

El polietilenglicol como agente antiagregante en la preparación de microesferas de gelatina con celecoxib

Polyethylene glycol as a de-aggregating agent in the preparation of celecoxib loaded gelatin microspheres

THAKKAR H, MURTHY RSR

Drug Delivery Laboratory, Centre of Relevance and excellence in NDDS, Pharmacy Department, Donor's Plaza, Opp. To University main office, M.S.University of Baroda, Fatehgunj, Vadodara-390 002, India.e-mail: murthyrsr@satyam.net.in

RESUMEN

Se prepararon microesferas de gelatina con elevada eficiencia de captura mediante el método de reticulación química por emulsificación, utilizando polietilenglicol como agente antiagregante. Para la reticulación de la gelatina se utilizaron dos agentes de reticulación diferentes: formaldehído y glutaraldehído. Las microesferas preparadas se caracterizaron mediante microscopía electrónica de barrido según la eficiencia de captura, el tamaño de las partículas, la liberación de fármaco in vitro y la morfología. Los estudios de espectrometría FTIR indicaron la ausencia de interacción química entre la gelatina y el PEG. El PEG actúa únicamente como barrera para impedir la agregación de las microgotas de gelatina presentes en la fase interna de la emulsión durante la preparación. Los estudios de liberación de fármaco in vitro indicaron que las microesferas reticuladas mediante glutaraldehído presentaban un índice de liberación inferior a las reticuladas con formaldehído. La liberación repentina se observó en ambos casos. En general, aproximadamente un 40% del fármaco se libera en la primera hora, seguido de una liberación lenta durante unas 96 horas en el caso de las microesferas reticuladas con glutaraldehído.

PALABRAS CLAVE: Agente antiagregante. Microesferas de gelatina. Polietilenglicol.

ABSTRACT

Gelatin microspheres with high entrapment efficiency were prepared using emulsification chemical cross-linking method using polyethylene glycol as a de-aggregating agent. Two different cross-linking agents viz. formaldehyde and glutaraldehyde were used for cross-linking gelatin. The prepared microspheres were characterized for entrapment efficiency, particles size, in-vitro drug release and the morphology was studied by scanning electron microscopy. The FTIR studies indicated that there is no chemical interaction between gelatin and PEG. PEG acts only as a barrier to the aggregation of the gelatin microdrops present in the internal phase of the emulsion, while preparation. In-vitro drug release studies indicated that the microspheres cross-linked using glutaraldehyde showed slower release rate than those cross-linked with formaldehyde. Burst release was observed in both the cases. In general, about 40% of the drug is released in the first hour followed by a slow release for about 96 hours for glutaraldehyde cross-linked microspheres.

KEY WORDS: De-aggregating agent. Gelatin microspheres. Poly-ethylene glycol.

1. INTRODUCCIÓN

La gelatina es una proteína desnaturalizada y biodegradable que se obtiene mediante el tratamiento ácido o alcalino del colágeno¹. La gelatina se ha utilizado ampliamente en las industrias farmacéutica y alimentaria. En el sector farmacéutico, no sólo se utiliza para formulaciones de fármacos convencionales, como cápsulas de gelatina blandas y duras, sino también para la liberación controlada del fármaco². Existen numerosos informes sobre el uso de gelatina para la microencapsulación de diversos fármacos. Como transporte de fármaco, la gelatina tiene la ventaja de ser biocompatible y biodegradable^{3,4}. Y no es tóxica, tiene una antigenicidad baja y es relativamente barata⁵. Además, admite diversos grados de reticulación para conseguir una liberación controlada del fármaco. Las microesferas de gelatina se han preparado mediante coacervación simple^{6,7}, coacervación compleja^{8,9} y mediante el método de reticulación por emulsificación^{10,11}. Los métodos mencionados anteriormente son simples, pero las microesferas producidas tienden a adherirse entre sí y sus propiedades de fluidez son bajas^{12,13}. Para evitar el problema de la agregación de las microesferas se agregan diversos agentes antiagregantes insolubles, como el triestearato de aluminio¹⁴ y el estearato de magnesio¹⁵. Estos agentes actúan como barrera frente a la agregación de las gotitas de la fase interna. Pero el uso de estos agentes antiagregantes no está permitido en formulaciones destinadas al uso por vía parenteral¹⁶. Además, estos agentes alteran las características de liberación de fármaco de las microesferas¹⁵. Por tanto, sería deseable utilizar un material aceptable para uso parenteral y que no influya en las características de las microesferas para conseguir un flujo de microesferas libre. Al agregar un surfactante en la fase externa de la emulsión se reduce la coalescencia de las gotitas de la fase interna. Estos emulsificantes poseen por lo general una fracción hidrofílica y una lipofílica, de forma que, al producirse la absorción en las microgotas de la fase interna, se reduce la aglomeración de partículas debido a que las partículas con revestimientos similares no se atraen entre sí. El poli (etileno glicol) es un surfactante no iónico utilizado

1. INTRODUCTION

Gelatin is a denatured and biodegradable protein obtained by acidic or alkaline treatment of collagen¹. Gelatin has been widely used in pharmaceutical and food industry. In the pharmaceutical field, it is not only used for conventional drug formulations such as hard and soft gelatin capsules, but also for controlled drug delivery². There are many reports on using gelatin for the microencapsulation of various drugs. As a drug carrier, gelatin has the advantages of being biocompatible, biodegradable^{3,4}. In addition it is non-toxic having low antigenicity and relatively inexpensive⁵. Moreover, it can be cross-linked to various degrees to achieve controlled release of the drugs. Gelatin microspheres have been prepared by simple coacervation^{6,7}, complex coacervation^{8,9} and emulsification cross-linking method^{10,11}. The methods stated above are simple but the microspheres produced tend to adhere together and show poor flow properties^{12,13}. Various insoluble anti-tacking agents like aluminium tristearate¹⁴ and Magnesium stearate¹⁵ are added to avoid the problem of aggregation of the microspheres. These agents act as a physical barrier to the aggregation of the droplets of the internal phase. But the use of these anti-tacking agents is not permitted in the formulations to be used parenterally¹⁶. Moreover, these agents alter the release characteristics of the drug from the microspheres¹⁵. So, a material which is parenterally acceptable and which does not influence the characteristics of the microspheres is desirable to be used for achieving free flowing microspheres. Addition of a surfactant in the external phase of the emulsion reduces the coalescence of the droplets of the internal phase. These emulsifiers generally possess a hydrophilic moiety and a lipophilic moiety, such that, upon absorbing to microdrops of the internal phase, they reduce particle agglomeration because the similarly coated particles do not attract each other. Poly (ethylene glycol) is a non-ionic surfactant used as an anti-tacking agent in the manufacturing of tablets. So, it was hypothesized that the addition of poly (ethylene glycol) in the process of microsphere preparation would reduce the agglomeration between the gelatin microdrops pre-

como agente antiagregante en la fabricación de comprimidos. Por tanto, se planteó la hipótesis de que la adición de poli (etileno glicol) en el proceso de preparación de las microesferas reduciría la aglomeración entre las microgotas de gelatina presentes en la fase interna de la emulsión, al reducir la atracción entre las partículas. Este informe describe los resultados de la producción de microesferas de gelatina utilizando un agente antiagregante aceptable para uso parenteral. El polietilenglicol es un surfactante no iónico que ha sido utilizado en formulaciones para uso parenteral y ha demostrado no ser tóxico¹⁶. Por esta razón, el polietilenglicol se utilizó en el presente estudio como agente antiagregante para preparar microesferas de gelatina. La artritis es una enfermedad del sistema musculoesquelético que afecta a diversas articulaciones del cuerpo produciendo dolor, inflamación e hinchazón¹⁷. Los fármacos más utilizados en el tratamiento de la artritis son los antiinflamatorios no esteroideos, que inhiben la actividad de la enzima ciclooxigenasa responsable de la conversión de ácido araquidónico en prostaglandinas. Existen dos formas de ciclooxigenasa: una enzima constitutiva (COX-I), importante para la protección homeostática de la mucosa gástrica y los riñones, y una enzima inducible (COX-II) que genera prostaglandinas antiinflamatorias¹⁸. La inhibición no específica de ambas formas de la ciclooxigenasa en el organismo es la responsable de efectos secundarios como el sangrado gastrointestinal, úlceras y la inhibición de la formación de plaquetas. Ni siquiera los inhibidores selectivos COX-II como celecoxib carecen de efectos secundarios, ya que la COX-II está presente como constituyente en algunos órganos y puede ser inducida en otros. Por ello, celecoxib está asociado a efectos secundarios cardiovasculares¹⁹ y renales²⁰. Una forma de evitar los efectos secundarios asociados al uso del fármaco consiste en inyectar el fármaco por vía intraarticular. Pero la inyección intraarticular de la solución farmacológica se complica por el hecho de que pasa rápidamente de la articulación a la circulación sistémica. La captura del fármaco en un transporte particulado aumentaría la capacidad de retención en la articulación. Además, la liberación controlada del fármaco a partir de las partículas

sent in the internal phase of the emulsion by reducing the inter-particle attraction. This report gives an account of producing gelatin microspheres using a de-aggregating agent, which is parenterally acceptable. Polyethylene glycol is a non-ionic surfactant which has been used in the parenteral formulations and has been found to be non-toxic¹⁶. So polyethylene glycol is used in the present study as a de-aggregating agent to prepare gelatin microspheres. Arthritis is a disease of musculoskeletal system where various joints in the body are affected leading to pain, inflammation and swelling¹⁷. The most widely used drugs for the treatment of arthritis are the Non-steroidal Anti-inflammatory drugs which act by inhibition of cyclo-oxygenase enzyme responsible for conversion of arachidonic acid to prostaglandins. There are two forms of cyclo-oxygenase: a constitutive (COX-I) enzyme important for homeostatic protection of gastric mucosa and kidney and an inducible (COX-II) enzyme which generates inflammatory prostaglandins¹⁸. The non-specific inhibition of both the forms of cyclo-oxygenase throughout the body is responsible for producing side effects like gastrointestinal bleeding and ulcers and inhibition of platelet aggregation. Even selective COX-II inhibitors like celecoxib is also not devoid of side effects since COX-II is constitutively present in some organs and can be induced in other organs. Thus, celecoxib is associated with cardiovascular¹⁹ and renal side effects²⁰. One way to avoid the side effects associated with the use of the drug is to inject the drug intra-articularly. But the intra-articular injection of the drug solution is complicated by the fact that it is rapidly cleared from the joint into the systemic circulation. Entrapment of the drug in a particulate carrier would lead to its enhanced retention in the joint. Moreover, the controlled release of the drug from the polymeric particles would avoid the exposure of cartilage to significant amounts of the drug. So here an attempt has been made to prepare controlled release gelatin microspheres suitable for intra-articular injection. Reduction in troublesome side effects or the elimination of inconvenient dosage regimens coupled with increased efficacy of the drug render the development of controlled release drug delivery systems an attractive area of

poliméricas evitaría exponer al cartílago a cantidades de fármaco significativas. Por ello, en el presente estudio se ha intentado preparar microesferas de gelatina de liberación controlada adecuadas para la inyección intraarticular. La reducción de efectos secundarios problemáticos o la supresión de regímenes de dosificación incómodos, junto con un aumento en la eficacia del fármaco, hacen que el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos sea un área de investigación atractiva²¹. Por esta razón, en la presente investigación se ha intentado desarrollar microesferas de gelatina con contenido de celecoxib para estudiar el efecto de distintas variables en las características de las microesferas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El fármaco Celecoxib fue regalado por Sun Pharmaceutical Advanced Research Centre. La gelatina de tipo B fue amablemente donada por Sterling Gelatin Limited. El tween-80 se adquirió a la empresa S.d.fine chem. Ltd, de Bombay. El polietilenglicol 400 se adquirió a la empresa S.d.fine.chem. El glutaraldehído (25% p/v en solución acuosa) se adquirió a la empresa E. Merck (India) Limited, el formaldehído (37% p/v en solución acuosa) se adquirió a Qualigens fine chemicals limited, India. Todos los demás productos químicos y disolventes eran de grado analítico y se utilizaron sin una posterior purificación.

Preparación de las microesferas

Las microesferas de gelatina se prepararon mediante el método de reticulación por emulsificación. La cantidad pesada de gelatina se disolvió en 10 ml de agua destilada mediante calentamiento a 55 °C. Se agregaron 0,2 ml de tween-80 y se mezcló adecuadamente en un agitador magnético. La cantidad designada de PEG-400 se agregó a la solución de gelatina o en la fase externa compuesta de parafina líquida y span-85. El celecoxib se molió fino en un mortero de ágata. A continuación se pasó por un tamiz del n° 400. La cantidad pesada de celecoxib se dispersó en solución de gelatina y se sonicó para obtener

research²¹. Hence in the present investigation, an attempt has been made to develop controlled release celecoxib loaded gelatin microspheres and to study the effect of the different variables on the characteristics of the microspheres.

2. MATERIAL AND METHODS

The drug Celecoxib was gifted by Sun Pharmaceutical Advanced Research Centre. Gelatin type B was kindly gifted by Sterling Gelatin Limited. Tween-80 was purchased from S.d.fine chem. Ltd, Mumbai. Poly-ethylene glycol-400 was purchased from S.d.fine.chem. Glutaraldehyde (25%w/v aqueous solution) was purchased from E. Merck (India) Limited, formaldehyde (37%w/v aqueous solution) was purchased from Qualigens fine chemicals limited, India. All other chemicals and solvents were of analytical grade and used without further purification.

Preparation of microspheres

Gelatin microspheres were prepared by emulsification cross-linking method. Weighed amount of gelatin was dissolved in 10 ml of distilled water by heating at 55° C. 0.2 ml of tween-80 was added and mixed properly by stirring on a magnetic stirrer. Designated amount of PEG-400 was added either to the gelatin solution or in the external phase comprising of liquid paraffin and span-85. Celecoxib was finely ground using an agate mortar. It was then passed through sieve no. 400. Weighed amount of celecoxib was dispersed in gelatin solution and sonicated to obtain a uniform dispersion. One ml of this dispersion was then injected into a mixture of 20 ml Liquid paraffin (Heavy fraction) containing span-85 and maintained at 60°C and emulsified by propeller stirrer at the speed of 2500 RPM for 10 minutes. Glutaraldehyde (25% w/w) or Formaldehyde (37%w/w) was then added to stabilize the particles. Stirring was continued for 3 hours. Microspheres formed were separated by centrifugation and washed with 30 ml petroleum ether. The microspheres were then stirred on a magnetic stirrer with 10 ml of 5% sodium

una dispersión uniforme. Se inyectó 1 ml de esta dispersión en una mezcla de 20 ml de parafina líquida (fracción pesada) que contenía span-85, se mantuvo a 60 °C y se emulsificó mediante un agitador helicoidal a una velocidad de 2500 r.p.m. durante 10 minutos. A continuación, se agregó glutaraldehído (25% p/p) o formaldehído (37% p/p) para estabilizar las partículas. La agitación se prolongó durante 3 horas. Las microesferas formadas se separaron mediante centrifugación y se lavaron con 30 ml de éter de petróleo. Seguidamente, se agitaron las microesferas en un agitador magnético con 10 ml de bisulfito sódico al 5%. Por último, se lavaron las microesferas con agua destilada y se liofilizaron para obtener un polvo fino.

Eficacia de captura

Se disolvió una cantidad pesada de microesferas en hidróxido sódico 2N. Posteriormente, se extrajo la solución con cloruro de metileno para extraer el celecoxib. A continuación, se evaporó el extracto hasta desecarlo y el residuo se disolvió en metanol. Seguidamente, se diluyó adecuadamente y se midió la absorbencia de la solución resultante a 250 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-VIS para determinar la cantidad de celecoxib presente en las microesferas.

Tamaño de las partículas

La distribución de tamaño de las microesferas se determinó mediante dispersión de luz láser en un analizador de tamaños de partículas Malvern (Malvern Master Sizer 2000, SM, Reino Unido). Las microesferas se agregaron a la unidad de dispersión de muestra que contenía el agitador y se agitó para reducir la agregación entre las microesferas, y el rango de oscurecimiento láser se mantuvo entre 15-20%. El tamaño de partícula medio se midió tras realizar el experimento por triplicado.

Microscopía electrónica de barrido

Se realizó una microscopía electrónica de

bisulphite. Finally, the microspheres were washed with distilled water and lyophilized to obtain a fine powder.

Entrapment efficiency

Weighed amount of microspheres were dissolved in 2N sodium Hydroxide. The solution was then extracted with methylene chloride to extract celecoxib. The extract was then evaporated to dryness and the residue was dissolved in methanol. It was then diluted suitably and the absorbance of the resulting solution was measured at 250 nm on a Shimadzu UV-VIS spectrophotometer to determine the amount of celecoxib present in the microspheres.

Particle size

The particle size distribution of the microspheres was determined by Laser light scattering on a Malvern Particle Size Analyzer (Malvern Master Sizer 2000, SM, UK). The microspheres were added to the sample dispersion unit containing the stirrer and stirred in order to reduce the aggregation between the microspheres and laser obscuration range was maintained between 15-20%. The average volume-mean particle size was measured after performing the experiment in triplicate.

Scanning electron Microscopy

Scanning electron Microscopy of the gelatin microspheres was carried out to examine the surface morphology. The Microspheres were mounted on metal stubs and coated with a 150Å layer of gold. Photographs were taken using Jeol Scanning Electron Microscope (Jeol. JSM-5610LV SEM).

Drug release

Drug release from the microspheres was determined using Phosphate buffer pH-7.4 containing 2%w/w tween-80 as the release medium. Microspheres were suspended in 50

barrido de las microesferas de gelatina para examinar la morfología de la superficie. Las microesferas se montaron sobre portamuestras metálicas y se revistieron con una capa de oro de 150Å. Se tomaron fotografías utilizando un microscopio electrónico de barrido Jeol (Jeol. JSM-5610LV SEM).

Liberación de fármaco

La liberación del fármaco de las microesferas se determinó mediante tampón fosfato pH-7,4 con un contenido del 2% p/p de tween-80 como medio de liberación. Las microesferas se suspendieron en 50 ml del medio de disolución en un vial de cristal de 100 ml y se agitaron en un agitador magnético a 50 r.p.m. en un baño termostático a 37°C. Se extrajeron muestras de 2 ml a intervalos de tiempo apropiados y se centrifugaron a 5000 r.p.m. Los sobrenadantes se diluyeron adecuadamente y se midió la absorbencia de la solución resultante a 250 nm utilizando el medio de disolución como blanco. El residuo se volvió a dispersar en 2 ml de disolución de medio fresca y se volvió a colocar en el vial.

Mediciones de espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Las mediciones espectrales FTIR se realizaron con un espectrómetro FTIR Shimadzu 8300. Las microesferas se molieron con KBr y se realizaron mediciones espectrales FTIR en el rango de 4500-500cm⁻¹.

3. RESULTADOS

Se estudió el efecto de las distintas variables en las características de las microesferas preparadas. Las microesferas se caracterizaron según su eficacia de captura, tamaño de partícula, liberación de fármaco *in vitro* y morfología de la superficie. Las microesferas de gelatina producidas mediante este método presentan una fluidez libre y no tienen tendencia a la agregación. No se produjeron microesferas en ausencia de PEG-400. En su lugar se obtuvo un material gelatinoso en la

ml of the dissolution medium in a 100 ml glass vials and stirred on a magnetic stirrer at 50 rpm in a thermo stated bath at 37°C. 2ml samples were withdrawn at appropriate time intervals and centrifuged at 5000 rpm. Supernatants were diluted suitably and absorbance of the resulting solution was measured at 250 nm using the dissolution medium as blank. The residue was redispersed in 2 ml of the fresh dissolution medium and replaced back into the vial.

Fourier Transform Infra-Red (FTIR) measurements

FTIR spectral measurements were performed using a Shimadzu 8300 FTIR spectrometer. Microspheres were ground with KBr and FTIR spectra were taken in the range 4500-500cm⁻¹.

3. RESULTS

The effect of the different variables on the characteristics of the microspheres prepared was studied. The microspheres were characterized for entrapment efficiency, particle size, in-vitro drug release and surface morphology.

The gelatin microspheres produced by this method are free flowing and shows no tendency to aggregate. No microspheres were produced in the absence of PEG-400. Instead a jelly like material was obtained on filtration, which could not be separated in the form of microspheres. Microspheres were obtained as a fine powder when PEG-400 was added either in the external phase or in the internal phase of the emulsion. From the preliminary studies, it was confirmed that the entrapment efficiencies of the batches prepared by adding PEG-400 in the external phase of the emulsion were significantly lower (p<0.05) than the batches in which PEG-400 was added in the internal phase of the emulsion. Moreover, a significant decrease (p<0.05) in the entrapment efficiency with an increase in the PEG concentration in the external phase was also observed. The formulations in which PEG-400 was added in the external phase of the emulsion had entrapment efficiency of only about

filtración, que no se pudo separar en forma de microesferas. Las microesferas se obtuvieron como un polvo fino cuando se añadió PEG-400 en las fases externas o externas de la emulsión. A partir de los estudios preliminares, se confirmó que la eficiencia de captura de los lotes preparados añadiendo PEG-400 en la fase externa de la emulsión era significativamente inferior ($p < 0,05$) a la de los lotes en los que se agregó PEG-400 en la fase interna de la emulsión. Además, también se observó un descenso significativo ($p < 0,05$) en la eficiencia de captura con un aumento de la concentración de PEG en la fase externa. Las formulaciones en las que se agregó PEG-400 en la fase externa de la emulsión tuvieron una eficiencia de captura de tan sólo el 30-35% aproximadamente. Por tanto, se realizaron estudios adicionales agregando PEG-400 en la fase interna de la emulsión. Se estudió el efecto de las distintas variables en las características de las microesferas preparadas utilizando PEG-400 en la fase interna. Como muestra la tabla I, un aumento de la concentración de gelatina de 15% p/p a 25% p/p produjo un aumento en la eficiencia de captura de entre un 75% y un 86%. Al aumentar la concentración de span-85 se redujo la eficiencia de captura. Este efecto fue más pronunciado con concentraciones de gelatina bajas. La concentración de PEG-400 y la velocidad de agitación no influyen en la eficiencia de captura. El volumen de agente de reticulación y la duración de la misma no tuvieron ningún efecto significativo en la eficiencia de captura de las microesferas. No se observó ninguna diferencia significativa ($p < 0,05$) en la eficiencia de captura de las microesferas preparadas con formaldehído o glutaraldehído.

30-35%. Thus, further studies were carried out by adding PEG-400 in the internal phase of the emulsion. The effect of different variables on the characteristics of the microspheres prepared using PEG-400 in the internal phase were studied. As shown in Table I, an increase in the gelatin concentration from 15% w/w to 25% w/w led to an increase in the entrapment efficiency from 75% to 86%. There was a decrease in the entrapment efficiency with an increase in the span-85 concentration. This effect was more pronounced at lower concentration of gelatin. The concentration of PEG-400 and stirring speed has no influence on the entrapment efficiency. The volume of the cross-linking agent and duration of cross-linking had no significant effect on the entrapment efficiency of the microspheres. No significant difference ($p < 0.05$) was observed in the entrapment efficiencies of the microspheres prepared using formaldehyde or glutaraldehyde.

TABLA 1: Efecto de las concentraciones de gelatina, span-85 y PEG-400 en la eficiencia de captura y el tamaño de partícula.

TABLE 1: Effect of gelatin concentration, span-85 concentration and PEG-400 concentration on the entrapment efficiency and particle size.

Código de lote <i>Batch code</i>	Concentración de gelatina % p/p Gelatin concentration %w/w	Concentración de Span-85 % p/p Span-85 concentration %w/w	Concentración de PEG-400 % p/v PEG-400 concentration %w/v	Eficiencia de captura* Entrapment efficiency*%	Tamaño de partícula* (diámetro geométrico medio, μm) Particle size* (Geometric mean diameter- μm)
A	15	2	1	74,12 \pm 1,52	14,30 \pm 1,79
B	15	2	2	72,18 \pm 1,41	15,25 \pm 1,27
C	15	5	1	65,18 \pm 2,12	11,33 \pm 2,41
D	15	5	2	67,53 \pm 2,09	10,52 \pm 1,20
E	25	2	1	86,82 \pm 2,39	20,51 \pm 0,96
F	25	2	2	85,12 \pm 3,08	22,16 \pm 1,15
G	25	5	1	79,72 \pm 2,26	17,94 \pm 2,11
H	25	5	2	77,21 \pm 2,14	20,64 \pm 1,61

*Cada uno de los valores se expresa como media \pm D.E. (n=3)

*Each value is expressed as mean \pm S.D (n=3)

Se observó que el tamaño de partícula de las microesferas dependía de variables como la concentración de gelatina, la concentración de span-85 y la velocidad de agitación. La concentración de PEG-400 no influyó en el tamaño de partícula. Al aumentar la concentración de gelatina, se produjo un aumento en el tamaño de partícula de las microesferas, mientras que se observó una disminución en el tamaño de partícula al aumentar la concentración de span-85. Como muestra la tabla II, al aumentar la velocidad de agitación de 1500 a 2500 r.p.m. se redujo el tamaño de partícula de 25,78 μm a 20,51 μm . Con un aumento mayor en la velocidad de agitación no se produjo ningún descenso significativo ($p>0,1$) en el tamaño de partícula. Por tanto, como velocidad óptima de agitación para la preparación de microesferas se seleccionó 2500 r.p.m.

The particle size of the microspheres was found to be dependent on the variables like concentration of gelatin, concentration of span-85 and stirring speed. PEG-400 concentration did not influence the particle size. There was an increase in the particle size of the microspheres with an increase in the gelatin concentration whereas a decrease in the particle size was observed with an increase in the span-85 concentration. As shown in Table II, with an increase in the stirring speed from 1500 rpm to 2500 rpm, there was a decrease in the particle size from 25.78 μm to 20.51 μm . With further increase in the stirring speed, there is no significant decrease ($p>0.1$) in the particle size. So, 2500 rpm was selected as an optimum stirring speed for the preparation of microspheres.

TABLA 2: Efecto de la velocidad de agitación en la eficiencia de captura y el tamaño de partícula

TABLE 2: Effect of stirring speed on the entrapment efficiency and particle size

Código de lote <i>Batch code</i>	Velocidad de agitación Stirring speed	Eficiencia de captura* Entrapment efficiency* %	Tamaño de partícula* Particle size* μm
F	1500	85,91 \pm 2,35	25,78 \pm 2,22
E	2500	86,82 \pm 2,39	20,51 \pm 0,96
G	4000	84,39 \pm 2,02	18,78 \pm 1,10

*Cada uno de los valores se expresa como media \pm D.E. (n=3)

*Each value is expressed as mean \pm S.D (n=3)

TABLA 3: Efecto del volumen de glutaraldehído (GA) o formaldehído (FA) y de la duración de la reticulación en la eficiencia de captura y el tamaño de partícula

TABLE 3: Effect of volume of glutaraldehyde (GA) or formaldehyde (FA) and duration of cross-linking on the entrapment efficiency and particle size

Código de lote <i>Batch code</i>	Volumen de solución de agente reticulante*(ml) <i>Volume of Cross linking agent solution*</i>	Duración de la reticulación (horas) <i>Duration of cross-linking</i>	Eficiencia de captura <i>Entrapment efficiency^a</i> %	Tamaño de partícula ^a <i>Particle size^a</i> µm
H	GA-0,5	1	84,78±1,80	22,62±1,72
I	GA-0,5	3	82,60±1,57	21,58±1,37
J	GA-1,0	1	84,80±2,58	22,65±1,09
E	GA-1,0	3	86,82±2,39	20,51±0,96
K	FA-0,5	1	85,30±1,74	28,94±1,40
L	FA-0,5	3	83,74±1,82	27,32±2,33
M	FA-1,0	1	86,77±1,91	27,60±1,15
N	FA-1,0	3	87,53±1,30	28,85±1,11

*GA= solución de glutaraldehído al 25% p/p. *GA= 25%w/w glutaraldehyde solution.

*FA=solución de formaldehído al 37% p/p. *FA=37%w/w formaldehyde solution.

*Cada uno de los valores se expresa como media ± D.E. (n=3). *Each value is expressed as mean±S.D.(n=3)*

Como muestra la tabla 3, la concentración de glutaraldehído o formaldehído no tiene una influencia significativa en la eficiencia de captura ni en el tamaño de partícula. No obstante, se observó que el tamaño de partícula de las microesferas reticuladas con glutaraldehído era significativamente menor ($p < 0,05$) que el de las microesferas reticuladas con formaldehído.

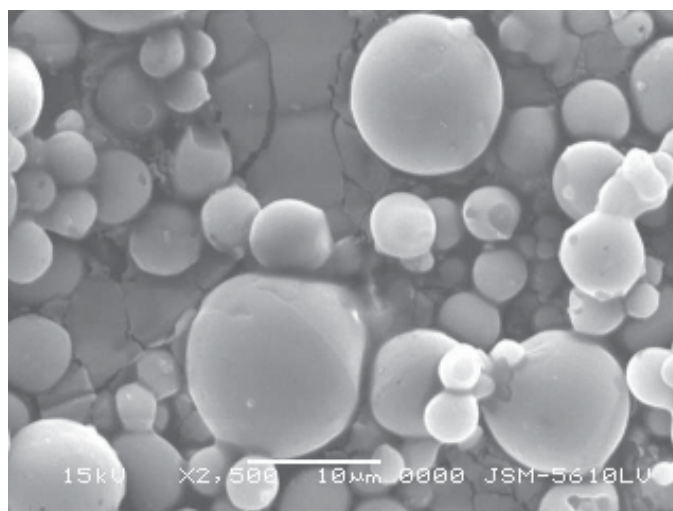
Los estudios de microscopía electrónica de barrido revelaron que las microesferas tenían una superficie rugosa con cristales de fármaco en la superficie (Figura 5).

As shown in Table 3, the glutaraldehyde or formaldehyde concentration does not have a significant influence on the entrapment efficiency or the particle size. However, the particle size of the microspheres cross-linked using glutaraldehyde was found to be significantly lower ($p < 0.05$) than that of the formaldehyde cross-linked microspheres.

The scanning electron microscopy studies revealed that the microspheres had a rough surface with drug crystals on the surface (Figure 5).

FIGURA 5: Micrografía electrónica de barrido de las microesferas de gelatina reticuladas con glutaraldehído.

FIGURE 5: Scanning Electron micrograph of glutaraldehyde Cross-linked gelatin microspheres.



Los estudios de liberación de fármaco *in vitro* indicaron que los factores principales que afectan a la liberación de fármaco eran la concentración de gelatina, el volumen de agente reticulante y la duración de la reticulación. La velocidad de agitación, la concentración de emulsificante y la concentración de PEG no tuvieron una influencia significativa en la liberación del fármaco. Como se muestra en las figuras 1 y 2, al aumentar el volumen de agente reticulante (glutaraldehído/formaldehído) se redujo la velocidad de liberación del fármaco. Las microesferas preparadas utilizando 1,0 ml de agente reticulante liberaron el fármaco lentamente, en comparación con las microesferas en las que se utilizó 0,5 ml de agente reticulante. No obstante, se observó un efecto de liberación repentina en todas las formulaciones. En general, aproximadamente un 40% del fármaco se libera en la primera hora, seguida de una liberación más lenta del fármaco restante durante un período de 96 horas en el caso de las microesferas reticuladas con glutaraldehído, mientras que en el caso de las microesferas reticuladas con formaldehído en la primera hora se libera aproximadamente el 55%, seguida de una liberación controlada durante un período de 72 horas (figura 2).

The in-vitro drug release studies indicated that the main factors affecting the drug release were the concentration of gelatin, volume of cross-linking agent and the duration of cross-linking. The stirring speed, emulsifier concentration and PEG concentration had no significant influence on the drug release. As shown in figure 1 and figure 2, an increase in the volume of the cross-linking agent (glutaraldehyde/formaldehyde) led to a decrease in the rate of drug release. Microspheres prepared using 1.0 ml of the cross-linking agent releases the drug slowly compared to the microspheres in which 0.5 ml of the cross-linking agent was used. However, a burst effect was observed in all the formulations. In general, around 40% of the drug is released in the first hour, followed by slower release of the remaining drug over a period of 96 hours in case of glutaraldehyde cross-linked microspheres while about 55% of the drug is released in the first hour followed by a controlled release for a period of 72 hours in case of formaldehyde cross-linked microspheres (figure 2).

FIGURA 1: Efecto del volumen de glutaraldehído (25% p/p) y de la duración de la reticulación en la liberación del fármaco

FIGURE 1: Effect of volume of glutaraldehyde (25%w/w) and duration of cross-linking on the drug release

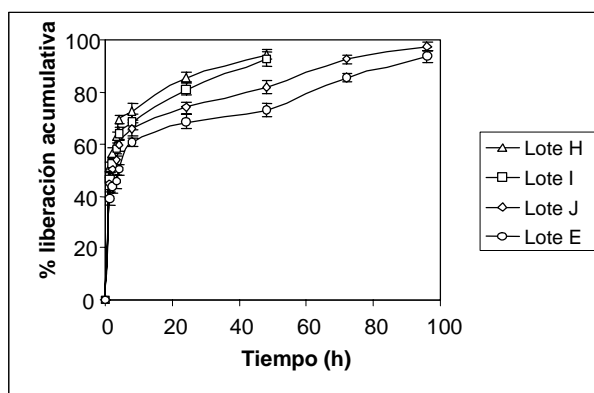
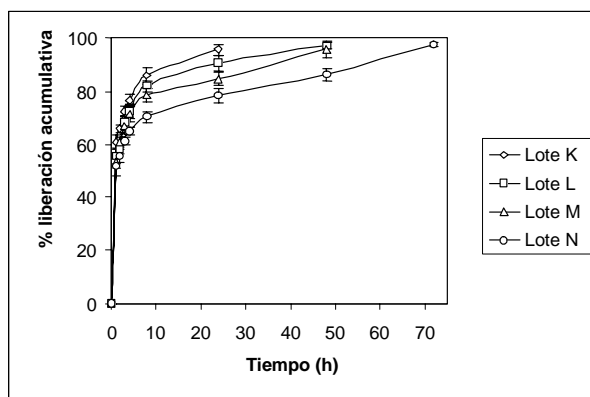


FIGURA 2: Efecto del volumen de formaldehído (37% p/p) y de la duración de la reticulación en la liberación del fármaco

FIGURE 2: Effect of volume of formaldehyde (37%w/w) and duration of cross-linking on the drug release



Hay una diferencia significativa ($p < 0,05$) en las velocidades de liberación de fármaco entre las microesferas reticuladas con formaldehído y las reticuladas con glutaraldehído. Las velocidades de liberación de las microesferas reticuladas con formaldehído fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) que las de las microesferas reticuladas con glutaraldehído.

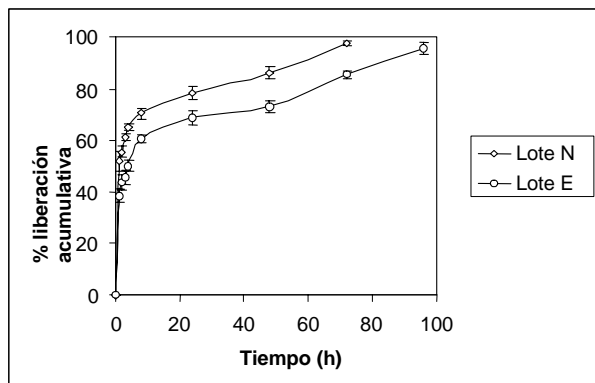
La duración de la reticulación también afectó a la liberación del fármaco. Al aumentar la duración de la reticulación de 1 a 3 horas, se redujo la liberación del fármaco, como muestran las figuras 1 y 2 para las microesferas reticuladas con formaldehído y glutaraldehído respectivamente. Sin embargo, la duración de la reticulación tiene una influencia menor en la liberación del fármaco en comparación con el volumen de agente reticulante.

Al aumentar la concentración de gelatina se redujo la liberación del fármaco. Como muestra la figura 3, las microesferas preparadas utilizando un 25% de gelatina liberan el fármaco lentamente, en comparación con las preparadas utilizando un 15% de gelatina.

Los estudios de FTIR confirmaron que no existe interacción química entre la gelatina y el polietilenglicol, y que el PEG actúa como barrera física frente a la coalescencia de las gotitas de gelatina presentes en la fase interna de la emulsión.

FIGURA 3: Perfiles comparativos de liberación de microesferas reticuladas con formaldehído y glutaraldehído

FIGURE 3: Comparative release profiles of formaldehyde and glutaraldehyde cross-linked microspheres



There is a significant difference ($p < 0.05$) in the drug release rates of the formaldehyde cross-linked microspheres and the glutaraldehyde cross-linked microspheres. The formaldehyde cross-linked microspheres showed significantly higher ($p < 0.05$) release rates than the glutaraldehyde cross-linked microspheres.

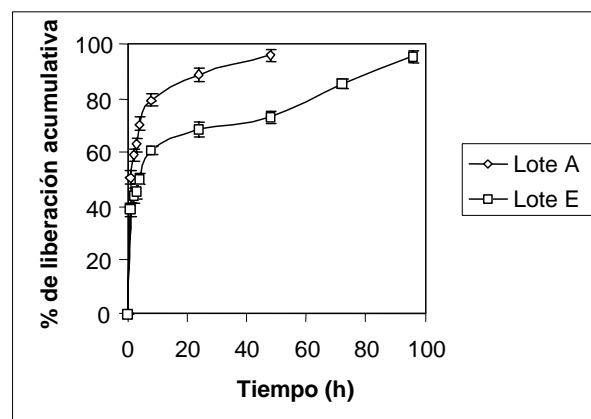
The duration of cross-linking also had an effect on the drug release. An increase in the duration of cross-linking from 1 hour to 3 hours led to a decrease in the drug release as shown in Fig 1 & 2 respectively for glutaraldehyde and formaldehyde cross-linked microspheres. However, the duration of cross-linking has a lower influence on the drug release as compared to the volume of cross-linking agent.

There was a decrease in the drug release with an increase in the concentration of gelatin. As shown in figure 4, the microspheres prepared using 25% gelatin releases the drug slowly compared to the microspheres prepared using 15% gelatin.

The FTIR studies confirmed that there is no chemical interaction between gelatin and Poly-ethylene glycol and PEG acts as a physical barrier to the coalescence of the gelatin droplets present in the internal phase of the emulsion.

FIGURA 4: Efecto de la concentración de gelatina en la liberación del fármaco

FIGURE 4: Effect of gelatin concentration on the drug release



4. DISCUSIÓN

Para la preparación de las microesferas se eligió gelatina debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y naturaleza no tóxica, así como a su fácil disponibilidad. En ausencia de polietilenglicol no se formaron microesferas discretas. Se obtuvo un material gelatinoso delgado, que al secar se convirtió en terrones duros irrompibles. Esto indica que se produce una aglomeración de las microgotas de gelatina presentes en la fase interna de la emulsión. Esto puede deberse a que, tras la adición de agente reticulante, se produce una reticulación tanto interparticular como intraparticular de las gotitas de gelatina que ocasiona la aglomeración de las micropartículas. La reticulación interparticular se puede evitar mediante el uso de agentes antiagregantes, que sirven de barrera frente a la coalescencia de las partículas. En la preparación de las microesferas se han utilizado diversos agentes antiagregantes, como el estearato de magnesio¹⁵ y el triestearato de aluminio¹⁴. La desventaja de utilizar estos agentes es que no se pueden eliminar de la formulación final, no son aceptables para uso parenteral y se sabe que alteran las propiedades de disolución del fármaco. Por tanto, para la preparación de las microesferas es deseable utilizar un material aceptable para uso parenteral, que actúe como agente antiagregante y que se pueda eliminar del producto final. El polietilenglicol se utiliza como agente antiagregante en la preparación de comprimidos. Es un surfactante no iónico aceptable para uso parenteral. También se utiliza como adyuvante en la micronización de proteínas para la preparación de microesferas de gelatina²² y albúmina²³. Por tanto, se propuso la hipótesis de que el PEG-400 podría actuar como agente antiagregante en la preparación de las microesferas. La elección de este grado concreto de polietilenglicol (PEG-400) se debe a la miscibilidad del PEG-400 tanto en la fase externa como en la interna de la emulsión. Además, al poderse mezclar con agua se puede eliminar fácilmente del producto final mediante lavado con agua. Cuando se agregó polietilenglicol-400 en la fase externa de la emulsión, se obtuvieron microesferas en forma de polvo fino, pero su eficiencia de captura fue muy inferior. Esto se

4. DISCUSSION

Gelatin was chosen as a matrix material for the preparation of microspheres because of its biocompatibility, biodegradability its non-toxic nature as well as its easy availability. In absence of polyethylene glycol, no discrete microspheres was formed. A thin jelly like material was obtained, which on drying were converted into hard unbreakable lumps. This indicated that there is an agglomeration of the gelatin microdrops present in the internal phase of the emulsion. This may be because, after the addition of the cross-linking agent, there is an inter-particle as well as intra-particle cross-linking of the gelatin droplets leading to agglomeration of the microparticles. The inter-particle cross-linking can be avoided by the use of de-aggregating agents, which provide a barrier to the coalescence of the microparticles. Various de-aggregating agents like magnesium stearate¹⁵ and aluminium tri-stearate¹⁴ have been used in the preparation of microspheres. The disadvantage of using these agents is that they cannot be removed from the final formulation, they are not parenterally acceptable and they are known to alter the dissolution properties of the drug. Hence, a parenterally acceptable material which acts as a de-aggregating agent and which can be removed from the final product is desirable to be used for the preparation of microspheres. Polyethylene glycol is used as an anti-tacking agent in the preparation of tablets. It is a non-ionic surfactant parenterally acceptable. It is also used as a protein micronization adjuvant in the preparation of gelatin²² and albumin microspheres²³. Thus it was hypothesized that PEG-400 may act as a de-aggregating agent in the preparation of the microspheres. The choice of this particular grade of polyethylene glycol (PEG-400) is because of the miscibility of PEG-400 in the external phase as well as internal phase of the emulsion. Moreover, being water miscible, it can be easily removed from the final product by water washing. When polyethylene glycol-400 was added in the external phase of the emulsion, microspheres were obtained as a fine powder, but the drug entrapment efficiency of the microspheres was very less. This is because of the solubility of celecoxib in PEG-400. Though

debe a la solubilidad del celecoxib en PEG-400. Aunque la concentración de PEG-400 empleada sólo fue del 1-2%, tuvo un efecto sinérgico con el SPAN-85 en la solubilización de celecoxib en la fase externa de la emulsión. Por tanto, la eficiencia de captura obtenida fue muy inferior. Esto también se confirmó por la presencia de celecoxib solubilizado en la fase externa de la emulsión. Por tanto, se agregó PEG-400 en la fase interna de la emulsión como agente antiagregante. La adición de PEG-400 en la fase interna de la emulsión confirió a las microesferas la forma de polvo fino con fluidez libre. Como la solubilidad del celecoxib en la fase externa formada por parafina y span-85 es muy baja, se obtuvieron eficiencias de captura elevadas tanto en las microesferas reticuladas con formaldehído como en las reticuladas con glutaraldehído. Se estudiaron los efectos de diversos factores en las características de las microesferas. El aumento de la eficacia de captura al aumentar la concentración de gelatina se debió a la formación de soluciones más viscosas. En trabajos anteriores se habían obtenido resultados similares¹¹. Al aumentar la viscosidad, se asocia una mayor cantidad de fármaco a la gelatina y la cantidad libre presente es menor. A concentraciones más bajas de gelatina, la cantidad de fármaco presente en estado libre es mayor. La disminución de la eficiencia de captura al aumentar la concentración de SPAN-85 se debe a un aumento en la solubilidad del celecoxib en la fase externa de la emulsión. Este efecto es más pronunciado en concentraciones más bajas de gelatina, lo que indica que las soluciones de menor viscosidad son menos eficaces para impedir la disolución del fármaco en la fase externa. La concentración de PEG-400 en la fase interna no tuvo ninguna influencia significativa en la eficiencia de captura. El aumento en el tamaño de partícula de las microesferas al aumentar la concentración de gelatina se debe a la formación de gotitas de mayor tamaño en la fase interna del paso de emulsificación en la preparación de microesferas, debido al aumento de la viscosidad. Al aumentar la concentración de SPAN-85 se produce un descenso en la tensión interfacial entre la fase interna acuosa y la fase externa oleosa. Esto provoca un descenso en el tamaño de partícula, con un

the concentration of PEG-400 employed was only 1-2%, it has a synergistic effect with SPAN-85 in solubilising celecoxib in the external phase of the emulsion. Thus very less entrapment efficiency was obtained. This was also confirmed by the presence of solubilized celecoxib in the external phase of the emulsion. So, PEG-400 was added in the internal phase of the emulsion as a de-aggregating agent. Addition of PEG-400 in the internal phase of the emulsion gave microspheres in the form of fine free-flowing powder. Since the solubility of celecoxib in the external phase comprising of liquid paraffin and span-85, is very less, high entrapment efficiencies were obtained for both formaldehyde and glutaraldehyde cross-linked microspheres. The effects of various factors on the characteristics of the microspheres were studied. The increase in the entrapment efficiency with an increase in the gelatin concentration was due to the formation of more viscous solutions with an increase in gelatin concentration. Similar results were obtained by previous workers¹¹. With an increase in the viscosity, more amount of drug is associated with the gelatin and less is present as free drug. At lower concentration of gelatin, more amount of drug is present as free drug. The decrease in the entrapment efficiency with an increase in the SPAN-85 concentration is due to increase in the solubility of celecoxib in the external phase of the emulsion. This effect is more pronounced at lower concentration of gelatin, which indicates that the solution with less viscosity can less efficiently prevent the dissolution of the drug in the external phase. The PEG-400 concentration in the internal phase had no significant influence on the entrapment efficiency. An increase in the particle size of the microsphere with an increase in the gelatin concentration is due to the formation of bigger droplets of the internal phase in the emulsification step for the preparation of microspheres, because of increase in the viscosity. There is a decrease in the interfacial tension between the aqueous internal phase and the oily external phase with an increase in the SPAN-85 concentration. This leads to a decrease in the particle size with an increase in the SPAN-85 concentration. The decrease in the particle size with an increase in the stirring speed is be-

aumento en la concentración de SPAN-85. La disminución del tamaño de partícula al aumentar la velocidad de agitación se debe a que una velocidad más alta proporciona la energía necesaria para que la solución de gelatina se disperse como pequeñas gotitas en la fase externa oleosa, dando lugar a un tamaño menor de partícula con una distribución de tamaños más uniforme. El tamaño de partícula de las microesferas reticuladas con formaldehído fue significativamente menor al de las microesferas reticuladas con glutaraldehído. Esto puede deberse a que la reticulación con glutaraldehído produce reticulaciones más densas que el formaldehído²⁴. Esto también se refleja en el estudio de liberación de fármaco *in vitro*, que muestra unas velocidades de liberación significativamente más bajas en las microesferas reticuladas con formaldehído. Se ha comunicado que la reticulación con formaldehído produce reticulaciones más estables y en mayor número que con glutaraldehído. En ambos casos, en un aumento de volumen de agente reticulante y de la duración de la reticulación, se redujo la liberación del fármaco. Sin embargo, el volumen del agente reticulante tiene una influencia más significativa en la liberación del fármaco en comparación con la duración de la reticulación. Tanto en las microesferas reticuladas con formaldehído como en las reticuladas con glutaraldehído se observó una liberación repentina. Esto puede deberse a la presencia de cristales del fármaco en la superficie de las microesferas. En trabajos anteriores se habían obtenido resultados similares²⁵. Esto se ha confirmado mediante micrografías electrónicas de barrido, que muestran que la superficie de la microesfera es en cierto modo rugosa. La concentración de polietilenglicol en la fase interna no influye significativamente en el tamaño de partícula ni en la liberación del fármaco. Los estudios de FTIR confirmaron que no existe interacción química entre la gelatina y el polietilenglicol y que sólo actúa como barrera física frente a la agregación de las microesferas. La ausencia de la banda de absorción característica alrededor de 1700 cm^{-1} indica la ausencia de agente reticulante residual, cuya toxicidad es una de las principales preocupaciones. El polietilenglicol empleado se puede eliminar mediante lavado con agua, por lo que

cause higher stirring speed provides the required energy to the gelatin solution to be dispersed as fine droplets in the external oily phase thus giving smaller particle size with narrower size distribution. The particle size of the formaldehyde cross-linked microspheres was found to be significantly higher than the glutaraldehyde cross-linked microspheres. This may be because cross-linking with glutaraldehyde is reported to produce denser cross-links than with formaldehyde²⁴. This is also reflected in the *in-vitro* drug release study which shows significantly slower drug release rates from microspheres cross-linked with glutaraldehyde. Glutaraldehyde cross-linking is reported to produce greater number and more stable cross-links than with formaldehyde. In both the cases, an increase in the volume of cross-linking agent and the duration of cross-linking, there was a decrease in the drug release. However, the volume of cross-linking agent had a more significant influence on the drug release compared to the duration of cross-linking. A burst release was observed in both formaldehyde and glutaraldehyde cross-linked microspheres. This may be due to the presence of drug crystals on the surface of the microspheres. Similar results were obtained by previous workers²⁵. This has been confirmed by the scanning electron micrographs which show that the surface of the microsphere is somewhat rough. Polyethylene glycol concentration in the internal phase has no significant influence on the particle size as well as drug release. FTIR studies confirmed that there is no chemical interaction between gelatin and polyethylene glycol and it acts just as a physical barrier to the aggregation of the microspheres. The absence of the characteristic absorption band around 1700 cm^{-1} indicates that the absence of residual cross-linking agent, the toxicity of which is of major concern. The polyethylene glycol employed can be removed by water washing and thus is not present in the final product. Thus, Polyethylene glycol proved to be a de-aggregating material which does not affect the characteristics of the microspheres and is not present in the final formulation as it is removed by water washing.

no está presente en el producto final. Por tanto, el polietilenglicol ha demostrado ser un material antiagregante que no afecta a las características de las microesferas y no está presente en la formulación final, ya que se elimina mediante lavado con agua.

CONCLUSIÓN

Se prepararon microesferas de gelatina con elevada eficiencia de captura mediante el método de reticulación química por emulsificación, utilizando polietilenglicol 400 como material antiagregante. El polietilenglicol no interactúa químicamente con la gelatina y no tiene ningún efecto en las características de las microesferas preparadas. El glutaraldehído ha demostrado ser un mejor agente antiagregante que el formaldehído, debido a que produce un tamaño de partícula y una velocidad de liberación menores.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación ha sido financiado por el Consejo de Investigaciones Científicas e Industriales (Council of Scientific and Industrial Research) de Nueva Delhi, India. Los autores desean expresar su agradecimiento a TIFAC-CORE en NDDS por proporcionar las instalaciones y la infraestructura necesarias para la realización del trabajo.

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Álvarez A and Porta M. Pharmacoepidemiology in practice: current status and future trends. *Drug Saf* 1995; 13: 1-7.
2. Boxel CJ and Wang G. Some observations on pharmacoepidemiology in Europe. *Nether J Med* 1997; 51: 205-12.
3. Strom BL and Carson JL. Use of automated database for pharmacoepidemiology research. *Epidemiol Rev* 1990; 12: 87-107.
4. Bador P and Petit O. Facteur d'impact et indexation dans les bases de données bibliographiques: comparaison de ces deux critères de qualité pour l'évaluation des revues pharmaceutiques. *J Pharm Belg* 1998; 53: 71-80.
5. López JM and Terrada ML. Los indicadores bibliométricos y la evaluación de la actividad médico-científica (III). Los indicadores de producción, circulación, dispersión, consumo de la información y repercusión. *Med Clin (Barc)* 1992; 98: 142-8.
6. Baños J, Bosch F, Bigorra J y Guardiola E. Difusión internacional de los ensayos clínicos realizados en España. Un análisis a través de su publicación en revistas científicas. *Med Clin (Barc)* 1994; 102: 441-5.
7. Lewison G y Devey ME. Bibliometric methods for the evaluation of arthritis research. *Rheumatology* 1999; 38: 13-20.
8. Bordons M, Barrigan S y Méndez A. La investigación española en revistas internacionales de farmacia y farmacología en el período 1980-1989. *Med Clin (Barc)* 1996; 106: 51-9.
9. López F, Boya J, Marín F y Calvo SL. Scientific research on the pineal gland and melatonin: a bibliometric study for the period 1966-1994. *J Pineal Res* 1996; 20: 115-24.
10. Bador P, Picard A and Lochert F. Survey of European pharmaceutical journals in circulation in 1993. *J Pharm Belg* 1994; 49: 409-32.

CONCLUSION

Gelatin microspheres with high entrapment efficiencies were prepared using the emulsification chemical-cross linking method and utilizing polyethylene glycol-400 as a de-aggregating material. Polyethylene glycol does not chemically interact with gelatin and has no effect on the characteristics of the prepared microspheres. Glutaraldehyde proved to be a better cross-linking agent than formaldehyde due to the smaller particle size and slower release rates obtained with glutaraldehyde cross-linking.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research work is funded by the Council of Scientific and Industrial Research, New-Delhi, India. The authors would like to thank the TIFAC-CORE in NDDS for providing infrastructural facilities for the work.

11. Villar J. El inglés, idioma internacional en Medicina. *Med Clin (Barc)* 1988; 91: 23-4.
12. Camí J, Zuleta MA, Fernández MT, Bordons M y Gómez I. Producción científica española en biomedicina y ciencias de la salud durante el período 1990-1993 (Science Citation Index y Social Science Citation Index) y comparación con el período 1986-1989. *Med Clin (Barc)* 1997; 109: 481-96.
13. Guardiola E and Baños JE. Presence of abstracts in non-English journals indexed in MEDLINE (1981-1990). *Bull Med Libr Assoc* 1993; 81: 320-2.