecimiento a la University Grants Commission (New Delhi, India) por la beca de investigación senior otorgada a Mr. Mayur G. Sankalia. Agradecemos enormemente a Relax Pharmaceuticals (Vadodara, India) que nos haya proporcionado su experta ayuda y las instalaciones para realizar las pruebas FTIR de este estudio.

FTIR and DSC study showed uniform dispersion of pepsin, at molecular level, in the carrageenan beads. Texture analysis discovered directly proportional relation of degree of cross-linking with potassium chloride concentration. In addition, the surface roughness decreased with increase in κ -carrageenan concentration. Accelerated and long-term stability study illustrated a considerably improved shelf-life of pepsin entrapped in carrageenan, compared with the conventional dosage form. The results of the presented experiments may be of value for pharmaceutical industries dealing with digestive enzymes formulations.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the University Grants Commission (New Delhi, India) for availing Senior Research Fellowship to Mr. Mayur G. Sankalia. We greatly appreciate the Relax Pharmaceuticals (Vadodara, India) for skillful assistance and providing FTIR testing facility in this study.

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Barrett AJ. In: Evered D, Whelan J (ed.) Protein Breakdown in Health and Disease, Excerpta Medica, Amsterdam, 1980; pp 1-13.
2. Sielecki AR, Fedorov AA, Boodhoo A, Andreeva NS, James MNG. The molecular and crystal structures of monoclonic porcine pepsin refined at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 1990; 214: 143-170.
3. Bryksa BC, Tanaka T, Yada RY. N-terminal modification increase the neutral-pH stability of pepsin. *Biochemistry* 2003; 42: 13331-13338.
4. Foltmann B, Pedreson VB. Comparison of the primary structures of acidic proteases and their zymogens. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1977; 95: 3-22.
5. Lin Y, Fused M, Lin X, Hartsuck JA, Tang J. pH dependence of kinetic parameters of pepsin, Rhizopuspepsin and their active-site hydrogen bonds mutants. *J. Biol. chem.* 1992; 267: 18413-18418.
6. Chen H, Langer R. Magnetically-responsive polymerized liposomes as potential oral delivery vehicles. *Pharm. Res.* 1997; 14: 537-540.
7. Picker KM. Matrix tablets of carrageenans. II. Release behavior and effect of added cations. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1999; 25: 339-346.
8. Suzuki S, Lim JK. Microencapsulation with carrageenan-locust bean gum in a multiphase emulsification technique for sustained drug release. *J. Microencapsul.* 1994; 11: 197-203.
9. Sipahigil O, Bortunc B. Preparation and in vitro evaluation of verapamil HCl and ibuprofen containing carrageenan beads. *Int. J. Pharm.* 2001; 228: 119-128.

10. Garcia AM, Ghaly ES. Preliminary spherical agglomerates of water soluble drug using natural polymer and cross-linking technique. *J. Controlled Release* 1996; 40: 179-186.
11. Prestwich GD, Marecak DM, Marecak JF, Vercruyse KP, Ziebell MR. Controlled chemical modification of hyaluronic acid. *J. Control. Rel.* 1998; 53: 93-103.
12. Mangione MR, Giacomazza D, Bulone D, Martorana V, Cavallaro G, San Biagio PL. K(+) and Na(+) effects on the gelation properties of kappa-Carrageenan. *Biophys Chem* 2005; 113: 129-35.
13. Naim S, Samuel B, Chauhan B, Paradkar A. Effect of potassium chloride and cationic drug on swelling, erosion and release from kappa-carrageenan matrices. *AAPS PharmSciTech* 2004; 5: e25.
14. Asanza Teruel ML, Gontier E, Bienaime C, Nava Saucedo JE, Barbotin JN. Response surface analysis of chlortetracycline and tetracycline production with K-carrageenan immobilized *Streptomyces aureofaciens*. *Enzyme Microb Technol* 1997; 21: 314-20.
15. Box GEP, Behnken DW. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics* 1960; 2: 455-476.
16. Lewis GA, Mathieu D, Phan-Tan-Luu R. Response surface methodology. *Pharmaceutical Experimental Design*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1999; pp 185-246.
17. Hileman GA, Goskonda SR, Spalitto AJ, Upadrasha SM. Response surface optimization of high dose pellets by extrusion and spheronization. *Int. J. Pharm.* 1993; 100: 71-79.
18. Bae S, Shoda M. Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production using Box-Behnken design. *Biotechnol Bioeng* 2005; 90: 20-8.
19. Bodea A, Leucuta SE. Optimization of propranolol hydrochloride sustained-release pellets using Box-Behnken design and desirability function. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1998; 24: 145-155.
20. Ragonese R, Macka M, Hughes J, Petocz P. The use of the Box-Behnken experimental design in the optimisation and robustness testing of a capillary electrophoresis method for the analysis of ethambutol hydrochloride in a pharmaceutical formulation. *J Pharm Biomed Anal* 2002; 27: 995-1007.
21. Turner C, Whitehand LC, Nguyen T, McKeon T. Optimization of a supercritical fluid extraction/reaction methodology for the analysis of castor oil using experimental design. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 26-32.
22. Rana P, Mohan N, Rajagopal C. Electrochemical removal of chromium from wastewater by using carbon aerogel electrodes. *Water Res* 2004; 38: 2811-20.
23. Hintze J. *NCSS and PASS Ver. 2003*, Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, Utah, 2003.
24. Gibaldi M, Feldman S. Establishment of sink conditions in dissolution rate determinations - theoretical considerations and application to non-disintegrating dosage forms. *J. Pharm. Sci.* 1967; 56: 1238-1242.
25. Wagner JG. Interpretation of percent dissolved-time plots derived from In vitro testing of conventional tablets and capsules. *J. Pharm. Sci.* 1969; 58: 1253-1257.
26. Higuchi T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *J. Pharm. Sci.* 1963; 52: 1145-1149.
27. Korsmeyer RW, Gurny R, Doelker EM, Buri P, Peppas NA. Mechanism of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int. J. Pharm.* 1983; 15: 25-35.
28. Peppas NA. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. *Pharm. Acta Helv.* 1985; 60: 110-111.
29. Hixson AW, Crowell JH. Dependence of reaction velocity upon surface and agitation. *Ind. Eng. Chem.* 1931; 23: 923-931.
30. Pather SI, Russell I, Syce JA, Neau SH. Sustained release theophylline tablets by direct compression Part I: formulation and in vitro testing. *Int. J. Pharm.* 1998; 164: 1-10.
31. Ritger PL, Peppas NA. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *J. Controlled Release* 1987; 5: 37-42.
32. Kopcha M, Lordi N, Tojo KJ. Evaluation of release from selected thermosoftening vehicles. *J. Pharm. Pharmacol.* 1991; 43: 382-387.
33. Anson ML. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 1939; 22: 79-89.
34. Bhardwaj SB, Shukia AJ, Collins CC. Effect of varying drug loading on particle size distribution and drug release kinetics of verapamil hydrochloride microspheres prepared with cellulose esters. *J. Microencapsul.* 1995; 12: 71-81.
35. Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. *Adv. Drug Del. Rev.* 2002; 43: 3-12.
36. Bonferoni MC, Rossi S, Tamayo M, Pedraz JL, Dominguez Gil A, Caramella C. On the employment of λ carrageenan in a matrix system. II: λ carrageenan and hydroxypropylmethylcellulose mixtures. *J. Controlled Release* 1994; 30: 175-182.
37. Iborra JL, Manjon A, Canovas M. Immobilization in carrageenans. In: Bickerstaff GF (ed.) *Immobilization of Enzymes and Cells*, Humana Press, Totowa, New Jersey, 1997; pp 53-60.