

## LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS. MICROPARTÍCULAS

Virginia Sáez<sup>1</sup>, Estibaliz Hernández<sup>1</sup> y Lucio Sanz Angulo<sup>2</sup>, Issa Katime<sup>1</sup>

1) Grupo de Nuevos Materiales y Espectroscopia Supramolecular. Departamento de Química Física. Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad del País Vasco. Apartado 644. Bilbao. España.

2) Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Minera y de Obras Públicas. Beurco, s/n. Baracaldo. España

### 1. INTRODUCCIÓN

El empleo de sistemas de transporte de medicamentos con alta especificidad y actividad en el lugar de aplicación, sin efectos tóxicos, es un modelo ideal que está tratando de alcanzarse por medio de numerosas investigaciones.

Existen diversos tipos de partículas poliméricas empleadas en la administración de medicamentos. En función de su tamaño, se pueden clasificar en micro- y nanopartículas. Las *micropartículas* son partículas poliméricas esféricas con tamaños que oscilan desde 1 a 250  $\mu\text{m}$  (idealmente diámetros  $< 125 \mu\text{m}$ ). Dentro de este grupo se incluyen las *microcápsulas*, que son sistemas vesiculares en los que el fármaco está confinado en una cavidad rodeada de una única membrana polimérica; y las *microesferas* que son sistemas matrices en los que el fármaco está disperso en la partícula. Las *nanopartículas* son sistemas poliméricos submicrónicos ( $< 1 \mu\text{m}$ ). De acuerdo con el proceso empleado para preparar nanopartículas, pueden obtenerse *nanocápsulas* o *nanoesferas*, éstas son las equivalentes morfológicas de las microcápsulas y de las microesferas, respectivamente (Rollot et al., 1986).

Se pueden emplear diversos procesos en la preparación de micro- y nanopartículas, entre los que se encuentran: la evaporación del disolvente, separación de la fase orgánica, polimerización interfacial, polimerización en emulsión y secado por spray.

Se han de tener presentes una serie de consideraciones farmacéuticas en el desarrollo de estos sistemas de liberación controlada: : 1. Tipo de material, 2. ruta de preparación, 3. tamaño de las partículas, 4. cantidad de fármaco incorporado, 5. carga, 6. fármaco liberado (*in*

*vivo e in vitro*), 7. estabilidad del fármaco, 8. estabilidad del sistema de liberación, 9. efecto del almacenamiento, 10. propiedades de la superficie, 11. presentación, 12. antigenicidad, 13. biofase y toxicidad del sistema de liberación, 14. fármaco y biocinética del sistema de liberación.

Para las microesferas, el desechado no específico del sistema reticuloendotelial es el principal obstáculo para conseguir sistemas efectivos, a pesar de que estos sistemas se han tratado de modificar apropiadamente (*Davis et al., 1986*).

Para los sistemas de transporte de conjugados poliméricos, su baja solubilidad suele causar problemas en su síntesis (*Duncan et al., 1987; Endo et al., 1987*) y en su inyección en el flujo sanguíneo (*Zunino et al., 1989*).

Las micelas poliméricas son uno de los sistemas menos estudiados. Se han hecho investigaciones centradas en sus características fisicoquímicas, especialmente en disolventes orgánicos (*Chu et al., 1995*). Pero también relacionado con la química de polímeros anfifílicos, ahora existen micelas poliméricas solubles en agua, biocompatibles y biodegradables.

## 2. BIOMATERIALES

Se han conseguido grandes avances en la liberación controlada de agentes bioactivos mediante el empleo de sistemas poliméricos biodegradables. Muchos de estos sistemas emplean compuestos de homo- y copolímeros biodegradables.

El término biomaterial engloba todos los materiales introducidos en los tejidos corporales con propósitos terapéuticos específicos, de diagnóstico, o con propósitos preventivos. Estos materiales deben ser *biocompatibles*, lo que significa que no deben causar ninguna respuesta adversa significativa del medio fisiológico que dañe el biomaterial; tras la interacción con los tejidos y fluidos corporales, deben *biodegradarse* en componentes no tóxicos, tanto química como físicamente, o por una combinación de ambas. Otros términos intercambiables para la biodegradación son la *bioerosión* y la *bioabsorción*.

En algunos casos, la liberación del agente incorporado depende de la velocidad de degradación del material polimérico. La *degradación heterogénea* ocurre en la superficie del material que está en contacto con el medio fisiológico. En este caso, la velocidad de degradación es constante y el material no degradado mantiene su integridad química durante el proceso. Lógicamente, aquellos materiales que poseen alta relación superficie/volumen se degradarán más rápido que sus equivalentes con una relación menor. Sin embargo, la *degradación homogénea* supone un deterioro aleatorio en toda la masa de la matriz polimérica. Mientras el peso molecular del polímero decrece de forma continua, el material puede mantener su forma original y retener masa hasta que el polímero ha experimentado una considerable degradación (más del 90%), y alcanza un peso molecular crítico, en ese momento, comienza la solubilización y pérdida de masa.

### 3. MICROESFERAS

Fueron introducidas a mediados de 1970. Son partículas esféricas sin una distinción entre cubierta y núcleo y con un tamaño de partícula entre una y varias decenas de micras. Tienen una estructura monolítica, el fármaco queda incorporado dentro de una matriz polimérica, preparada a partir de materiales biocompatibles y con un gran espectro de velocidades de cesión y propiedades degradativas (*Torrado y Cadórniga, 1989a*).

Las características de la microesfera ideal serían: selectividad por el tejido diana, acoplamiento entre una liberación controlada y sostenida, así como evitar el daño en el tejido huésped.

En cuanto a la liberación *in vitro* pasiva de fármacos desde microesferas monolíticas, ésta es característicamente bifásica, con una liberación inicial grande y rápida (efecto “*burst*”), seguida de una liberación mucho más lenta. También se ha comprobado, cómo la liberación del fármaco desde microesferas de menor tamaño, resulta mayor y más rápida durante la fase de liberación lenta. Probablemente, ello sea debido a que exhiben una mayor área superficial para la liberación. El uso de tamaños pequeños está indicado para la quimioembolización en la terapia del cáncer, y tamaños mayores son más recomendables, por ejemplo, en la utilización intraarticular.

El estado físico del fármaco en una microesfera, el tipo de matriz, las proporciones de fármaco y matriz, el grado y la naturaleza del entrecruzamiento, la interacción entre fármaco y matriz, y el medio de liberación influyen en la cesión del fármaco desde las microesferas. La liberación del fármaco tiene lugar a través de varias rutas, entre las cuales se pueden citar: la erosión de la superficie, la total desintegración, difusión, y una combinación de difusión y erosión o degradación (Torrado y Cadórniga, 1989b).

### 3.1. Preparación de microesferas para liberación de fármacos

Existen muchos métodos para microencapsular fármacos en biomateriales para su administración. La Figura 1 ilustra la técnica de dispersión / emulsión seguida de eliminación de disolvente (Sato et al., 1988). Los tres procesos más frecuentemente utilizados son la separación de fases, la evaporación del disolvente y el secado en spray.

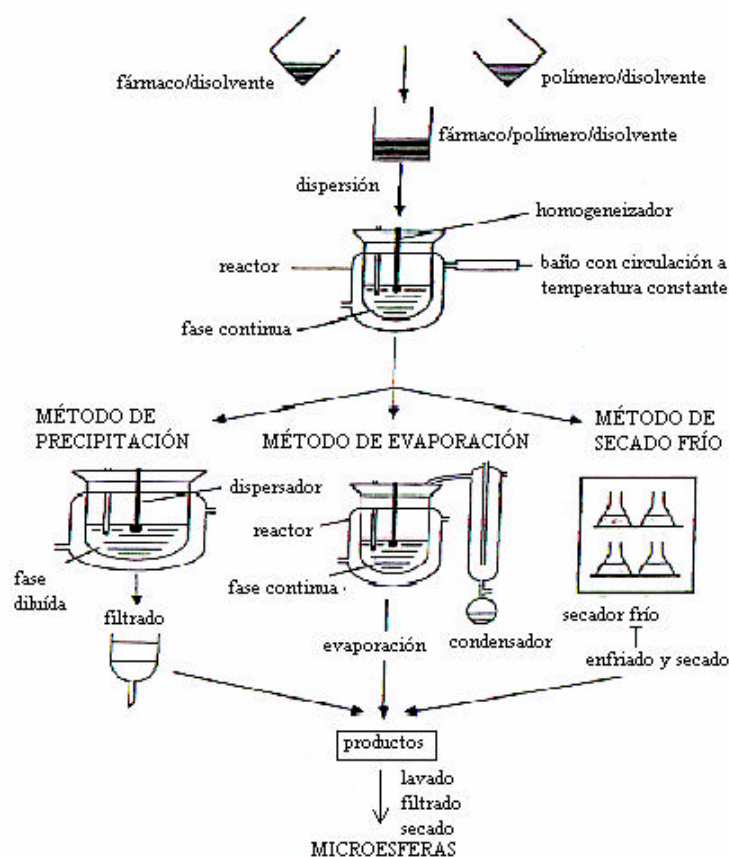


Figura 1. Esquema del proceso de preparación de microesferas.

- El *proceso de separación de fases* requiere la emulsificación de la disolución de fármaco, o la suspensión de las partículas de fármaco en una disolución de polímero biodegradable. La adición de un segundo polímero causa la precipitación del primero en forma de gotas líquidas o partículas sólidas. La compactación de las microesferas se consigue por la adición de un precipitante, del que después se aíslan. Existen muchas variables de proceso en este método que deben ser caracterizadas y controladas para obtener un producto final satisfactorio. El tamaño de la microesfera estará determinado por las densidades de las fases disolventes, las velocidades de mezclado, el tipo de surfactante, la concentración y la temperatura. La porosidad estará influenciada por la composición de la fase dispersa y por la velocidad de eliminación del disolvente.

- En los *procesos de evaporación del disolvente* se forma una triple emulsión (agua/aceite/agua) con el fármaco contenido en la fase acuosa interna, el polímero en un disolvente orgánico en la fase oleosa, y una fase acuosa externa. El disolvente es eliminado a baja presión (y normalmente a baja temperatura) para aumentar la viscosidad de la fase interna, seguida del aislamiento de las microesferas. Las variables del proceso, del mismo modo que en el caso anterior, deben controlarse con sumo cuidado, así como la presión durante la evaporación. Este proceso suele dar lugar a matrices relativamente no porosas.

- En el *proceso de secado en spray* el fármaco en disolución acuosa o en forma de partículas sólidas es dispersado en una disolución de polímero disuelto en un disolvente. Esta mezcla se bombea hacia el atomizador de aire caliente del secador en spray donde las partículas se secan y se llevan a un separador para su recogida.

### 3.2. Propiedades fisicoquímicas de las microesferas

Las propiedades fisicoquímicas requeridas para las microesferas están gobernadas por el tipo de fármaco y la aplicación *in vivo* para la que se van a emplear.

-*Tamaño de partícula.* Es un factor importante, ya que la ruta de administración determinará el tamaño requerido para las microesferas.

- *Área superficial/porosidad.* Las matrices de porosidad variable facilitan la modulación de la liberación del fármaco. Las microesferas porosas son esenciales para la liberación de sustancias de elevado peso molecular que no pueden difundir desde una matriz no-porosa; también son útiles para liberar sustancias que presentan elevada afinidad hacia el polímero y que no se liberan a menos que la matriz se degrade. La degradación del polímero puede ser controlada alterando la porosidad de la matriz, y de este modo también se controla la liberación del fármaco.

- *Contenido de fármaco/liberación del fármaco.* Estas dos variables dependen de la dosis que se trate de alcanzar y la velocidad de dosificación del fármaco en cada tratamiento particular. Los medicamentos de baja potencia deben proporcionarse en dosis elevadas de modo que las microesferas deben estar muy cargadas de fármaco. El contenido de fármaco también depende de la cantidad del mismo que es capaz de aceptar la ruta de administración para la que ha sido diseñado.

- *Tiempos de biodegradación.* El tiempo requerido para degradar las microesferas completamente viene gobernado por la ruta de administración y la frecuencia de las dosis. Por ejemplo, en las rutas por inhalación generalmente empleadas para terapias crónicas se requiere una rápida biodegradación para evitar acumulaciones en el sistema, así como en la liberación intravenosa, mientras que la liberación subcutánea o intramuscular pueden tolerar cierta acumulación de partículas con degradaciones más lentas.

### 3.3. Proceso aséptico o esterilización terminal

En el proceso de encapsulación hay que asegurar que se alcanza un nivel deseado de esterilización. En el proceso aséptico, los componentes individuales empleados se esterilizan, por lo que las actividades de procesado y empaquetamiento ocurren bajo condiciones controladas y asépticas. Los procesos de esterilización terminal se realizan al final, para destruir restos de contaminación microbiológica.

La principal diferencia entre ambos procesos es el nivel de esterilidad asegurado del producto final. Normalmente, en los procesos asépticos la contaminación del producto final es de 1 por cada 1000 y en los procesos de esterilización terminal es de 1 por millón.

### 3.4. Aplicaciones de las microesferas

Una de las aplicaciones farmacéuticas más importantes de las microesferas es en la liberación de medicamentos. La investigación actual en farmacología está enfocada en dos áreas diferentes pero complementarias: sistemas de liberación controlada y vectorización. El perfil de cesión depende de numerosos parámetros: tamaño, distribución, porosidad, degradabilidad, permeabilidad del polímero, etc.

La vía de administración más ventajosa en principio para sistemas microencapsulados poliméricos de liberación controlada es la parenteral, es decir, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular. Una vez suministradas, las microesferas pueden actuar como pequeños sistemas de reserva liberando lentamente el fármaco.

Los materiales más adecuados para esta vía de administración son los biodegradables ya que van a ser eliminados por el organismo a través de productos de degradación biocompatibles que se transforman en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O por las vías metabólicas usuales.

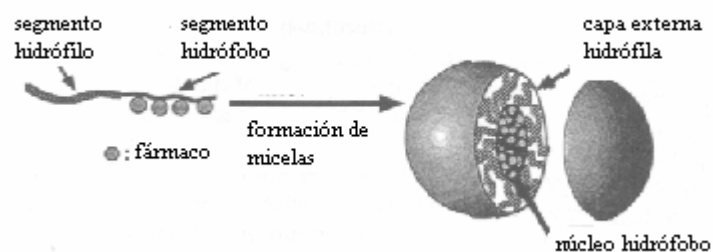
La gran ventaja de estos sistemas microparticulados frente a soluciones alternativas como implantes es que, debido a su pequeño tamaño, pueden ser inyectados con una jeringa convencional, no necesitando por tanto intervención quirúrgica. Por otro lado, y aunque resulte paradójico, puede ser más fácil para una microesfera introducirse en una célula que para el fármaco libre, ya que una nano o micropartícula de tamaño adecuado es incorporada fácilmente como vacuola por fagocitosis.

Son sistemas muy interesantes como transportadores de fármacos que no puedan administrarse con garantía por vía oral, como son los nuevos fármacos producto de la revolución biotecnológica, proteínas, péptidos, hormonas o enzimas, los cuales son degradados fácilmente por las enzimas del tracto gastrointestinal. Además, se han descrito y ensayado clínicamente sistemas microparticulados poliméricos que incorporan anticancerígenos (*Wood et al., 1985*), inmunosupresores (*Yoshikawa et al., 1989*), vitaminas (*Sánchez et al., 1993*), antibióticos, antibacterianos (*Pavanetto et al., 1992*), antiinflamatorios (*Dubemet et al., 1987*), vacunas (*Eldridge et al., 1991*).

La otra vía de investigación mencionada anteriormente de gran interés en este campo es la vectorización (“targeting”). La administración de un fármaco libre vía oral, intravenosa, etc., normalmente da lugar a una distribución sistémica del compuesto activo, cuando lo que está afectado es sólo un tejido, un área local o un tipo de células. Desde esta perspectiva tendría mucho más sentido conseguir una acción vectorizada del fármaco, sobre todo para aquellos compuestos de alta toxicidad (como los anticancerígenos) o para aquellos con un bajo índice terapéutico. Por ejemplo, la administración mediante estos sistemas de liberación (microesferas, etc.) supone una mejora en la administración de los agentes anestésicos, reduciendo el número de dosis necesarias, evitando efectos tóxicos sistémicos y aumentando su concentración en el lugar deseado (*Le Corre et al., 1997; Blanco et al., 1999; Estebe et al., 1995*).

#### 4. MICELAS

Los copolímeros compuestos de segmentos hidrófilos e hidrófobos poseen la capacidad de formar estructuras micelares en un medio acuoso. Aunque existen varios tipos de copolímeros de bloque potencialmente capaces de formar estructuras micelares, los copolímeros de bloque tipo AB son los candidatos más apropiados para diseñar el tamaño, el grado de agregación y la estabilidad de las micelas formadas, debido a su arquitectura molecular simple. En la Figura 2 se muestra un copolímero de bloque tipo AB compuesto de segmentos hidrófilos e hidrófobos que forman una estructura micelar como resultado del carácter anfifílico.



**Figura 2.** Estructura de las micelas de copolímeros de bloque.

Hasta hace poco, se habían realizado pocos estudios centrados en la aplicación de las micelas poliméricas como sistemas de transporte de fármacos. Aunque Ringsdorf et al. (*Baker*



*et al.*, 1984; Pratten *et al.*, 1985) y Kavanov *et al.* (Kavanov *et al.*, 1989) sugirieron la formación de micelas a partir de conjugados polímero-fármaco, no fueron capaces de confirmar su formación por métodos directos. Yokohama *et al.* confirmaron la formación de micelas *in vitro* (Yokohama *et al.*, 1989, 1990) e *in vivo* (Yokohama *et al.*, 1991) con copolímeros de bloque de poli(óxido de etileno)-poli(ácido aspártico) conjugados con adriamicina, [PEO-Poli(Asp(ADR))] por medio de difusión dinámica de luz láser y cromatografía de gel.

La eficacia terapéutica de muchos fármacos de bajo peso molecular se puede mejorar combinándolos con transportadores poliméricos. El núcleo hidrófobo de las micelas poliméricas facilita la incorporación de fármacos hidrófobos (Chen *et al.*, 1970) ya sea por medio de enlaces covalentes o no covalentes, tales como interacciones hidrófobas e interacciones iónicas.

Entre las ventajas de los sistemas micelares de liberación de medicamentos se citan los siguientes:

1. Diámetro apropiado para periodo prolongado de vida media en sangre.
2. No acumulación a largo plazo.
3. Alta solubilidad en agua.
4. Alta estabilidad estructural.
5. Microdepósito en el núcleo hidrófobo.
6. Funcionalidad separada.

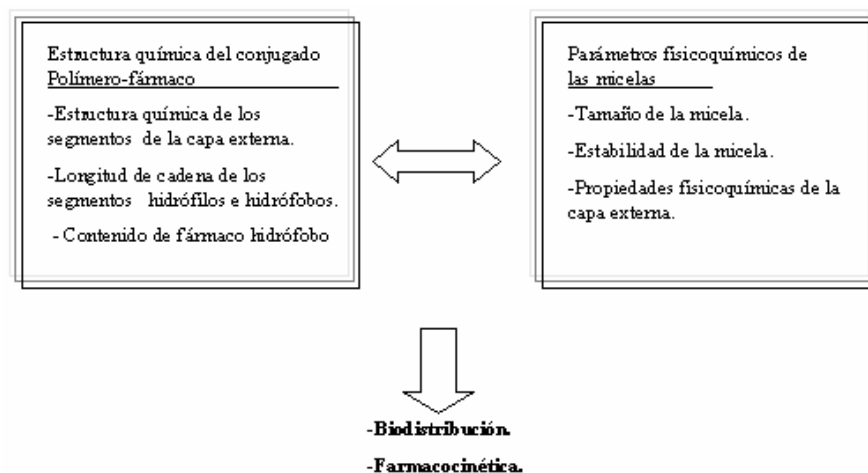
Como se ha descrito, la primera ventaja de las micelas es su prolongada vida media en la sangre ya que la filtración renal se suprime debido a su gran tamaño ( las micelas poliméricas tienen diámetros mucho mayores que las cadenas poliméricas individuales). Incluso si el peso molecular de las cadenas que las constituyen es menor que el peso molecular crítico para la filtración renal, estas cadenas poliméricas pueden escapar de la excreción renal formando estructuras micelares de diámetro mayor al tamaño crítico para la filtración renal. Como resultado de la circulación a largo plazo, la actividad del fármaco continúa después de una única inyección durante un largo periodo de tiempo. Las micelas poliméricas son únicas por el hecho de que pueden permanecer prácticamente intactas a

niveles por debajo de la concentración micelar crítica (CMC), de modo que pueden conservar su estructura y acumularse preferencialmente en tumores sólidos debido a la escasez de capilares en las proximidades.

Por otro lado, como las micelas están formadas por interacciones intermoleculares no covalentes en equilibrio con las formas poliméricas de cadenas individuales, todo el polímero puede ser eliminado como cadenas de polímero individuales procedentes de la estructura micelar, con una excreción completa por la ruta renal, debido a que estas cadenas de polímero tienen pesos moleculares menores que los valores críticos para la filtración renal. Además, se evita el efecto de toxicidad asociada a la acumulación del fármaco de larga duración, ya que éste está circulando en la sangre en forma de micelas.

Para los transportadores poliméricos convencionales la baja solubilidad de los conjugados polímero-fármaco suele causar problemas de síntesis (*Duncan et al., 1987; Endo et al., 1987*), así como de inyección (*Zunino et al., 1989*). Como muchos fármacos tienen carácter hidrófobo, su conjugación con un polímero suele conducir a la precipitación debido a la concentración altamente localizada de las moléculas del medicamento hidrófobo a lo largo de la cadena de polímero. Las micelas poliméricas con estructura capa/núcleo pueden mantener su solubilidad en agua inhibiendo la agregación intermicelar de los núcleos hidrófobos.

El medio hidrófobo posee una serie de propiedades potencialmente útiles. Por ejemplo, puede proteger al medicamento de ser desactivado por enzimas u otras especies bioactivas del medio acuoso (sangre) (*Yokohama et al., 1990; Wilhelm et al., 1991*). Además, el medio hidrófobo afecta a la velocidad de liberación del fármaco, en muchos casos disminuyéndola. En otras palabras, la velocidad de liberación está controlada tanto por la estabilidad de las micelas como por la hidrofobicidad del núcleo micelar y las especies químicas empleadas para unir el fármaco a la cadena principal del polímero. Estos factores pueden ser independientes de las propiedades del fármaco unido al núcleo hidrófobo, de modo que la liberación del fármaco es independiente del propio agente farmacológico transportado.



**Figura 3.** Control de la liberación in vivo de las micelas poliméricas.

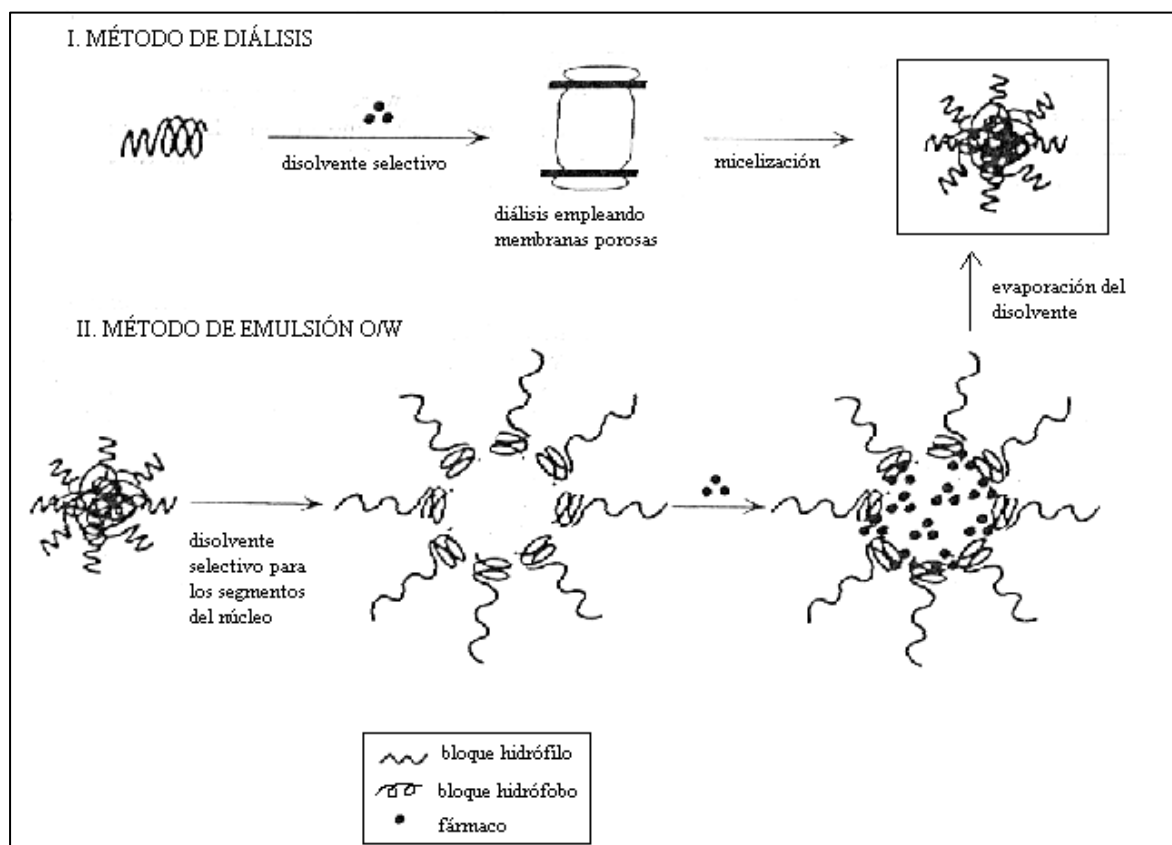
En la Figura 3 se muestra un esquema de los parámetros que afectan a la biodistribución y la farmacocinética de los medicamentos. En los sistemas convencionales polímero-fármaco la velocidad de liberación está controlada principalmente por las uniones químicas entre el fármaco y el polímero.

En las micelas poliméricas, las funciones como transportadores de fármaco son compartidas por los segmentos estructurales separados del copolímero de bloque. La capa externa es responsable de las interacciones con los biocomponentes, tales como proteínas y células, lo que determina el comportamiento farmacocinético y la biodistribución del fármaco. Por tanto, la liberación del medicamento *in vivo* está controlada por los segmentos de la capa externa, independientemente del núcleo micelar que expresa la actividad farmacológica. La estructura heterogénea es más favorable para construir sistemas transportadores altamente funcionalizados, más que los sistemas de transporte poliméricos convencionales.

Existen otras ventajas debidas al pequeño tamaño de las micelas poliméricas: Su esterilización puede realizarse simplemente por filtración, sin necesidad de procesos asépticos. Además, no existen pruebas de que causen embolismo en los capilares, lo que sí puede ocurrir con las microesferas poliméricas.

En muchos aspectos, como su pequeño tamaño, autoenlaces en forma de estructuras capa/núcleo y su naturaleza temporal, las micelas poliméricas recuerdan a los virus. Por eso, ambos están siendo estudiados en la liberación de genes (Katayose y Kataoka, 1995).

Existen diversos métodos para cargar el fármaco en las micelas (Kwon et al., 1995) (ver Figura 4). Uno de ellos consiste en añadir el fármaco y el copolímero en un disolvente miscible con el agua, y dializar la disolución con agua. Las micelas poliméricas cargadas de fármaco se forman a medida que el disolvente reemplaza al agua. Otro método consiste en introducir el fármaco en el polímero por un método de emulsión aceite en agua (o/w). En primer lugar, se prepara una disolución acuosa de micelas del copolímero y a continuación se forma una emulsión o/w mediante la adición de una disolución del fármaco en cloroformo. El copolímero estabiliza la emulsión o/w, que es agitada hasta que el cloroformo se evapora y se forman las micelas cargadas de fármaco (Kwon et al., 1995).



**Figura 4.** Rutas para la absorción física de fármacos hidrófobos en micelas poliméricas. I. método de diálisis. II. Método de emulsión o/w.

Ambos métodos proporcionan un contenido en fármaco del 10% en peso aproximadamente. Normalmente, el método de emulsión o/w es más eficiente (65% frente al 8%).

## 5. CONCLUSIONES

Las micro- y nanopartículas representan nuevas tecnologías que parecen ser capaces de mejorar la farmacocinética de muchas sustancias, incluidos los péptidos, y en muchos casos presentan capacidad para atravesar las barreras biológicas (enzimáticas o mecánicas) de forma eficiente.

Los procesos de microencapsulación son procesos complejos, multifásicos, que requieren de equipos especializados y personal bien capacitado; y van a depender en gran medida de la capacidad de la industria farmacéutica para buscar nuevos polímeros y diseñar nuevas técnicas más avanzadas.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Bader, H., Ringsdorf, H., Schmidt, B., *Angew. Chem.*, 123/124 (1984) 457-485.
- Blanco, M. D., Bernardo, M. V., Gómez, C., Muñiz, E., Teijón, J. M., *Biomaterials*, 20 (1999) 1919.
- Chen, J. L., Cyr, G. N. en *Adhesive Biological Systems*, R. S., Manly (Ed), Academic Press, New York, London, 1970.
- Chu, B., *Langmuir*, 11 (1995) 414-421.
- Couvreur, P., Puisieux, F., *Adv. Drug Deli. Rev.*, 10 (1993) 141-162.
- Davis, S. S., Illum, L., *Colloidal delivery systems-Opportunities and challenges. Site-Specific Drug Delivery*, E. Tomlinson, S. S. Davis (Eds), pp.93-110 (1986), John Wiley & Sons Ltd.; UK.
- Dubemet, C., Benoit, J. P., Couarraze, G., Duchène, D., *Int. J. Pharm.*, 35 (1987) 145.
- Duncan, R., Kopekova-Rejmanova, P., Strohal, J., Hume, I., Cable, H. C., Pohl, J., Lloyd, B., Kopecek, J., *Br. J.Cancer*, 55 (1987) 165-174.
- Eldrige, J. H., Staas, J. K., Meulbrock, J. A., McGhee, J. R., Tice, T. R., Gilley, R. M., *Mol. Immunol.*, 28 (1991) 287.

- Endo, N., Umemoto, N., Kato, Y., Takeda, Y., Hara, T., *J. Immunol. Methods*, 104 (1987) 253-258.
- Estebe, J. P., Le Corre, P., Chevanne, F., Malljdant, Y., Le Verge, R., *Anesth. Analg.* 81 (1995) 99.
- Finch, C. A., en “*Encapsulation and Controlled Release*”, D. R. Karsa y R. A. Stephenson, (Eds.), 1 (1994).
- Katayose, S., Kataoka, K., *5<sup>th</sup> Iketani Conf.*, 1 (1995) 202-203.
- Kavanov, A. V., Chekhonin, V. P., Alakhov, V. Y., Batrakova, E. V., Lebedev, A. S., Melik-Nubarov, N. S., Arzhakov, S. A., Levashov, A. V., Morozov, G. V., Severin, E. S., *FEBS Lett.*, 258 (1989) 343-345.
- Kwon, G., Naito, M., Yokohama, M., Okano, T., Sakurai, Y., Kataoka, K., *Pharm. Res.*, 12 (1995) 200-203.
- Kwon, G., Okano, T., *Adv. Drug Deli. Rev.*, 21 (1996) 107-116.
- Le Corre, P., Rytting, J. H., Gajan, V., Chevanne, F., Le Verge, R., *J. Microencapsulation*, 14 (1997) 243.
- Pavanetto, F., Conti, B., Genta, I., Giunchedi, P., *Int. J. Pharm.*, 84 (1992) 151.
- Pratten, M. K., Lloyd, J. B., Hörpel, G., Ringsdorf, H., *Makromol. Chem.*, 186 (1985) 725-733.
- Rollot, J. M., Couvreur, P., Roblot-Treupel, L., Puisieux, F., *J. Pharm. Sci.*, 75 (1986) 361-364.
- Sánchez, A., Vila-Jato, J. L., Alonso, M. J., *Int. J. Pharm.*, 99 (1993) 263.
- Sato, T., Kanke, M., Schroeder, H. G., DeLuca, P. P., *Pharm. Res.*, 5 (1988) 21-30.
- Sun, A. M., Vcek, I., Tai, I., en “*Microcapsules and nanoparticles in Medicine and Pharmacy*” M. Dombrow (Ed.), CRC Press, 315 (1995).
- Torrado, J. J., Cadórniga, R., *Vectorización*, CIF, 8 (1989a) 242.
- Torrado, J. J., Cadórniga, R., *Farm. Clin.*, 6 (1989b) 724.
- Whateley, T. L.(Ed), *Microencapsulation of drug*, Harwood Publ., (1992).
- Whateley, T. L. en“*Encapsulation and Controlled Release*”, D. R. Karsa y R. A. Stephenson, (Eds.), 52 (1994).
- Wilhelm, M., Zhao, C. L., Wang, Y., Xu, R., Winnik, M. A., Mura, J. L., Riess, G., Croucher, M. D., *Macromol.*, 24 (1991) 1033.
- Wood, R. W., Li, V. H. K., Kreuter, J., Robinson, J. R., *Int. J. Pharm.*, 23 (1985) 175.

- Yokohama, M., Inoue, S., Kataoka, K., Yui, N., Okano, T., *Makromol. Chem.*, 190 (1989) 2041-2054.
- Yokohama, M., Miyauchi, M., Yamada, N., Okano, T., Sakurai, Y., Kataoka, K., Inoue, S., *Cancer Res.*, 50 (1990) 1693-1700.
- Yokohama, M., Okano, T., Sakurai, Y., Ekimoto, H., Shibazaki, C., Kataoka, K., *Cancer Res.*, 51 (1991) 3229-3236.
- Yokohama, M., Kwon, G., Okano, T., Sakurai, Y., Sato, T., Kataoka, K., *Bioconj. Chem.*, 3 (1992) 295-301.
- Yoshikawa, H., Nakao, Y., Takada, K., Muranishi, S., Wada, R. T., Tabata, Y., Hyon, S. H., Ikada, Y., *Chem. Pharm. Bull.*, 37 (1989) 802.
- Zunino, F., Pratesi, G., Micheloni, A., *J. Control. Rel.*, 10 (1989) 65-73.