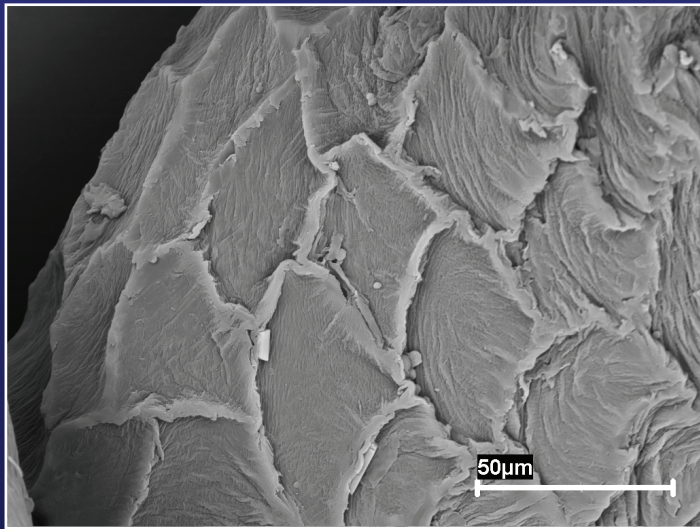


**Evaluación del glucomanano de konjac
como excipiente base
en formas de dosificación sólidas
de liberación modificada**





**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE FARMACIA**

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

**EVALUACIÓN DEL GLUCOMANANO DE KONJAC
COMO EXCIPIENTE BASE EN FORMAS DE
DOSIFICACIÓN SÓLIDAS DE LIBERACIÓN
MODIFICADA**

Felipe José Álvarez Manceño

Santiago de Compostela, 2007

**MARIANA LANDÍN PÉREZ Y RAMÓN MARTÍNEZ PACHECO,
PROFESORA TITULAR Y CATEDRÁTICO, RESPECTIVAMENTE, DE
FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA DE LA UNIVERSIDAD
DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**

CERTIFICAMOS: Que la presente memoria titulada *“Evaluación del glucomanano de konjac como excipiente base en formas de dosificación sólidas de liberación modificada”* elaborada por el Licenciado D. Felipe José Álvarez Manceñido ha sido realizada bajo nuestra dirección, en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y, hallándose concluida, autorizamos su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y, para que conste, expedimos y firmamos la presente certificación en Santiago de Compostela a 21 de Mayo de dos mil siete.

M. Landín Pérez

R. Martínez Pacheco

Felipe José Álvarez Manceño
Santiago de Compostela, Junio 2007

A mi familia.

Agradecimientos

Me siento especialmente feliz al escribir estos agradecimientos, pues ello significa que ha llegado el momento de concluir mi tesis.

Me gustaría en primer lugar agradecer sinceramente a mis directores de tesis, Mariana Landín Pérez y Ramón Martínez Pacheco, la oportunidad que me han dado para realizar este trabajo, sus consejos, enseñanzas, paciencia y confianza, necesario todo ello para que esta tesis llegase a buen puerto y que me han hecho crecer como persona.

También deseo agradecer a los profesores de mi grupo y de otros grupos de investigación por su disponibilidad y ayuda para solucionar cualquier tipo de duda y/o problema, y especialmente a los profesores Stefaan C. De Smedt y Joseph Demeester de la Universidad de Gent, que me abrieron su laboratorio de modo incondicional, al profesor Wouter Hinrichs de la universidad de Groningen por haberme introducido en el mundo de los liposomas, lipoplejos y poliplexos y entre los tres hacer de mi estancia en Gante una experiencia inolvidable y al Profesor Igor Lacik, del Polymer Institute of the Slovak Academy of Sciences, por su ayuda en la determinación de los pesos moleculares del glucomanano mediante GPC y por su interés en mi trabajo.

Muchas gracias a la Xunta de Galicia y al Programa Sócrates-Erasmus por su inestimable ayuda financiera.

No quiero acabar sin nombrar a los compañeros de laboratorio, departamento, amigos y todas aquellas personas que me han echado una mano cuando lo he necesitado y que han contribuido a esta etapa maravillosa de mi vida.

Por último, deseo de corazón dar las gracias a mis padres y hermana por su apoyo incondicional.

Índice

	<u>Página</u>
1.- INTRODUCCIÓN: GLUCOMANANO DE KONJAC	1
1.1.- Antecedentes bibliográficos	3
1.2.- La planta de konjac y su cultivo	5
1.3.- Obtención del glucomanano de konjac	6
1.4.- Purificación y calidad	8
1.5.- Composición química	9
1.6.- Solubilidad	10
1.7.- Capacidad de hinchamiento	11
1.8.- Biodegradabilidad	12
1.9.- Propiedades reológicas de las disoluciones	15

1.10.- Geles	24
1.11.- Geles con otros polisacáridos	29
1.12.- Aplicaciones como excipiente farmacéutico	36
1.13.- Otras aplicaciones	38
1.14.- Bibliografía	41
2.- OBJETIVOS	53
3.- CARACTERIZACIÓN DE TRES GLUCOMANANOS DE KONJAC DE DIFERENTE ORIGEN GEOGRÁFICO	57
3.1- Introducción	59
3.2.- Materiales.....	60
3.3.- Métodos.....	60
3.4.- Resultados y discusión.....	68
3.5.- Bibliografía	94

4.- CHARACTERIZATION OF DIFFUSION OF MACROMOLECULES IN KONJAC GLUCOMANNAN SOLUTIONS AND GELES BY FLUORESCENCE RECOVERY AFTER PHOTOBLEACHING TECHNIQUE	99
4.1.- Introducción.....	102
4.2.- Materiales y métodos.....	105
4.3.- Resultados y discusión.....	108
4.4.- Agradecimientos	125
4.5.- Bibliografía	126
5.- KONJAC GLUCOMANNAN AND KONJAC GLUCOMANNAN/XANTHAN GUM MIXTURES AS EXCIPIENTS FOR CONTROLLED DRUG DELIVERY SYSTEMS. DIFFUSION OF SMALL DRUGS	133
5.1.- Introducción.....	136
5.2.- Materiales y métodos.....	138
5.3.- Resultados y discusión.....	142
5.4.- Agradecimientos	155
5.5.- Bibliografía	156

6.- KONJAC GLUCOMANNAN/XANTHAN GUM ENZYME SENSITIVE BINARY MIXTURES FOR COLONIC DRUG DELIVERY	163
6.1.- Introducción	166
6.2.- Materiales y métodos	169
6.3.- Resultados y discusión.....	173
6.4.- Conclusiones	184
6.5.- Agradecimientos.....	185
6.5.- Bibliografía	185
7.- DISCUSIÓN GENERAL	191
8.- CONCLUSIONES	207
9.- APÉNDICE.....	213

INTRODUCCIÓN:
GLUCOMANANO DE KONJAC

1 INTRODUCCIÓN: GLUCOMANANO DE KONJAC

1.1 Antecedentes bibliográficos

En los últimos años, el estudio de los polisacáridos ha despertado un creciente interés en distintos campos como consecuencia de sus propiedades físico-químicas, su bajo coste y sus características de biodegradabilidad (Sinha y Kumria, 2001). El glucomanano de konjac (KGM), también conocido como “konjac”, es un polisacárido natural que ha sido objeto de numerosos estudios que, como se muestra en la Figura 1.1, se han concentrado en los últimos años.

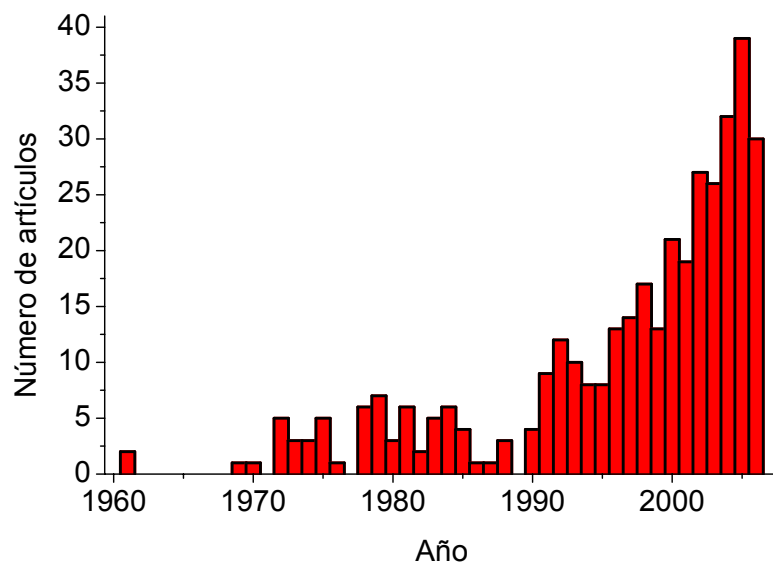


Figura 1.1. Evolución del número de artículos científicos sobre glucomanano de konjac publicados en los últimos años.

La mayor parte de los estudios se enmarcan en los campos de ciencia de los alimentos, ciencia de polímeros y bioquímica. Sin embargo, el número de artículos relacionados con la tecnología farmacéutica es muy escaso.

Por otra parte, como revelan los datos del SciFinder Scholar (Version 2006, American Chemical Society), el glucomanano de konjac ha sido objeto de un número considerable de patentes (278), entre las que predominan las de origen chino y japonés. La distribución del número de patentes muestra una clara tendencia alcista (Figura 1.2) que, una vez más, pone de manifiesto el interés creciente que está despertando este producto. En este sentido, cabe destacar que, entre las principales compañías promotoras de estas patentes, se encuentran algunas tan significativas en el ámbito de los excipientes farmacéuticos como FMC Corp. ó Procter & Gamble Co.

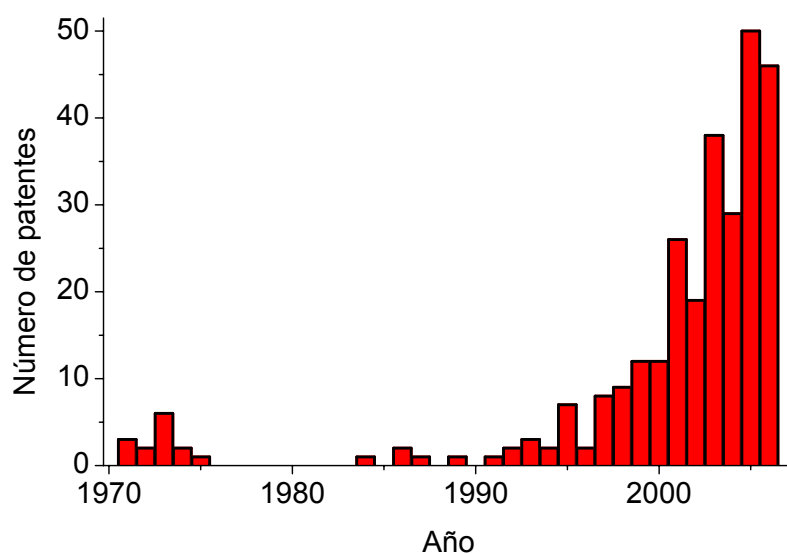


Figura 1.2. Evolución del número de patentes sobre glucomanano de konjac registradas en los últimos años.

Así pues, parece claro el interés, tanto comercial como científico, del KGM, junto con la escasez de información acerca de sus aplicaciones potenciales en el campo de la tecnología farmacéutica.

1.2 La planta de konjac y su cultivo

El glucomanano de konjac es un polisacárido de elevado peso molecular presente en el tubérculo de la planta perenne *Amorphophallus konjac* K.Koch, perteneciente a la familia Araceae, conocida comúnmente como konjac (Figura 1.3).

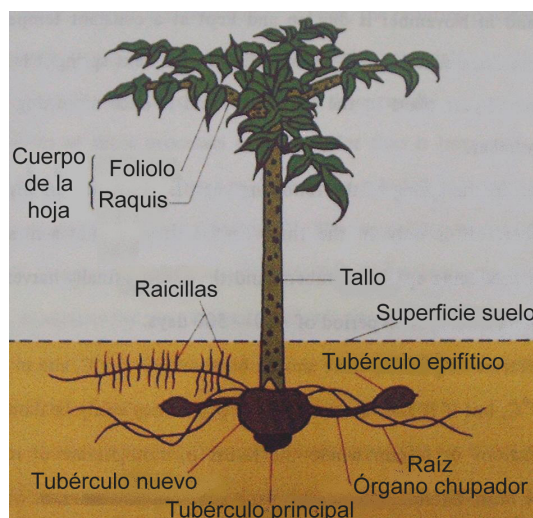


Figura 1.3. Principales partes de la planta de *Amorphophallus konjac*. (tomada de *Glucomannan Propol: The ultimate dietary fiber*. Shimizu Chemical Co.).

Aunque su origen geográfico no se conoce con certeza, se trata de una planta oriunda del sudeste asiático, que en la actualidad sigue cultivándose extensamente. En concreto, se cultivan cuatro variedades conocidas como Zairai, Shina, Haruna-Kuro y Akagi-Odama. Las dos

últimas, que son el resultado de fertilizaciones cruzadas de Zairai y Shina, suministran alrededor del 75% de la producción de tubérculos de konjac (Takigami y Phillips, 1995).

El cultivo de esta planta para la obtención de KGM requiere un tiempo prolongado ya que los tubérculos de konjac únicamente adquieren un tamaño y una riqueza en KGM suficientes (Figura 1.4) después de ser replantados durante 3 o 4 años (Takigami y Phillips, 1995).

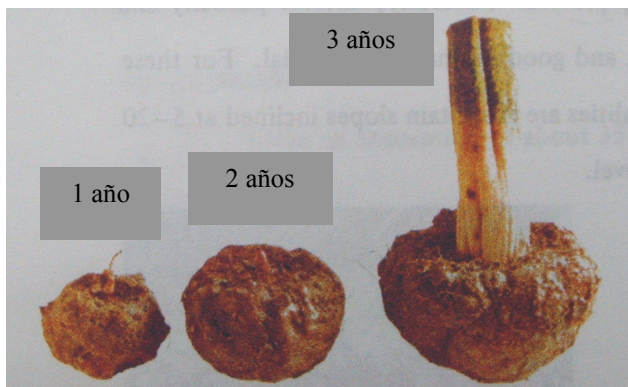


Figura 1.4. Tubérculos de konjac tras haber sido replantados uno, dos y tres años, (tomada de *Glucomannan Propol: The ultimate dietary fiber*. Shimizu Cemical Co.).

1.3 Obtención del glucomanano de konjac

El estudio microscópico del tejido de los tubérculos de konjac pone de manifiesto la existencia de células de diversos tipos entre las que se encuentran las que contienen el glucomanano. Estas células, rodeadas por otras que contienen almidón, están cubiertas por una formación escamosa. Su tamaño aumenta a medida que se avanza hacia el centro del tubérculo,

pudiendo alcanzar valores de hasta 650 μm . La disposición de las células que contienen glucomanano determina la complejidad del proceso necesario para su extracción, en muchos aspectos protegido por patentes, que se ha esquematizado en la Figura 1.5 (Shimizu y Shimahara, 1973; Sugiyama y Shimahara, 1975; Ohashi y col., 2000; Renn y Blake, 2003).

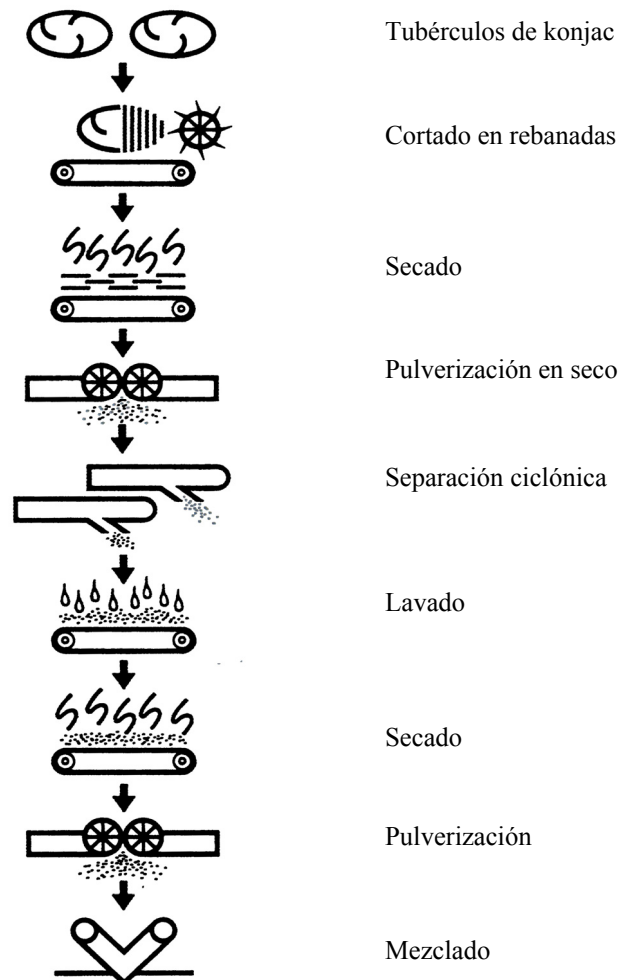


Figura 1.5. Etapas del proceso de extracción de KGM de calidad comercial. (tomado de Nutricol® Konjac general technology, USA. (1994), FMC Co.)

1.4 Purificación y calidad

La calidad de la harina de konjac comercial se evalúa a través de parámetros como tamaño de partícula, capacidad viscosizante y presencia de impurezas (Takigami y Phillips, 1995; Peiying y col., 2002).

Los lavados de la harina de konjac con mezclas de agua-etanol permiten mejorar su calidad al retirar partículas microfinas y algunas impurezas. De esta forma, el producto final contiene una mayor proporción de glucomanano, resulta más blanco y con menores niveles de contaminación bacteriana (Shimizu Chemical Corporation, 1994; Takigami y Phillips, 1995). En la Tabla 1.1 se pueden apreciar los efectos del proceso de purificación (Takigami y Phillips, 1995) sobre la composición de la harina de konjac.

	Contenidos (g / 100 g de muestra)					
	Agua	Proteínas	Lípidos	Carbohidrato	Fibra	Cenizas
Harina de Konjac	7,2	2,2	2,3	82,6	0,5	5,2
Harina de konjac purificada	7,5	0,8	0,9	88,6	0,5	1,7

Tabla 1.1. Composición de la harina de konjac antes y después del proceso de purificación.

La capacidad viscosizante de la harina de konjac depende de la naturaleza de los tubérculos y de las condiciones de cultivo (Kishida, 1979; Maekaji y Kawamura, 1985). Es frecuente que los fabricantes procedan a mezclar harinas de distinta procedencia con el fin de comercializar un producto homogéneo en cuanto a capacidad viscosizante (FMC Corporation., 1994; Takigami y Phillips, 1995).

El rendimiento global del proceso de obtención del KGM es, aproximadamente, del 8-12% del peso de tubérculo fresco. Su harina refinada contiene un 52-72% de KGM y en las harinas purificadas este contenido puede superar el 90% (Fang y Wu, 2004).

1.5 Composición química

El glucomanano de konjac (Figura 1.6) es un polisacárido de elevado peso molecular ($0,67 \cdot 10^6$ - $1,9 \cdot 10^6$), no iónico, soluble en agua, compuesto por unidades de glucosa y manosa unidas aleatoriamente mediante enlaces glucosídicos $\beta(1-4)$ con una relación molar 1:1,6 (Maekaji, 1978; Maeda y col., 1980; Ye y col., 2006). No obstante, se han obtenido glucomananos de Konjac para los que la relación glucosa:manosa es muy próxima a 2 (Nishinari, 2000). La molécula de KGM contiene grupos acetilo aleatoriamente distribuidos en la posición C-6 de las unidades monosacarídicas con una frecuencia variable que oscila entre 1 acetilo/ 10 hexosas y 1 acetilo/ 20 hexosas (Maekaji, 1978; Maeda y col., 1980; Dave y col., 1998). Se trata de una molécula prácticamente lineal con pequeñas ramificaciones (2-3 unidades) en el carbono 3 de la manosa, unidas mediante enlaces $\beta(1-3)$ (Maeda y col., 1980; Dave y col., 1998). Li Bin (2006) recientemente ha encontrado moléculas de KGM sin ningún tipo de ramificación, peculiaridad que ha atribuido al origen de la variedad de KGM y a las condiciones de cultivo.

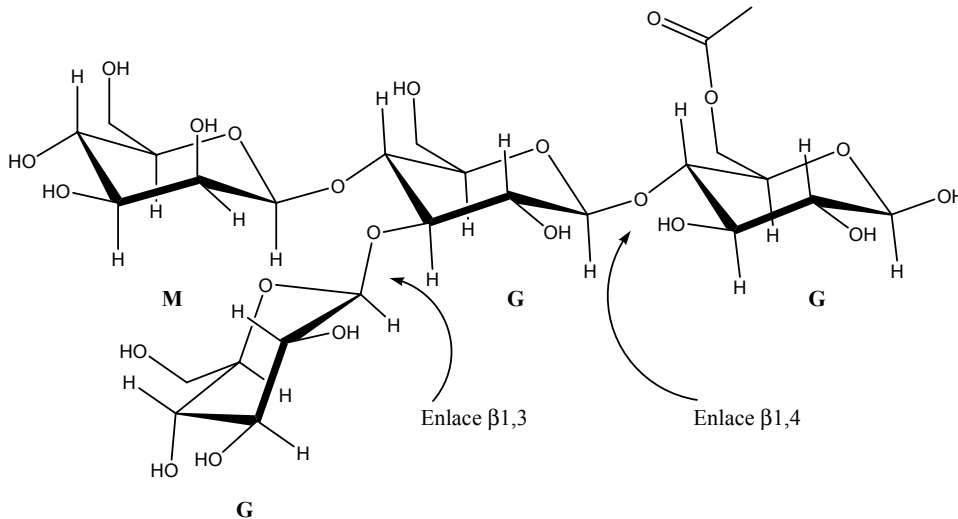


Figura 1.6. Estructura química del glucomanano de konjac (*G*- glucosa: *M*- manosa)

1.6 Solubilidad

Los $\beta(1-4)$ mananos y glucanos (celulosa) son insolubles en agua debido fundamentalmente a las asociaciones entre cadenas a través de puentes de hidrógeno. La solubilidad acuosa del KGM se debe a la presencia de las pequeñas cadenas laterales, que dificultan la asociación intermolecular y mejoran la solvatación, pero sobre todo a la presencia de grupos acetilo. El mecanismo a través del cual los grupos acetilo promueven la solubilidad es objeto de controversia. Así, Dea y col. (1977) han propuesto que los grupos acetilo evitan una alta penalización entrópica al producirse asociaciones intermoleculares, mientras que Brownsey y col. (1988) proponen un simple mecanismo de impedimento estérico, por parte de los acetilo, para la formación de enlaces intermoleculares.

Con independencia del mecanismo de hidrosolubilización, se ha demostrado que la velocidad de disolución del KGM en medio acuoso es tanto mayor cuanto mayor es el grado de acetilación (Gao y Nishinari, 2004).

1.7 Capacidad de hinchamiento

El KGM es un material marcadamente hidrofílico con una notable capacidad de hinchamiento. Así, es capaz de incrementar su volumen más de 200 veces como consecuencia de la absorción de agua (Shinzato y col., 1996). Además, Koroskeyi y McCarthy (2003) observaron que su capacidad de absorción de agua depende del grado de acetilación (DS) (Figura 1.7).

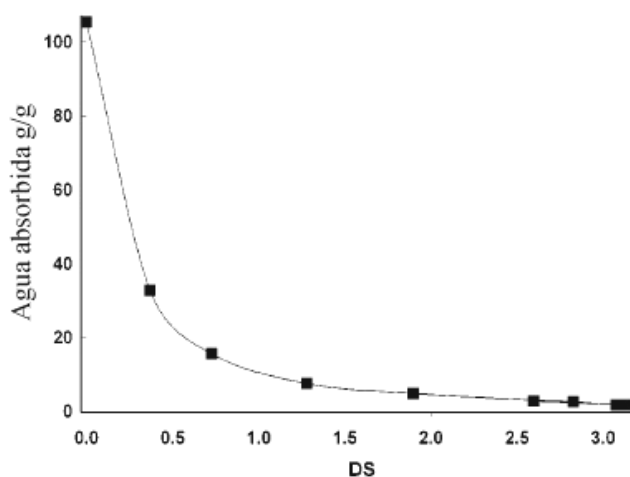


Figura 1.7. Influencia del grado de acetilación (DS) sobre la capacidad de absorción de agua del KGM (Koroskenyi y McCarthy, 2001).

La existencia de una relación de tipo exponencial entre ambas variables, determina que pequeños incrementos en el grado de acetilación del KGM se acompañen de fuertes reducciones en la capacidad de absorción de agua.

1.8 Biodegradabilidad

La degradación química del glucomanano de konjac se produce por hidrólisis alcalina y, especialmente, por hidrólisis ácida (Hansson y Hartler, 1970; Maeda y col., 1980) y posterior ebullición durante tiempos prolongados (3 horas), que dan lugar a su hidrólisis total. Aunque es posible producir una hidrólisis parcial utilizando condiciones menos agresivas (Kato y col., 1970), en general este tipo de tratamientos son empleados para conocer, por aplicación de distintas técnicas instrumentales, los azúcares constituyentes del KGM y distan mucho de los procesos degradativos que puede experimentar *in vivo*.

El KGM es susceptible de degradación por diversas enzimas como galactomananasas (Chang y col., 2006), celulasas y β -mananasas. En general, estas enzimas dan lugar a mono y oligosacáridos como productos de degradación, tal y como se muestra de modo resumido en la tabla 1.2.

Enzima	Fuente	Productos de degradación			Referencia
		Disacáridos	Trisacáridos	Oligosacáridos	
β mannanasa	Tubérculos de KGM	M-M	M-M-M	M-M-M-M	(Kato y Murakami, 1998)
		G-M	G-M-M	G-M-M-M	
		G-G	M-G-M	G-G-M-M	
			G-G-M	G-M-M-G	
				G-M-M-M-M	
	Penicillium purpurogenum	M-M	G-M-M	M-G-M-M	(Kusakabe y col., 1988)
		G-M	M-G-M	M-G-G-M	
			G-G-M		
	Streptomices sp	M-M	M-M-M	M-M-M-M	(Takahashi y col., 1984)
		G-M	G-M-M	G-G-M-M	
			G-G-M		
	Aspergillus Níger	M-M	M-M-M		(Cescutti y col., 2002)
		G-M	G-M-M		
		G-G	M-G-M		
		G-G-M			
Enzimas intestinales solubles	Humanos	M-M			(Matsuura, 1998)
		G-M			
		G-G			
Celulasa	Penicillium funiculosum	M-M	M-M-M		(Cescutti y col., 2002)
		G-M	M-M-G		
		M-G	M-G-G		

Tabla 1.2. *Productos de degradación de KGM por acción de distintas enzimas. (M: Manosa; G: glucosa).*

Aunque tradicionalmente se ha considerado el KGM un polisacárido no degradable en el tracto gastrointestinal, los estudios llevados a cabo por Matsuura (1998) permitieron poner de manifiesto su marcada biodegradabilidad en el colon humano, alcanzándose valores próximos al 100%. La figura 1.8 recoge una representación esquemática de la degradación fisiológica del KGM, en la que intervienen enzimas

intestinales, enzimas solubles y bacterias anaerobias intestinales humanas (Matsuura, 1998).

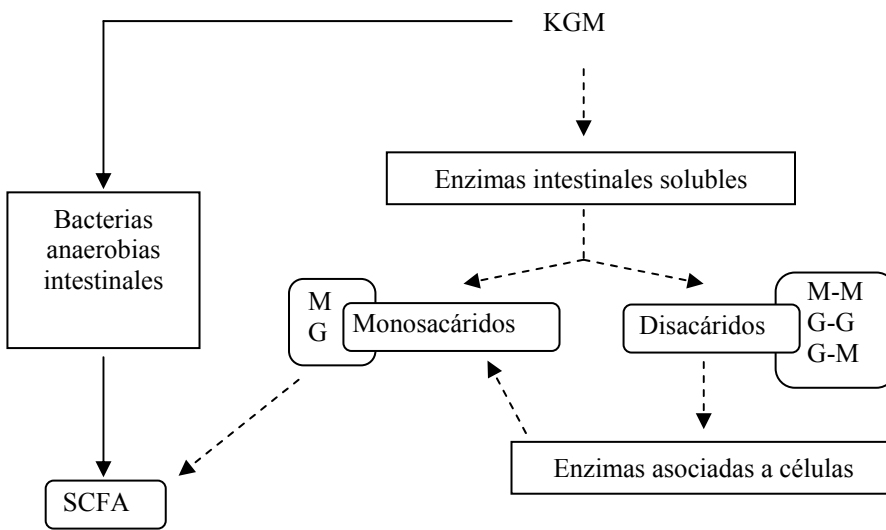


Figura 1.8. Representación esquemática de la degradación fisiológica del KGM. (M: manosa, G: glucosa, SCFA: ácidos grasos de cadena corta).

A partir de cultivos de *Aerobacter manolyticus* y especialmente de *Clostridium butyricum* o *beijerinckii* obtenidos de heces humanas, se ha podido establecer que la enzima responsable de la degradación del KGM en el colon es una endo- β -mannanasa extracelular (Nakajima y Matsuura, 1997) con un peso molecular comprendido entre 50 y 53 kDa, estable a pH alcalino y con una actividad degradativa óptima a pH 7-8. La capacidad de esta β -mannanasa para a degradar KGM ha sido utilizada recientemente para la producción industrial de oligosacáridos (Nakajima y col., 2002). Estudios realizados por Burke y col. (2005) han establecido que una

concentración *in vitro* de β -mannanasa de 0,166 U/mL es la que más se aproxima a las condiciones de degradación *in vivo*.

Los estudios dirigidos a evaluar la incidencia del proceso de degradación del KGM sobre las propiedades físicas y reológicas del polisacárido, hasta el momento son escasos. En este sentido, Li y col. (2004) estudiaron la degradación del KGM por una β -glucanasa y por dos β -mananastas procedentes de *Bacillus sp.* y *Nocardioform actinomycetes* respectivamente, registrando la evolución del proceso en función de los valores de peso molecular y viscosidad intrínseca de disoluciones de KGM. En todos los casos, observaron perfiles bifásicos constituidos por una etapa inicial, de orden cero, en la que la constante de velocidad es inversamente proporcional a la concentración de KGM, seguida de una etapa de orden uno en la que, lógicamente, la constante de velocidad de degradación es independiente de la concentración de sustrato.

1.9 Propiedades reológicas de las disoluciones de KGM

Numerosos polímeros en disolución adoptan una forma típica de ovillo, con una conformación aleatoria. Si se asume el modelo físico que asigna a cada molécula de polímero y disolvente asociado, una esfera hidrodinámicamente impenetrable, en una disolución diluida las “islas” individuales de polímero se encuentran tan alejadas en el “mar” de disolvente que las interacciones son despreciables, de modo que las moléculas poliméricas pueden moverse libremente (Figura 1.9a). A medida que aumenta la concentración de polímero, las colisiones entre sus moléculas se tornan más y más frecuentes, hasta alcanzar la denominada

concentración de solapamiento a la que comienzan a contactar unas con otras (Figura 1.9b). Esta concentración, que normalmente se designa como C^* , se considera el límite entre disoluciones diluidas y concentradas (Figura 1.9c) en las que la interpenetración de las cadenas poliméricas es la característica distintiva (Lapasin y Pricl, 1995).

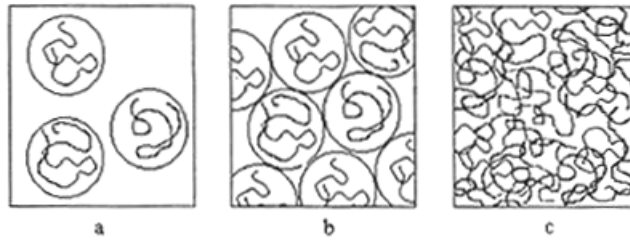


Figura 1.9. Transición entre los regímenes de concentración de las disoluciones poliméricas: a) diluida, b) concentración de solapamiento, c) concentrada. (Lapasin y Pricl, 1995).

1.9.1 Disoluciones diluidas.

El estudio reológico de disoluciones diluidas de KGM permite obtener su viscosidad intrínseca $[\eta]$. La viscosidad intrínseca de un polímero es una medida de la capacidad del polímero para aumentar la viscosidad del medio, que a su vez depende del tamaño molecular del polímero y de la conformación que adopte en el disolvente. De este modo, valores elevados de viscosidad intrínseca proceden de polímeros de elevado peso molecular cuyas moléculas adoptan conformaciones extendidas en el disolvente (Cheng y col., 2007). En la figura 1.10 se presentan los valores de viscosidad intrínseca de disoluciones de KGMs de

distinto peso molecular previo ajuste de los datos experimentales al modelo de Huggins (1942).

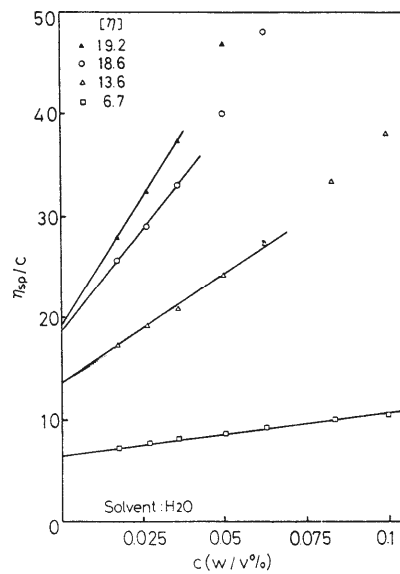


Figura 1.10. Valores de viscosidad intrínseca $[\eta]$ de KGMs de diferente peso molecular. $7.5,96 \cdot 10^5$, $4,44 \cdot 10^5$, $8.4,38 \cdot 10^5$ y $2,56 \cdot 10^5$.

El estudio de la relación entre viscosidad intrínseca y peso molecular del polímero permite obtener los valores de K y de α , parámetros característicos del modelo de Mark-Houwink (Mark, 1938; Houwink, 1940). En la Tabla 1.3 se recogen los valores de K y de α estimados por diversos autores para el KGM y algunos derivados de KGM en distintas condiciones de temperatura y para distintos disolventes. La constante α es un parámetro conformacional, característico de las macromoléculas en disolución, cuyo valor oscila entre 0,5 - para moléculas flexibles de forma esférica - y 1,8 - para moléculas alargadas completamente rígidas-.

Los valores de K dependen fundamentalmente de la geometría de las uniones entre residuos en las cadenas poliméricas. Los polisacáridos con enlaces $\beta(1-4)$, como el KGM, adoptan conformaciones extendidas y, por tanto, valores elevados de K (Lapasin y Pricl, 1995).

Polímero	Medio	T (°C)	K	α	Referencia
KGM	agua	25	$3,8 \cdot 10^{-4}$	0,72	(Yang y col., 1998)
	agua	25	$5,3 \cdot 10^{-4}$	0,78	(Prawitwong y col., 2006)
	agua	30	$5,1 \cdot 10^{-4}$	0,75	(Li y col., 2006)
	NaCl 0,2M	25	$6,0 \cdot 10^{-2}$	0,73	(Bin y Xie, 2003)
	Cadoxen	25	$3,6 \cdot 10^{-2}$	0,69	(Gao y Nishinari, 2004)
Metil-KGM	Agua	30	$6,4 \cdot 10^{-4}$	0,74	(Kishida y Okimasu, 1978)
Nitro-KGM	-	-	$1,2 \cdot 10^{-3}$	0,95	(Dave y col., 1998)

Tabla 1.3. Valores de K y de α estimados para KGM y derivados de KGM en los medios y a las temperaturas indicadas.

El estudio de las disoluciones diluidas de KGM también permite determinar el peso molecular medio del polímero (M), una vez conocida su viscosidad intrínseca en un determinado solvente, y los valores de las constantes K y α (Tabla 1.3), mediante la ecuación $M=K \cdot [\eta]^\alpha$ (Mark, 1938; Houwink, 1940). Las disoluciones diluidas, además, permiten estudiar el efecto de las interacciones sinérgicas entre polisacáridos mediante la evaluación del aumento de la viscosidad de las disoluciones mixtas, en condiciones en las que es difícil que se produzcan fenómenos de exclusión o de agregación (Goycoolea y col., 1995a).

1.9.2 Transición de disoluciones diluidas a disoluciones concentradas

La determinación de la concentración de solapamiento (C^*) suele llevarse a cabo a partir de representaciones, doble logarítmicas, de la viscosidad específica de la disolución de polímero frente a su concentración (Morris y col., 1981; Lapasin y Prichl, 1995). Para la práctica totalidad de polisacáridos se observan dos segmentos rectilíneos de distinta pendiente (b) correspondientes a los regímenes diluido y concentrado, respectivamente. En la Figura 1.11, que presenta la evolución de la viscosidad específica de las disoluciones de KGM en función de su concentración, se pone de manifiesto la fácil detección de la concentración de solapamiento (Ratcliffe y col., 2005).

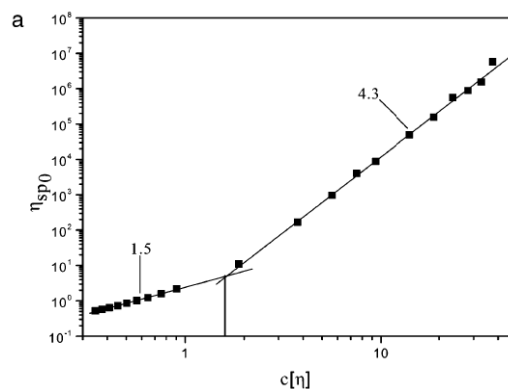


Figura 1.11. Determinación de la concentración de solapamiento C^* de KGM mediante la aproximación doble logarítmica (Ratcliffe y col., 2005).

En la tabla 1.4 se han agrupado los resultados obtenidos, por distintos autores, en la determinación de la C^* de KGM.

Polímero	Pendiente (b)		$C^*[\eta]_0$	Referencia
	diluido	concentrado		
KGM	1,5	4,3	1,6	(Ratcliffe y col., 2005)
	1,4	-	>1	(Kohyama y Nishinari, 1997)
	1,66	3,98	-	(Jacon y col., 1993)

Tabla 1.4. *Valores de las pendientes (b) de los tramos rectilíneos y concentraciones de solapamiento estimados por distintos autores para el KGM.*

Los valores de b correspondientes al régimen diluido son muy similares a los obtenidos para otros polisacáridos (Morris y col., 1981), en tanto que los del régimen concentrado resultan algo elevados lo que, como en el caso de la goma guar o de la goma de algarroba, se atribuyen a un hiperentrecruzamiento de las cadenas poliméricas (Ratcliffe y col., 2005).

1.9.3 Disoluciones concentradas

Normalmente, las disoluciones concentradas de polisacáridos, desde un punto de vista reológico, presentan un comportamiento pseudoplástico, consecuencia del fuerte entrecruzamiento de las cadenas poliméricas (Morris y col., 1981).

Para la caracterización de estos sistemas se han propuesto numerosos modelos que aportan informaciones complementarias. Así, la aplicación del modelo de Ostwald-de Waele (de Waele, 1923; Ostwald, 1925) permitió concluir a Kishida (1979) que, al incrementar el peso molecular del KGM, se produce un aumento de la consistencia de las

disoluciones concentradas en tanto que los valores de índice de fluidez (indicativo del grado de pseudoplasticidad) permanecen prácticamente constantes. Por su parte, Jacon y col. (1993) detectaron problemas en el ajuste del modelo de Carreau (1972) a los datos experimentales para describir la curva general de flujo de las disoluciones de KGM, en tanto que con el modelo de Cross (1965) se obtuvieron resultados mucho mejores (Jacon y col., 1993).

Finalmente, Ractcliffe y col. (2005) han utilizado con éxito el modelo de Ellis (Bird y col., 1977; Carreau y col., 1997) - equivalente al modelo de Cross pero utilizando la fuerza de cizalla como variable independiente (Barnes y col., 1989) - para caracterizar el comportamiento reológico de disoluciones concentradas de KGM.

Las propiedades viscoelásticas que manifiestan los sistemas concentrados pueden estudiarse mediante ensayos dinámicos de cizalla oscilatoria. Nishinari y col. (2000) estudiaron la evolución de los valores de módulo elástico (G') y de módulo viscoso (G'') de dispersiones de KGM de diferentes concentraciones respecto de la frecuencia. Los resultados obtenidos, que se presentan en la Figura 1.12, permiten concluir que, a frecuencias bajas, las moléculas de KGM disponen de tiempo suficiente para fluir durante un ciclo de oscilación por lo que los valores de G'' resultan mayores que los de G' . Sin embargo, a frecuencias elevadas no es posible eliminar los entrecruzamientos moleculares, que actúan como uniones temporales, dando lugar a valores superiores de G' . Este tipo de espectros mecánicos permite detectar, a cada concentración de KGM, la frecuencia a la que coinciden los valores de ambos módulos. La inversa de tal frecuencia, es decir, el tiempo de relajación, suministra

información relativa al tiempo durante el cual las moléculas de polímero pueden almacenar energía (Picton y Muller, 1996).

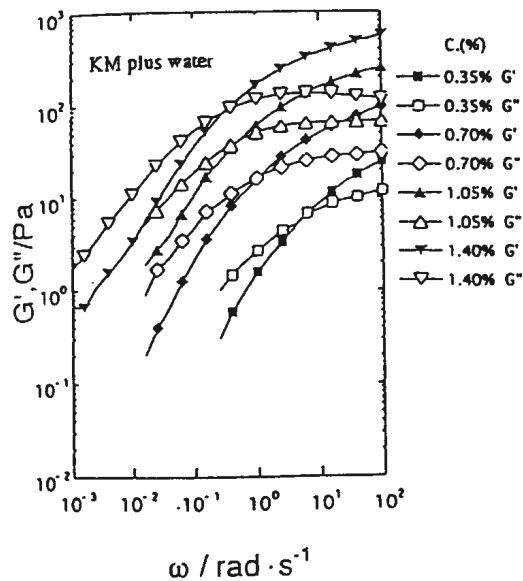


Figura 1.12. Espectros mecánicos para disoluciones de KGM de distinta concentración. Módulo elástico G' (símbolos abiertos), módulo viscoso G'' (símbolos cerrados) (Nishinari, 2000).

1.9.4 Capacidad viscosizante del KGM en comparación con otros polisacáridos

El glucomanano de konjac presenta una capacidad viscosizante muy elevada con respecto a la de otros polisacáridos naturales. De acuerdo con Peiying y col. (2002) una dispersión en agua a 30°C de KGM purificado de “calidad superior” al 1% p/v, debe proporcionar una viscosidad superior a 32000 mPa·s, mientras que una variedad equivalente de KGM sin purificar debe suministrar al menos 22000 mPa·s. Si se comparan estos

valores con los obtenidos para otros polisacáridos, como los galactomananos, goma algarroba y goma guar (Tabla 1.5), se concluye que la capacidad viscosizante del KGM resulta muy superior.

Polisacárido	Concentración (p/v)	Temperatura °C	Viscosidad (mPa·s)
Glucomanano de konjac			
<i>Propol A</i>	1%	25	122800
<i>Nutricol</i>	1%	25	5000
Goma algarroba	1%	25	1200-2500
Goma guar	1%	-	4860
Xantano	1%	25	1200-1600
Goma acacia	30%	25	100
Tragacanto	1%		100-4000
Quitosano	1%*		260
Hidroxietil celulosa			
<i>Celozize QP 30000</i>	1%	25	1230-1500
<i>Celozize QP 52000</i>	1%	25	1800-2100
<i>Celozize QP 100M</i>	1%	25	3000
<i>Natrosol HHR</i>	1%	25	3400-5000
<i>Natrosol H4R</i>	1%	25	3400-5000
<i>Natrosol HHR</i>	1%	25	1500-2500
Hidroxietilmetil celulosa	2%	20	22-30
Hidroxipropil celulosa			
<i>Klucel HF</i>	1%	25	1500-3000
Hidroxipropilmetilcelulosa			
<i>Methocel K4M Premium</i>	2%	20	4000
<i>Methocel K15M Premium</i>	2%	20	15000
<i>Methocel K100M Premium</i>	2%	20	100000

* en ácido acético.

Tabla 1.5. Valores de viscosidad aparente de distintos polisacáridos en agua a las temperaturas y concentraciones que se indican. (Shimizu Chemical Corporation, 1994; FMC Corporation., 1994; Rowe y col., 2006).

Como se puede observar en la figura 1.13, esta superioridad en cuanto a capacidad viscosizante del KGM respecto de otros polisacáridos se mantiene en amplios intervalos de concentración.

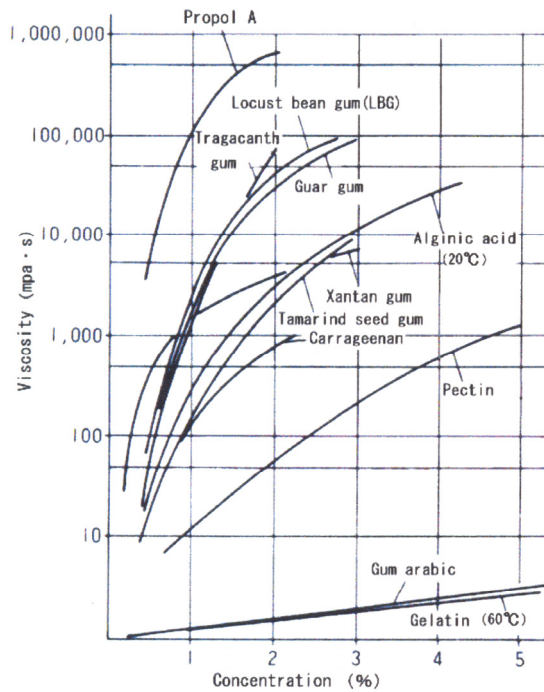


Figura 1.13. Relación viscosidad-concentración en agua a 25°C (o a la temperatura indicada) para diferentes polisacáridos. Tomada de *Glucomannan Propol: The ultimate dietary fiber*. Shimidzu Chemical Co.

1.10 Geles de KGM

El glucomanano de konjac da lugar a la formación de geles en medio acuoso mediante la adición de cantidades elevadas de sales neutras (Ozu y col., 1993) o mediante la adición de agentes alcalinos que aumenten suficientemente el pH del medio.

La adición de concentraciones elevadas de Na_2SO_4 o de NaCl a disoluciones acuosas de KGM conduce a la formación de geles muy débiles, lo que justifica su uso limitado.

Los geles de KGM más conocidos y empleados son los formados mediante la adición de agentes alcalinos a dispersiones acuosas de KGM. De este modo, la adición de hidróxidos o carbonatos da lugar a geles físicos termorresistentes, elásticos y de elevada consistencia. Estos geles se solubilizan por adición de agentes - como urea - que provocan la rotura de los enlaces de hidrógeno, lo que corrobora la inexistencia de uniones covalentes en este tipo de sistemas (Maekaji, 1974; Dave y col., 1998).

Los trabajos de Maekaji de los años setenta (1974, 1978) pusieron de manifiesto las principales características de los geles a los que da lugar el KGM en medio alcalino. Como consecuencia de la acción de álcalis, las moléculas de KGM experimentan un proceso de desacetilación que provoca su agregación mediante enlaces débiles, tipo puente de hidrógeno, dando lugar a la típica estructura de red. Este autor también dio cuenta de que, desde que se incorpora al medio el agente gelificante hasta que se produce un aumento de la viscosidad, se requiere un periodo de tiempo (periodo de inducción) que coincide con el tiempo necesario para completar la reacción de desacetilación que, por lo tanto, parece constituir la etapa limitante en el proceso de gelificación (Maekaji y col. 1974, 1978).

Posteriormente Williams y col. (2000), tomando como base determinaciones reológicas y de RMN, propusieron el mecanismo de

gelificación que se esquematiza en la Figura 1.14 y que, a grandes rasgos, coincide con el indicado por Maekaji.

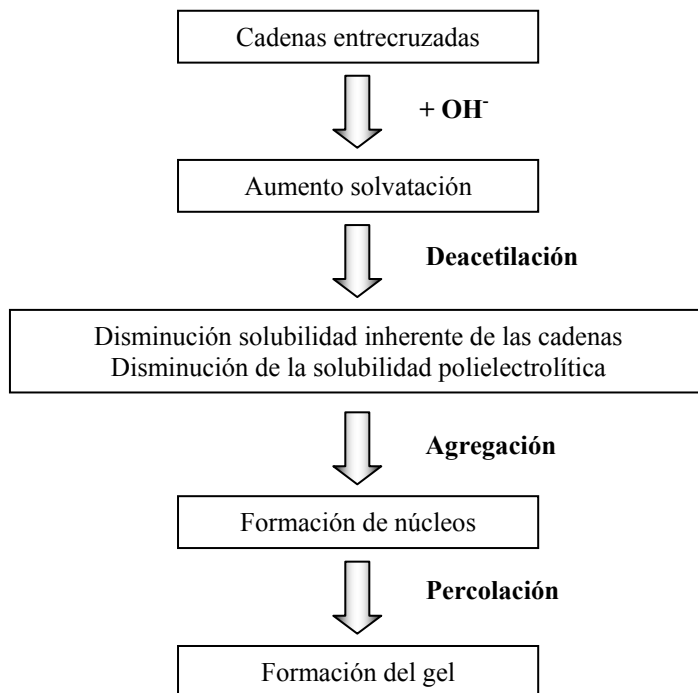


Figura 1.14. Representación esquemática del mecanismo de gelificación del KGM. (Williams y col., 2000).

Distintos autores han evaluado la incidencia de una serie de factores (entre los que se encuentran principalmente la concentración, peso molecular y grado de acetilación del KGM) sobre la velocidad de formación y propiedades finales de los geles alcalinos de KGM.

Así, Gao y col. (2004) y Huang y col. (2002) analizaron los efectos de la concentración de polisacárido sobre los valores de módulo elástico (G') de los geles que origina. Como se puede observar en la típica representación doble logarítmica (Figura 1.15), es posible distinguir dos

regiones lineales, cuya existencia predicen el modelo de cascada y el modificado del elastómero gomoso, con pendientes de 5,37 y de 2,27 para bajas (hasta 1%) y altas concentraciones, respectivamente.

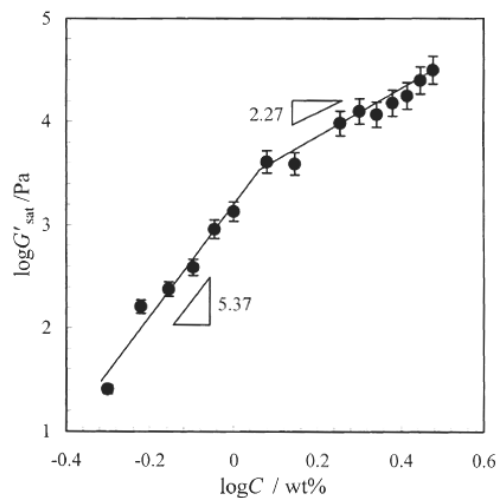


Figura 1.15. Efecto de la concentración de KGM sobre el valor del módulo elástico (G') de los geles generados en presencia de Na_2CO_3 a 45°C (Huang y col., 2002).

El peso molecular del KGM es otro de los factores condicionantes del proceso de gelificación. En la figura 1.16 se presentan los efectos del peso molecular del KGM sobre el valor del módulo elástico obtenido durante el proceso de gelificación (Nishinari, 2000). Como puede observarse, todo incremento en el peso molecular del polisacárido se acompaña de un aumento en el valor del módulo elástico. Este comportamiento -similar al descrito para otros polisacáridos (Rochas y col., 1990; Nishinari y col., 1997)- se justifica por la mayor probabilidad de formación de zonas de unión entre cadenas poliméricas al aumentar la longitud de éstas.

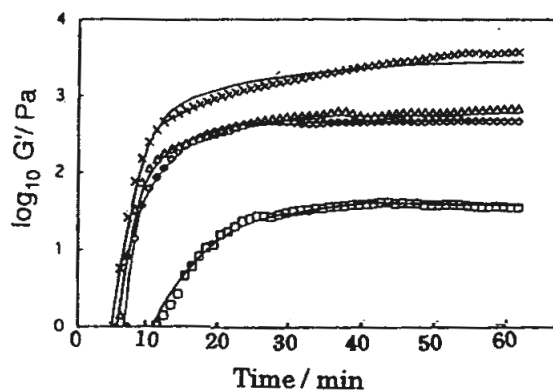


Figura 1.16. Efecto del peso molecular de KGM sobre los valores de módulo elástico (G') obtenidos durante el proceso de gelificación de disoluciones de KGM de diferentes pesos moleculares al 2%: \forall $2,56 \cdot 10^{-5}$, M $4,38 \cdot 10^{-5}$, 8 $4,44 \cdot 10^{-5}$ y $5,96 \cdot 10^{-5}$ en presencia de Na_2CO_3 1M a $60^\circ C$ (Nishinari, 2000).

Por último, Nishinari y col. (2000) pusieron de manifiesto que los valores de módulo elástico de geles de KGM - que están directamente relacionados con el número de enlaces intermoleculares en las zonas de unión - aumentan con el grado de acetilación del polisacárido. Este efecto positivo, justificable a la luz del mecanismo de gelificación del KGM descrito en epígrafes anteriores, está relacionado con la velocidad de desacetilación que, al hacerse más lenta, permite que tenga lugar una distribución más homogénea de los enlaces entre las cadenas poliméricas.

1.11 Geles de KGM con otros polisacáridos

Determinadas mezclas binarias de KGM con otros polisacáridos dan lugar a la aparición de importantes efectos sinérgicos sobre algunas propiedades de sus disoluciones o de los geles que originan. Estos efectos se manifiestan a través de incrementos significativos en la viscosidad de sus disoluciones diluidas, a través de la formación de geles a concentraciones a las que ninguno de sus componentes por separado los originaría o a través de la mejora de las propiedades de los geles formados como consecuencia de la interacción entre ambos componentes. El estudio de las interacciones de KGM con carragenano, gelano y, especialmente, xantano han recibido una considerable atención en este campo (Morris, 1995).

La goma Xantano (XG), descrita por primera vez a finales de los años 50 y aprobada por la FDA para uso alimentario en 1969, es uno de los polisacáridos de mayor interés por sus importantes aplicaciones en las industrias textil, petrolera, alimentaria, cosmética y farmacéutica (Rosalam y England, 2006). Se trata de un polisacárido, producido industrialmente a partir de la bacteria *Xanthomonas campestris*, de carácter aniónico y estructuralmente formado por unidades pentasacáridicas. La unión sucesiva de estas unidades da lugar a la formación de un esqueleto celulósico con cadenas laterales trisacáridicas (Figura 1.17 B). Estas cadenas laterales están compuestas por manosa (β 1-4), ácido glucurónico (β 1-2) y manosa, encontrándose unidas a uno de cada dos residuos del esqueleto celulósico mediante enlaces (α 1-3) (Figura 1.17 A). Alrededor de la mitad de las manosas terminales contienen un residuo de ácido

pirúvico -unido mediante enlace cetal- y buena parte de las manosas internas presentan grupos acetilo en el oxígeno 6 (Becker y col., 1998).

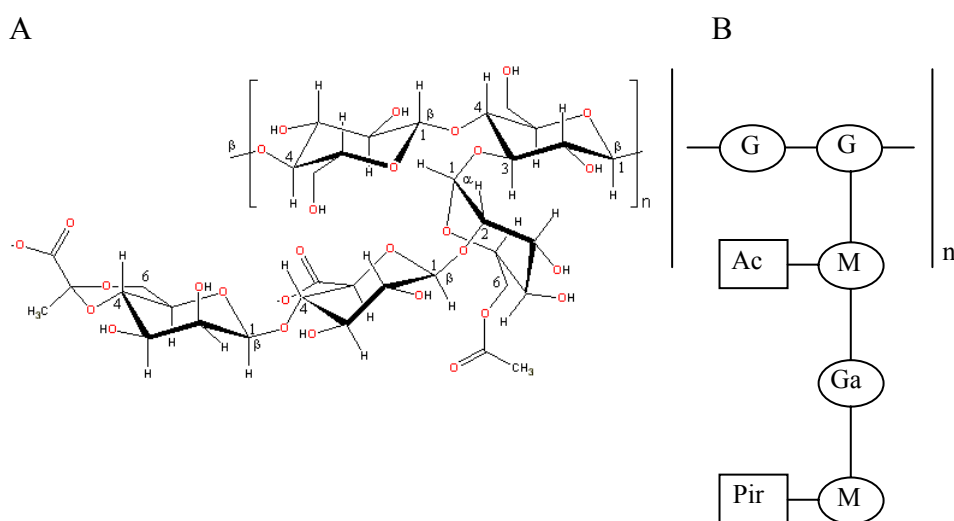


Figura 17. Estructura química (A) y por bloques (B) de la goma xantano. La unidad repetitiva del XG está formada por cinco monosacáridos: 2 glucosas (G), un ácido glucurónico (Ga) y 2 manosas (M) sustituidas en grado variable con acetato (Ac) y piruvato (Pir).

A elevada temperatura y en medios de fuerza iónica reducida, las moléculas de XG en disolución adoptan una conformación de ovillo desordenado. Por enfriamiento de la disolución y/o por adición de sales al medio, experimentan una transformación conformacional reversible de tipo cooperativo, adoptando una estructura rígida ordenada. Además del aumento de la fuerza iónica del medio, la retirada de los residuos piruvato de las cadenas laterales favorece la estabilización de la estructura ordenada, aumentando la temperatura de transición conformacional (T_m). Por el contrario, la eliminación de los residuos acetato, reduce la

estabilidad de la estructura ordenada, disminuyendo el valor de T_m . (Morris y col., 1977; Shatwell y col., 1990; Goycoolea y col., 1995b).

La estructura en estado ordenado del XG -corresponda a una estructura helicoidal simple o doble (Goycoolea y col., 1995b)- es la responsable de las características reológicas inusuales que presenta este polisacárido a bajas concentraciones, originando sistemas capaces de fluir que al mismo tiempo presentan características próximas a las de geles de naturaleza extremadamente débil.

La asociación de cadenas de xantano entre sí se limita a la formación de geles débiles (Dea, 1989; Goycoolea y col., 1995b) en tanto que la interacción sinérgica con KGM da lugar a la formación de geles verdaderos incluso a concentraciones extremadamente reducidas (0,1%) (Tako, 1993).

El primer modelo propuesto para explicar la asociación de moléculas de xantano y galacto- / glucomanano se debe a Dea y col. (1977, 1986). Estos autores proponen que las interacciones xantano - glucomanano, que conducen a la formación de la red de gel, tienen lugar mediante la unión del esqueleto de la molécula de glucomanano a la superficie de la hélice de las moléculas de XG en su estado ordenado (Figura 1.18 a).

Con posterioridad Cairns y Brownsey (Cairns y col., 1986; Cairns y col., 1987; Brownsey y col., 1988) sugirieron que las interacciones responsables de la gelificación se producen a través de la unión del glucomanano al esqueleto de la molécula de xantano únicamente en su estado desordenado (Figura 1.18b).

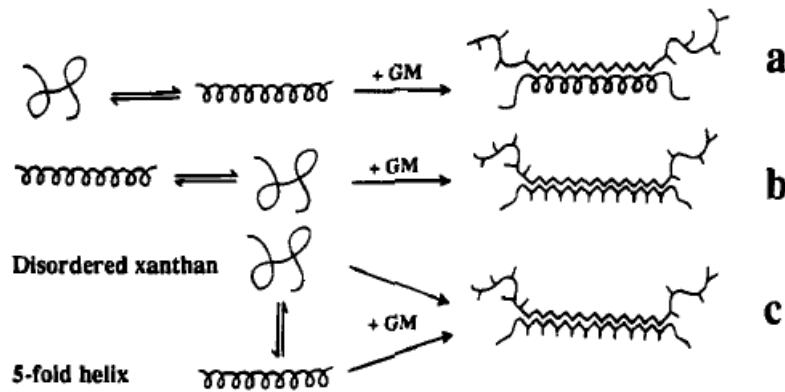


Figura 1.18. Representación esquemática simplificada de las interpretaciones propuestas de la interacción de glucomanano de konjac (GM) y Xantano. a) Modelo de Dea y col. b) Modelo de Cairns, Brownsey y col y c) Modelo de Goycoolea, Morris y col. (Goycoolea y col. 1995).

Por último, Morris y Goycoolea han propuesto un tercer modelo (Figura 1.18c) en el que las asociaciones responsables de la formación de la estructura del gel, se producen mediante uniones heterotípicas entre glucomanano y xantano con la molécula de XG tanto en su estado ordenado como desordenado, dando lugar a la formación de una conformación estructural nueva que resulta termodinámicamente más estable que la estructura ordenada helicoidal de la molécula de xantano (Morris y Foster, 1994; Goycoolea y col., 1995b).

La fuerza iónica del medio en el que tiene lugar la gelificación mixta glucomanano-xantano tiene una marcada influencia sobre las propiedades de los geles. Así, Annable y colaboradores (1994) comprobaron que la presencia de cationes, especialmente los divalentes, debilita la estructura de los geles mixtos, lo que atribuyen a que la presencia de estos iones

favorece la asociación de las cadenas de xantano entre sí, a expensas de las uniones xantano - glucomanano.

Por otra parte, las propiedades de los geles mixtos se ven profundamente afectadas por las proporciones de los dos polisacáridos en las mezclas. Así, Tako y col. (1993), mediante estudios reológicos, concluyeron que el efecto sinérgico resulta máximo cuando las proporciones de XG y KGM son idénticas. Además, estos autores observaron que la desacetilación del xantano conduce a la obtención de geles más resistentes que los obtenidos con el xantano nativo. Goycoolea y col. (1995) mediante estudios de DSC observaron un aumento progresivo en la entalpía del proceso de gelificación hasta alcanzar proporciones XG:KGM 0,6-0,4. Finalmente Paradossi y col (2002) encontraron, aplicando la espectroscopía de dicroísmo circular, que la estequiometría preferida de la interacción XG:KGM se corresponde con una fracción en peso de XG de 0,55.

Los efectos sinérgicos encontrados entre glucomanano y xantano son superiores a los encontrados entre xantano o carragenano y otros polisacáridos similares al KGM como los galactomananos (Tye, 1991; Ozu y col., 1993).

El gelano es otro polisacárido con el que el glucomanano de konjac es capaz de interactuar sinérgicamente. A bajas concentraciones (0,8%), ambos presentan el comportamiento típico de disoluciones diluidas y, por tanto, son incapaces de formar geles. Sin embargo, su mezcla en proporción 0,6/0,4 a la misma concentración de polisacáridos totales da lugar a la formación de geles a bajas temperaturas, lo que ratifica la existencia de un efecto sinérgico entre ambos polisacáridos. A bajas

temperaturas, las moléculas de gelano adoptan una disposición ordenada en forma de hélices agregadas, por lo que la unión sinérgica debe proceder de la unión de las cadenas de KGM a la superficie de las de gelano (Miyoshi y col., 1997). De esta forma, la adición de cationes al medio favorece la formación de zonas de unión para el KGM dando lugar a geles de mayor consistencia. No obstante, Miyoshi y col. (1996) observaron que concentraciones excesivas de cationes, favorecen la separación de fases, con la consiguiente desaparición del efecto sinérgico (Miyoshi y col., 1996).

Las disoluciones de carragenano a temperaturas inferiores a unos 30°C dan lugar a geles frágiles y transparentes como consecuencia del cambio conformacional de sus moléculas, que abandonan la conformación típica de “ovillo” para formar dobles hélices. Cairns y col. (1988) analizaron, mediante difracción de rayos X, las características de los geles mixtos KGM-Carragenano y no encontraron evidencias de la existencia de uniones específicas entre los dos polisacáridos concluyendo, por lo tanto, que el KGM no contribuye a la estructuración de posibles geles mixtos. Sin embargo, años después Williams y col. (1993), utilizando técnicas de calorimetría diferencial de barrido y de resonancia de espín electrónico, detectaron interacciones entre las moléculas de KGM y las de carragenano y propusieron la existencia de un fenómeno de adsorción de las de KGM sobre las hélices de carragenano, que da lugar a la estabilización de éstas.

Por su parte, Kohyama y col. (1993, 1997) estudiaron los efectos del peso molecular de KGM sobre las propiedades de los geles mixtos con carragenano, obteniendo resultados de indudable interés. Así, según estos autores, los geles mixtos están formados por uniones débiles entre

moléculas de KGM y de carragenano y por uniones fuertes de moléculas de carragenano entre sí que confieren estabilidad térmica al gel como se muestra en la figura 1.19.



Figura 1.19. Estructura del gel mixto de carragenano y glucomanano. Las líneas gruesas representan las cadenas de carragenano y las finas las de glucomanano (Kohyama y cols. 1993).

Los valores de módulo elástico y de módulo viscoso obtenidos para estos geles mixtos, en concentraciones de 0,75% de cada polisacárido, resultaron menores, para cualquier peso molecular de KGM, que las correspondientes al gel de carragenano al 1,5%, observándose no obstante que todo aumento en el peso molecular del KGM se acompaña de un incremento en el valor de ambos módulos. El efecto sinérgico en este caso se presenta cuando los sistemas son sometidos a medidas de fuerte deformación, mostrando los geles mixtos una clara superioridad respecto a los de carragenano, en cuanto a valores de esfuerzo y de deformación de rotura.

Por último, Penroj y col. (2005) estudiaron los efectos de la desacetilación de KGM sobre las propiedades de los geles mixtos KGM-carragenano. La desacetilación de KGM en presencia de carragenano da lugar a la formación de un gel a temperaturas superiores a las de gelificación del carragenano. Además, los valores obtenidos para el módulo elástico son superiores a los esperados para el KGM o el carragenano gelificados de forma independiente, como consecuencia, en opinión de los autores, de un fenómeno de autoasociación segregativa.

1.12 Aplicaciones del KGM como excipiente farmacéutico

El número de publicaciones centradas en la evaluación del KGM como excipiente útil para el control de la liberación de fármacos es escaso, siendo probablemente el trabajo de Nakano y col. (1979) pionero en este campo. Estos autores exploraron la utilidad de los geles de KGM, obtenidos por gelificación con borato y posterior tratamiento térmico, para conseguir una cesión sostenida de clorhidrato de dibucaína. Los resultados obtenidos *in vitro* y en ratas, - a las que se les administró el gel en forma de supositorio - permitieron obtener una prolongación del proceso de liberación de dibucaína durante 6 horas, con perfiles de cesión tipo raíz cuadrada y una estrecha correlación *in vitro-in vivo* (Nakano y col., 1979a; Nakano y col., 1979b).

Los mismos autores (Nakano y col., 1979c) exploraron la utilidad de este tipo de geles para la administración de teofilina por vía oral. Los estudios de disolución, en los que se simularon las condiciones fisiológicas gastrointestinales, pusieron de manifiesto la posibilidad de

prolongar el proceso de cesión de teofilina durante cinco horas a velocidad independiente del pH del medio.

Perols y col. (1997) prepararon perlas a partir de geles de KGM - obtenidos con carbonato potásico - conteniendo proteasa B500. Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios ya que la liberación de la enzima, en cualquiera de las condiciones evaluadas, resultó extremadamente lenta.

Wang y He (2002) con el fin de desarrollar sistemas adecuados para la administración oral de péptidos, elaboraron perlas de alginato, glucomanano y quitosano conteniendo seroalbúmina bovina o insulina como fármacos modelo. Los mejores resultados se obtuvieron mediante la combinación de los tres polímeros en proporciones específicas, que posibilitan la obtención de sistemas de estructura matricial, capaces de prolongar el proceso de liberación de cualquiera de las moléculas polipeptídicas al menos durante tres horas.

Recientemente varios autores (Liu y col., 2004; Chen y col., 2005) han estudiado la utilidad de hidrogeles de KGM, copolimerizados con ácido acrílico y reticulados con diferentes agentes, como vehículos para liberación colónica, combinando la biodegradabilidad colónica del KGM y la posibilidad de modular las propiedades de hinchamiento en función del pH del medio y del grado de reticulación de los hidrogeles.

Por último, Alonso-Sande y col. (2006) llevaron a cabo estudios de liberación de proteínas a partir de nanopartículas de quitosano y glucomanano de konjac. En estos sistemas el KGM juega un papel doble. Por un lado, debido a su interacción con el quitosano, actúa como agente

formador del esqueleto favoreciendo la formación de las nanopartículas y, por otra parte, se utiliza su capacidad como coadyuvante para aumentar el tiempo de permanencia o facilitar la penetración de las nanopartículas en las mucosas y en los tejidos ricos en células M y macrófagos, debido a la interacción favorable que existe entre el polisacárido y los receptores de manosa existentes en estas células. Si bien este último aspecto no fue estudiado en profundidad, los resultados *in vitro* obtenidos por estos autores muestran claramente que la incorporación de KGM da lugar a nanopartículas más estables, con mayor eficacia de asociación y con una velocidad de liberación de proteínas más lenta que nanopartículas equivalentes elaboradas con glucomanano fosforilado o sin glucomanano.

1.13 Otras aplicaciones del KGM

La harina de konjac se ha utilizado durante siglos para la fabricación de postres tradicionales en Japón (Tye, 1991; Kohyama y Nishinari, 1997). Los principales atractivos de estos productos se refieren a que apenas aportan calorías, al no ser digeridos por las enzimas digestivas (Dave y col., 1998), y a que proporcionan fibra hidrosoluble de elevada calidad.

Además, existe una larga tradición en China y Japón en el empleo de los tubérculos de konjac como remedio de diversas enfermedades (Li y col., 2006). Sin embargo, la primera cita científica relativa al uso clínico del KGM, es la que Doi y col. publicaron en la revista *The Lancet* en 1979. En este trabajo se da cuenta de la notable capacidad del KGM administrado por vía oral para reducir los valores de glucemia en pacientes

diabéticos que, en ciertos casos, hace necesaria una disminución de la dosis, o incluso la retirada de fármacos hipoglucemiantes. En la Tabla 1.6 se han resumido los resultados de los estudios dirigidos a evaluar el efecto hipoglucemiante del KGM en pacientes diabéticos, que corroboran los obtenidos inicialmente por los autores indicados.

Sujetos	Dosis de KGM	Reducción glucemia	Referencia
13 pacientes diabéticos	3,6-7,2 g/día	29%	Doi y col. 1979
11 pacientes con diabetes tipo II	0,7 g KGM /100 kCal	11%	Vuksan y col. 1999
11 pacientes con tolerancia reducida a la glucosa	0,5 g KGM /100 kCal	13%	Vuksan y col. 2000
22 pacientes diabetes tipo II	3,6 g/día	23%	Chen y col. 2003

Tabla 1.6. Efecto hipoglucemiante del KGM.

El mecanismo responsable de la actividad hipoglucemiante del KGM parece estar relacionado con su capacidad para aumentar la viscosidad del contenido gastrointestinal, para producir un retraso en el vaciamiento gástrico y para actuar como barrera en la absorción intestinal de glucosa (Doi y col., 1979).

De manera similar, el KGM se ha mostrado eficaz para reducir el exceso de lípidos en sangre, tanto en pacientes sanos como en pacientes diabéticos. En la Tabla 1.7 se han resumido los resultados de los estudios dirigidos a evaluar el efecto antihiperlipémico del KGM.

Sujeto	Dosis KGM	Duración	Reducción		Referencia
			Colesterol	LDL	
Diabético	3,6 g/día	20 días	11%	-	Doi y col. 1979
Obeso	3 g/día	8 semanas	11%	12%	Walsh y col. 1984
Sano	3,9 g/día	1 mes	10%	7%	Arvirl 1995
Diabético	10,5 g/día	3 semanas	16%	25%	Vuksan 1999

Tabla 1.7. Efecto hipocolesterolémico del KGM.

El mecanismo a través del cual el KGM produce este efecto hasta el momento no está claro. No obstante, se han propuesto, como posibles mecanismos, la inhibición de la absorción de colesterol en el yeyuno y de los ácidos biliares en el íleon o la menor estimulación postprandial de la enzima que favorece la síntesis de colesterol (hidro-3-metil-glutaril-CoA). También se ha propuesto la hipótesis de que el ácido graso de cadena corta propionato, producido por la degradación enzimática del KGM, actúe como inhibidor de la síntesis de colesterol (Vuksan y col., 1999; Gallaher y col., 2000; Levrat-Verny y col., 2000; Gallaher y col., 2002).

Desde un punto de vista comparativo, Vuksan y col. (2001) concluyeron que la capacidad de reducción de los niveles de colesterol del KGM resulta muy superior a la de otras fibras dietéticas.

El KGM se ha mostrado de utilidad para el control del apetito en tratamientos de obesidad. Su elevada capacidad de hinchamiento, el incremento que produce en la viscosidad del contenido gástrico y el retraso que provoca en su vaciado determina que dosis, incluso pequeñas, proporcionen una notable sensación de saciedad (Vita y col., 1992; McCarty, 2002).

Finalmente, la ingestión de KGM permite una corrección de los cuadros de estreñimiento (Staiano y col., 2000; Loening-Baucke y col., 2004) sin que se manifiesten efectos secundarios de ningún tipo. El KGM produce un aumento significativo del peso húmedo de las heces, da lugar a una mejora de la flora colónica y aumenta la concentración colónica de bacterias beneficiosas (Chen y col., 2006).

1.14 Bibliografía.

- Alonso-Sande, M., Cuna, M., Remunan-Lopez, C.,** 2006. Formation of new glucomannan-chitosan nanoparticles and study of their ability to associate and deliver proteins. *Macromolecules*, 39, 4152-4158.
- Annable, P., Williams, P.A., Nishinari, K.,** 1994. Interaction in Xanthan-Glucomannan Mixtures and the Influence of Electrolyte. *Macromolecules*, 27, 4204-4211.
- Barnes, H.A., Hutton, J.F., Walters, K.,** 1989. An introduction to rheology. 1 Ed., Elsevier, Amsterdam.
- Becker, A., Katzen, F., Puhler, A., Ielpi, L.,** 1998. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50, 145-152.
- Bin, L., Xie, B.,** 2003. Study on molecular chain morphology of konjac glucomannan. *Agricultural Sciences in China*, 2, 798-803.
- Bird, R.B., Armstrong, R.C., Hassager, O.,** 1977. Dynamics of polymeric liquids. Wiley, New York.

- Brownsey,G.J., Cairns,P., Miles,M.J., Morris,V.J.**, 1988. Evidence for Intermolecular Binding Between Xanthan and the Glucomannan Konjac Mannan. *Carbohydr. Res.*, 176, 329-334.
- Burke,M.D., Park,J.O., Srinivasarao,M., Khan,S.A.**, 2005. A novel enzymatic technique for limiting drug mobility in a hydrogel matrix. *J. Controlled Release*, 104, 141-153.
- Cairns,P., Miles,M.J., Morris,V.J.**, 1986. Intermolecular Binding of Xanthan Gum and Carob Gum. *Nature*, 322, 89-90.
- Cairns,P., Miles,M.J., Morris,V.J., Brownsey,G.J.**, 1987. X-Ray Fiber-Diffraction Studies of Synergistic, Binary Polysaccharide Gels. *Carbohydr. Res.*, 160, 411-423.
- Carreau,P.J.**, 1972. Rheological Equations from Molecular Network Theories. *Transactions of the Society of Rheology*, 16, 99-127.
- Carreau,P.J., De Kee D.C.R, Chhabra R.P.**, 1997. *Rheology of polymeric systems: principles and applications*. Hanser, Munich.
- Cescutti,P., Campa,C., Delben,F., Rizzo,R.**, 2002. Structure of the oligomers obtained by enzymatic hydrolysis of the glucomannan produced by the plant *Amorphophallus konjac*. *Carbohydr. Res.*, 337, 2505-2511.
- Chang,Y.T., Chen,Y.S., Lin,K.T., Lin,I.F., Chen,Y.F., Yen,Y.H., Liu,B.L., Chang,Y.N.**, 2006. Characteristics of galactomannanase for degrading konjac gel. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 43, 153-157.
- Chen,H.L., Cheng,H.C., Liu,Y.J., Liu,S.Y., Wu,W.T.**, 2006. Konjac acts as a natural laxative by increasing stool bulk and improving colonic ecology in healthy adults. *Nutrition*, 22, 1112-1119.

- Chen,L.G., Liu,Z.L., Zhuo,R.X.**, 2005. Synthesis and properties of degradable hydrogels of konjac glucomannan grafted acrylic acid for colon-specific drug delivery. *Polymer*, 46, 6274-6281.
- Cheng,L.H., Abd Karim,A., Seow,C.C.**, 2007. Effects of acid modification on physical properties of konjac glucomannan (KGM) films. *Food Chemistry*, 103, 994-1002.
- Cross,M.M.**, 1965. Rheology of Non-Newtonian Fluids - A New Flow Equation for Pseudoplastic Systems. *J. Colloid Sci.*, 20, 417-437.
- Dave,V., Sheth,M., McCarthy,S.P., Ratto,J.A., Kaplan,D.L.**, 1998. Liquid crystalline, rheological and thermal properties of konjac glucomannan. *Polymer*, 39, 1139-1148.
- de Waele,A.**, 1923. Viscometry and plastometry. *Oil Color Chem. Assoc. J.*, 6, 33.
- Dea,I.C.M.**, 1989. Industrial Polysaccharides. *Pure Appl. Chem.*, 61, 1315-1322.
- Dea,I.C.M., Clark,A.H., Mccleary,B.V.**, 1986. Effect of Galactose-Substitution-Patterns on the Interaction Properties of Galactomannans. *Carbohydr. Res.*, 147, 275-294.
- Dea,I.C.M., Morris,E.R., Rees,D.A., Welsh,E.J., Barnes,H.A., Price,J.**, 1977. Associations of Like and Unlike Polysaccharides - Mechanism and Specificity in Galactomannans, Interacting Bacterial Polysaccharides, and Related Systems. *Carbohydr. Res.*, 57, 249-272.
- Doi,K., Matsuura,M., Kawara,A., Baba,S.**, 1979. Treatment of Diabetes with Glucomannan (Konjac Mannan). *Lancet*, 1, 987-988.
- Fang,W.X., Wu,P.W.**, 2004. Variations of konjac glucomannan (KGM) from *Amorphophallus konjac* and its refined powder in China. *Food Hydrocolloids*, 18, 167-170.

FMC Corporation. Nutricol konjac general technology. 1994.

Gallaher,C.M., Munion,J., Hesslink,R., Wise,J., Gallaher,D.D., 2000.

Cholesterol reduction by glucomannan and chitosan is mediated by changes in cholesterol absorption and bile acid and fat excretion in rats. *J. Nutr.*, 130, 2753-2759.

Gallaher,D.D., Gallaher,C.M., Mahurt,G.J., Carr,T.P., Hollingshead,C.H.,

Hesslink,R., Wise,J., 2002. A glucomannan and chitosan fiber supplement decreases plasma cholesterol and increases cholesterol excretion in overweight normocholesterolemic humans. *J. Am. Coll. Nutr.*, 21, 428-433.

Gao,S.J., Nishinari,K., 2004. Effect of degree of acetylation on gelation of konjac glucomannan. *Biomacromolecules*, 5, 175-185.

Goycoolea,F.M., Morris,E.R., Gidley,M.J., 1995a. Screening for synergistic

interactions in dilute polysaccharide solutions. *Carbohydrate Polymers*, 28, 351-358.

Goycoolea,F.M., Richardson,R.K., Morris,E.R., Gidley,M.J., 1995b.

Stoichiometry and Conformation of Xanthan in Synergistic Gelation with Locust Bean Gum Or Konjac Glucomannan - Evidence for Heterotypic Binding. *Macromolecules*, 28, 8308-8320.

Hansson,J.A., Hartler,N., 1970. Alkaline Degradation of Pine Glucomannan.

Holzforschung, 24, 54-59.

Houwink,R., 1940. Relation between the polymerization degree determined by

osmotic and viscosimetric methods. *J. Prakt. Chem.*, 157, 15-18.

Huang,L., Takahashi,R., Kobayashi,S., Kawase,T., Nishinari,K., 2002.

Gelation behavior of native and acetylated konjac glucomannan. *Biomacromolecules*, 3, 1296-1303.

- Huggins, M.L.**, 1942. The Viscosity of Dilute Solutions of Long-Chain Molecules. IV. Dependence on Concentration. *J. Am. Chem. Soc.*, 64, 2716-2718.
- Jacon, S.A., Rao, M.A., Cooley, H.J., Walter, R.H.**, 1993. The Isolation and Characterization of A Water Extract of Konjac Flour Gum. *Carbohydrate Polymers*, 20, 35-41.
- Kato, E., Murakami, T.**, 1998. Anti-Stokes fluorescence imaging of diffusion process of probe molecules in poly(N-isopropylacrylamide) gels. *Polymer Gels and Networks*, 6, 179-190.
- Kato, K., Watanabe, T., Matsuda, K.**, 1970. Studies on Chemical Structure of Konjac Mannan .2. Isolation and Characterization of Oligosaccharides from Enzymatic Hydrolyzate of Mannan. *Agric. Biol. Chem.*, 34, 532-&.
- Kishida, N.**, 1979b. Relationship Between the Quality of Konjac Flour and the Molecular Matter Nature of Konjac Mannan. *Agric. Biol. Chem.*, 43, 2391-2392.
- Kishida, N.**, 1979a. Relationship Between the Quality of Konjac Flour and the Molecular Matter Nature of Konjac Mannan. *Agric. Biol. Chem.*, 43, 2391-2392.
- Kishida, N., Okimasu, S.**, 1978. Preparation of Water-Soluble Methyl Konjac Gluco-Mannan. *Agric. Biol. Chem.*, 42, 669-670.
- Kohyama, K., Iida H., Nishinari K.**, 1993. A mixed system composed of different molecular weights konjac glucomannan and kappa carrageenan: arge deformation and dynamic viscoelastic study. *Food Hydrocolloids.*, 7, 213-226
- Kohyama, K., Nishinari, K.**, 1997. New application of Konjac glucomannan as a texture modifier. *Jarq-Japan Agricultural Research Quarterly*, 31, 301-306.
- Koroskenyi, B., McCarthy, S.P.**, 2001. Synthesis of acetylated konjac glucomannan and effect of degree of acetylation on water absorbency. *Biomacromolecules*, 2, 824-826.

- Kusakabe,I., Park,G.G., Kumita,N., Yasui,T., Murakami,K.**, 1988. Specificity of Beta-Mannanase from *Penicillium-Purpurogenum* for Konjac Glucomannan. *Agric. Biol. Chem.*, 52, 519-524.
- Laignel,B., Bliard,C., Massiot,G., Nuzillard,J.M.**, 1997. Proton NMR spectroscopy assignment of D-glucose residues in highly acetylated starch. *Carbohydr. Res.*, 298, 251-260.
- Lapasin,R., Pricl,S.**, 1995. Rheology of polysaccharide systems. In: Lapasin,R., Pricl,S. (Eds.), Chapman&Hall, 250-267.
- Levrat-Verny,M.A., Behr,S., Mustad,V., Remesy,C., Demigne,C.**, 2000. Low levels of viscous hydrocolloids lower plasma cholesterol in rats primarily by impairing cholesterol absorption. *J. Nutr.*, 130, 243-248.
- Li,B., Xie,B.J., Kennedy,J.F.**, 2006. Studies on the molecular chain morphology of konjac glucomannan. *Carbohydrate Polymers*, 64, 510-515.
- Li,G.J., Qi,L., Li,A.P., Ding,R., Zong,M.H.**, 2004. Study on the kinetics for enzymatic degradation of a natural polysaccharide, Konjac glucomannan. *Macromolecular Symposia*, 216, 165-178.
- Liu,Z.L., Hu,H., Zhuo,R.X.**, 2004. Konjac glucomannan-graft-acrylic acid hydrogels containing azo crosslinker for colon-specific delivery. *Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry*, 42, 4370-4378.
- Loening-Baucke,V., Miele,E., Staiano,A.**, 2004. Fiber (glucomannan) is beneficial in the treatment of childhood constipation. *Pediatrics*, 113, E259-E264.
- Maeda,M., Shimahara,H., Sugiyama,N.**, 1980. Studies of Mannan and Related-Compounds .5. Detailed Examination of the Branched Structure of Konjac Glucomannan. *Agric. Biol. Chem.*, 44, 245-252.

- Maekaji,K.**, 1978. Determination of Acidic Component of Konjac Mannan. *Agric. Biol. Chem.*, 42, 177-178.
- Maekaji,K.**, 1974. Mechanism of Gelation of Konjac Mannan. *Agric. Biol. Chem.*, 38, 315-321.
- Maekaji,K., Kawamura,D.**, 1985. Variation in Rheological Properties of Konjac Gel with the Corm Cultivar. *Agric. Biol. Chem.*, 49, 2483-2484.
- Mark,H.**, 1938. The formation and properties of highly polymerized solids. *Der Feste Körper*, 65-104.
- Matsuura,Y.**, 1998. Degradation of konjac glucomannan by enzymes in human feces and formation of short-chain fatty acids by intestinal anaerobic bacteria. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, 44, 423-436.
- McCarty,M.F.**, 2002. Glucomannan minimizes the postprandial insulin surge: a potential adjuvant for hepatothermic therapy. *Med. Hypotheses*, 58, 487-490.
- Miyoshi,E., Takaya,T., Williams,P.A., Nishinari,K.**, 1996. Effects of sodium chloride and calcium chloride on the interaction between gellan gum and konjac glucomannan. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 2486-2495.
- Miyoshi,E., Takaya,T., Williams,P.A., Nishinari,K.**, 1997. Rheological and DSC studies of mixtures of gellan gum and konjac glucomannan. *Macromolecular Symposia*, 120, 271-280.
- Morris,E.R.**, 1995. Polysaccharide synergism - More questions than answers? In: *Harding,S.E., Hill,S.E., Mitchell,J.R. (Eds.), Nottingham University Press, Nottingham*, 247-288.
- Morris,E.R., Cutler,A.N., Ross-Murphy,S.B., Rees,D.A., Price,J.**, 1981. Concentration and shear rate dependence of viscosity in random coil polysaccharide solutions. *Carbohydrate Polymers*, 1, 5-21.

Morris,E.R., Foster,T.J., 1994. Role of Conformation in Synergistic Interactions of Xanthan. *Carbohydrate Polymers*, 23, 133-135.

Morris,E.R., Rees,D.A., Young,G., Walkinshaw,M.D., Darke,A., 1977. Order-disorder transition for a bacterial polysaccharide in solution. A role for polysaccharide conformation in recognition between *Xanthomonas* pathogen and its plant host. *J. Mol. Biol.*, 110, 1-16.

Nakajima,N., Ishihara,K., Matsuura,Y., 2002. Dietary-fiber-degrading enzymes from a human intestinal *Clostridium* and their application to oligosaccharide production from nonstarchy polysaccharides using immobilized cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59, 182-189.

Nakajima,N., Matsuura,Y., 1997. Purification and characterization of konjac glucomannan degrading enzyme from anaerobic human intestinal bacterium, *Clostridium butyricum* *Clostridium beijerinckii* group. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 61, 1739-1742.

Nakano,M., Takikawa,K., Arita,T., 1979a. Release Characteristics of Dibucaine Dispersed in Konjac Gels. *J. Biomed. Mater. Res.*, 13, 811-819.

Nakano,M., Takikawa,K., Juni,K., Arita,T., 1979c. Sustained-Release of Drugs from Konjac Gels .4. Sustained-Release of Theophylline from Konjac Gels. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 27, 2834-2837.

Nakano,M., Takikawa,K., Juni,K., Arita,T., 1979b. Sustained-Release of Drugs from Konjac Gels .4. Sustained-Release of Theophylline from Konjac Gels. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 27, 2834-2837.

Nishinari,K., 2000. Konjac Glucomannan. In: Doxastakis,G., Kiosseoglou,V. (Eds.), *ELSEVIER*, 309-330.

- Nishinari,K., Hofmann,K.E., Moritaka,H., Kohyama,K., Nishinari,N.**, 1997. Gel-sol transition of methylcellulose. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 198, 1217-1226.
- Ohashi, S., Shelso, G. J., Moirano, A. L., y Drinkwater, W. L.** 2000. Clarified konjac glucomannan. FMC Corporation. 07/742260 [6162906].
- Ostwald,W.**, 1925. Ueber die Geschwindigkeitsfunktion der Viskosität disperser Systeme. I. *Kolloid-Z*, 36, 99-117.
- Ozu,E.M., Baianu,I.C., Wei,L.-S.**, 1993. Physical and chemical properties of glucomannan gels and related polysaccharides. In: Ion C.Baianu, ,H.P., ,T.F.K. (Eds.), New York, 487-517.
- Paradossi,G., Chiessi,E., Barbiroli,A., Fessas,D.**, 2002. Xanthan and glucomannan mixtures: Synergistic interactions and gelation. *Biomacromolecules*, 3, 498-504.
- Peiying, L., Shenglin, Z., Guohua, Z., Yan, C., Huaxue, O., Mei, H, Zhongfeng, W, Wei, X, y Hongyi, P.**, 2002. Professional standard of the People's Republic of China for agriculture. Konjac Flour. NY/T 494.
- Picton,L., Muller,G.**, 1996. Rheological properties of modified cellulosic polymers in semidilute regime: effect of salinity and temperature. *Pogr. Colloid. Polym. Sci.*, 102, 26-31.
- Prawitwong,P., Takigami,S., Takahashi,R., Phillips,G.O.**, 2006. Effects of g - irradiation properties of konjac mannan. *Transactions of the Materials Research Society of Japan*, 31, 727-730.
- Ratcliffe,I., Williams,P.A., Viebke,C., Meadows,J.**, 2005. Physicochemical characterization of konjac glucomannan. *Biomacromolecules*, 6, 1977-1986.

- Renn, D. W. and Blake, N.,A.** 2003. Clarified hydrocolloids of undiminished properties and method of producing same. *Marine BioProducts International*. 09/609870 [6586590].
- Rochas,C., Rinaudo,M., Landry,S.,** 1990. Role of the molecular weight on the mechanical properties of kappa carrageenan gels. *Carbohydrate Polymers*, 12, 255-266.
- Rosalam,S., England,R.,** 2006. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas compestris* sp. *Enzyme Microb. Technol.*, 39, 197-207.
- Rowe,R.C., Sheskey,P.J., Owen,S.C.,** 2006. Handbook of pharmaceutical excipients. fifth Ed., Pharmaceutical Press, London.
- Shatwell,K.P., Sutherland,I.W., Dea,I.C.M., Rossmurphy,S.B.,** 1990. The Influence of Acetyl and Pyruvate Substituents on the Helix-Coil Transition Behavior of Xanthan. *Carbohydr. Res.*, 206, 87-103.
- Shimizu Chemical Corporation.,** Glucomannan Propol. The ultimate dietary fiber. 1994. Catalog.
- Shimizu, M. and Shimahara, H.,** 1973. Method of selective separation of konjac flour from the tubers of *Amorphophallus Konjac*. Kabushiki Kaisha Shimizu Manzo Shoten. 05/180405 [3767424].
- Shinzato,C., Broussalis,A.M., Ferraro,G.E.,** 1996. Glucomanano: Un aporte a su control de calidad. *SAFYBI*, 35, 26-31.
- Sinha,V.R., Kumria,R.,** 2001. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. *Int. J. Pharm.*, 224, 19-38.

- Staiano,A., Simeone,D., Del Giudice,E., Miele,E., Tozzi,A., Toraldo,C., 2000.**
Effect of the dietary fiber glucomannan on chronic constipation in neurologically impaired children. *J. Pediatr.*, 136, 41-45.
- Sugiyama, N. and Shimahara, H. Konjac mannan., 1975** Kabushiki Kaisha Shimizu Manzo Shoten. 05/513298 [3928322].
- Takahashi,R., Kusakabe,I., Kusama,S., Sakurai,Y., Murakami,K., Maekawa,A., Suzuki,T., 1984.** Studies on the Mannanase of *Streptomyces* .4. Structures of Glucomanno-Oligosaccharides from the Hydrolytic Products of Konjac Glucomannan Produced by A Beta-Mannanase from *Streptomyces* Sp. *Agric. Biol. Chem.*, 48, 2943-2950.
- Takigami,S., Phillips,G.O., 1995.** The production and quality of konjac mannan. In: Phillips,G.O., Williams,P.A., Wedlock,D.J. (Eds.), 385-391.
- Tako,M., 1993.** Binding sites for mannose-specific interaction between xanthan and galactomannan, and glucomannan. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1, 125-131.
- Tye,R.J., 1991.** Konjac Flour - Properties and Applications. *Food Technology*, 45, 82-92.
- Vita,P.M., Restelli,A., Caspani,P., Klinger,R., 1992.** *Minerva Medica*, 83, 135-139.
- Vuksan,V., Jenkins,D.J., Spadafora,P., Sievenpiper,J.L., Owen,R., Vidgen,E., Brighenti,F., Josse,R., Leiter,L.A., Bruce-Thompson,C., 1999.** Konjac-mannan (glucomannan) improves glycemia and other associated risk factors for coronary heart disease in type 2 diabetes. A randomized controlled metabolic trial. *Diabetes Care*, 22, 913-919.

- Vuksan,V., Sievenpiper,J.L., Xu,Z., Wong,E.Y.Y., Jenkins,A.L., Beljan-Zdravkovic,U., Leiter,L.A., Josse,R.G., Stavro,M.P.**, 2001. Konjac-mannan and American ginseng: Emerging alternative therapies for type 2 diabetes mellitus. *J. Am. Coll. Nutr.*, 20, 370S-380S.
- Wang,K., He,Z.M.**, 2002. Alginate-konjac glucomannan-chitosan beads as controlled release matrix. *Int. J. Pharm.*, 244, 117-126.
- Williams,M.A.K., Foster,T.J., Martin,D.R., Norton,I.T., Yoshimura,M., Nishinari,K.**, 2000. A molecular description of the gelation mechanism of konjac mannan. *Biomacromolecules*, 1, 440-450.
- Yang,G.A., Zhang,L.N., Yamane,C., Miyamoto,I., Inamoto,M., Okajima,K.**, 1998. Blend membranes from cellulose konjac glucomannan cuprammonium solution. *Journal of Membrane Science*, 139, 47-56.
- Ye,X., Kennedy,J.F., Li,B., Xie,B.J.**, 2006. Condensed state structure and biocompatibility of the konjac glucomannan/chitosan blend films. *Carbohydrate Polymers*, 64, 532-538.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo genérico del presente estudio es la evaluación de la utilidad del glucomanano de konjac (KGM), solo o en combinación con la goma xantano (XG), como excipiente de formas de dosificación de liberación modificada.

El trabajo se ha estructurado en cuatro etapas – coincidiendo cada una de ellas con el contenido de los capítulos 3 a 6 de esta memoria – en las que se pretende alcanzar los siguientes objetivos concretos:

- Caracterización de variedades comerciales de KGM de diferente origen geográfico. Se llevará a cabo la evaluación de las propiedades físico-químicas del polisacárido, en especial de aquellas de mayor incidencia sobre su funcionalidad como excipiente. En el estudio se incluirán tres variedades de KGM procedentes de las tres áreas geográficas contempladas por el IPEC (Internacional Pharmaceutical Excipients Council) en los procesos de armonización de excipientes.
- Caracterización de los procesos de difusión de macromoléculas en disoluciones y/o geles de KGM y de KGM/XG. La combinación de los datos de reometría de esfuerzo controlado y los obtenidos por aplicación de la

microscopía láser confocal unida a la técnica FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) sobre estos sistemas, deberán suministrar la información necesaria para alcanzar este objetivo. Se prestará una atención especial a la delimitación de las diferencias observadas en el comportamiento de las variedades de KGM seleccionadas para el estudio.

- Caracterización de los procesos de difusión de fármacos de reducido peso molecular y diferente carga neta en disoluciones y/o geles de KGM y KGM/XG. A través de la evaluación reológica de estos sistemas a temperatura corporal, se identificarán aquellos que dan lugar a geles de máxima consistencia y se delimitará su utilidad potencial como base de formas de dosificación de liberación controlada.
- Diseño y evaluación de formas de dosificación sólidas de liberación colónica. En esta etapa del estudio se caracterizará la degradabilidad por β -mananasas de los sistemas de KGM y KGM/XG, como punto de partida para el desarrollo de sistemas matriciales de liberación diferida activados, de forma específica, por enzimas colónicas.

**CARACTERIZACIÓN DE TRES
GLUCOMANANOS DE KONJAC DE
DIFERENTE ORIGEN GEOGRÁFICO**

3. CARACTERIZACIÓN DE TRES VARIEDADES DE GLUCOMANANO DE KONJAC DE DIFERENTE ORIGEN GEOGRÁFICO

3.1 Introducción

A pesar de que el KGM ha sido reconocido como producto GRAS por la FDA (Vuksan y cols. 2001) y del interés que las aplicaciones potenciales del KGM presentan en el ámbito de la tecnología farmacéutica, hasta el momento las farmacopeas europea y americana y el Handbook of Pharmaceutical Excipients no incluyen monografías de este producto. Esta situación hace aconsejable llevar a cabo una amplia caracterización de este polisacárido con el fin de identificar aquellas propiedades críticas en su funcionalidad.

Por otra parte, dadas las importantes diferencias encontradas en diversos estudios entre distintas variedades (Maekaji y Kawamura, 1985) de este tipo de excipientes, es aconsejable la inclusión en el estudio de KGMs de diferente origen geográfico que permita llevar a cabo una evaluación comparativa. De acuerdo con ello, para el presente estudio se han seleccionado tres variedades de KGM procedentes de las principales áreas geográficas representadas en la IPEC para la consecución de la

armonización de las especificaciones de numerosos productos de interés farmacéutico.

De este modo, el objetivo principal de esta etapa del estudio es llevar a cabo una caracterización lo más completa posible del KGM tanto desde el punto de vista fisicoquímico como funcional, prestando especial atención a la variabilidad intervariedad con vistas a su utilización como excipiente en tecnología farmacéutica (Moreton, 1996).

3.2 Materiales

Glucomanano de konjac, de origen europeo, suministrado por Escuder (lote 019), glucomanano de konjac de origen americano, suministrado por Triple Crown America Inc. (lote 3500C) y glucomanano de konjac de origen japonés, comercializado con la denominación de Propol A® (lote AKG07) suministrado por la compañía Shimizu Chemical Corporation.

3.3 Métodos

Clarificación de las materias primas

Para la realización de algunas pruebas, los productos comerciales se sometieron previamente a un proceso de clarificación que consta de las siguientes etapas:

Etapa 1

Preparación de dispersiones de glucomanano en agua destilada al 0,5 % p/v, mediante agitación mecánica (Ika Rw-20 DZM, Alemania) durante

30 minutos en un baño termostático a $75 \pm 1^\circ\text{C}$ (Precisdig, Selecta, España).

Etapa 2

Centrifugación de las dispersiones durante 15 minutos a 25000 g (Avanti 30, Beckmann, USA) para eliminar las partículas insolubles.

Etapa 3

Precipitación a temperatura ambiente del sobrenadante mediante adición de 2-propanol.

Etapa 4

Desecación del precipitado obtenido a 70°C en estufa, hasta peso constante.

Los glucomananos de konjac, como se suministraron o previamente sometidos al proceso de clarificación, fueron caracterizados mediante las técnicas y condiciones que se describen a continuación.

Examen organoléptico

Se evaluó el color y el olor de las muestras.

Peso molecular

Para la determinación del peso molecular de los KGMs se emplearon las técnicas de cromatografía de exclusión molecular y de viscosimetría capilar.

Cromatografía de exclusión molecular

La determinación de los pesos moleculares de los KGMs se llevó a cabo empleando cromatografía de exclusión molecular (GPC) en fase acuosa. Para ello, se inyectaron disoluciones acuosas de KGM, de una

concentración aproximada a 0,1 mg/mL en Na_2HPO_4 , 0,1M en un equipo Waters compuesto por un desgasificador, una bomba modelo 515, un inyector Rheodyne 7725i con bucle de 200 microlitros y un detector diferencial de refracción DRI 2400. Para la separación se emplearon una precolumna Suprema de 8 x 50 mm y dos columnas Suprema de 8 x 300 mm de 1000 y 3000 Å (PSS, Alemania) con un tamaño de partícula de 10 μm . Como fase eluyente se empleó Na_2HPO_4 con 100 ppm de NaN_3 a una velocidad de flujo de 1 mL/min, con una mínima cantidad de etilenglicol añadido a las muestras como patrón de flujo. El sistema de GPC se calibró mediante ajuste polinómico de tercer grado de los datos obtenidos con estándares de dextrano (American Polymer Standards Corp. Ohio, USA) con pesos moleculares medios comprendidos entre 3500 y 2200000 g/mol. La adquisición y evaluación de los datos se llevó a cabo mediante el programa WinGPC 7.0 (PSS, Alemania).

Viscosimetría capilar

Se determinó el peso molecular de cada una de las variedades de glucomanano de konjac utilizando medidas de viscosimetría capilar de disoluciones acuosas de los productos previamente clarificados. Las características de esta técnica hacen necesario este tratamiento previo de los materiales con el fin de eliminar las partículas insolubles en agua.

Se elaboraron, por triplicado, a partir de los productos clarificados, dispersiones diluidas de concentración creciente y se determinaron sus respectivas viscosidades cinemáticas a $25 \pm 0,5$ °C utilizando un viscosímetro capilar Cannon-Fenske rutina (Afora, Ref. 5354/2, España).

Para el cálculo de la viscosidad intrínseca a partir de los datos de viscosidad medidos sobre dispersiones diluidas, se acudió al modelo

matemático de Huggins (1942) que correlaciona viscosidad específica η_{sp} , concentración C y viscosidad intrínseca $[\eta]$, mediante la ecuación $\eta_{sp}/C=[\eta]+k'[\eta]^2C$ en la que k' representa la constante de Huggins.

El peso molecular se calculó mediante la ecuación de Mark-Houwink (Mark, 1938; Houwink, 1940) $[\eta]=K \cdot M^\alpha$ asignando a K y a α los valores de $3,8 \cdot 10^{-4}$ y de 0,723 obtenidos previamente por otros autores para el glucomanano de konjac en agua (Yang y col., 1998) a 25°C.

Análisis elemental

Se llevó a cabo mediante combustión dinámica instantánea (1030 °C) de muestras de KGM de, aproximadamente, 2 g. Se obtuvo su contenido porcentual de C, N, H y S utilizando un analizador elemental CARLO-ERBA, modelo 1108 (Italia).

Espectroscopía de infrarrojos

Se obtuvo el espectro IR de muestras de los glucomanos en comprimidos de KBr, en un equipo Bruker IFS-66 (Alemania) con transformada de Fourier, con una resolución de $0,25 \text{ cm}^{-1}$.

Porcentaje de acetilación y grado de sustitución

Muestras de aproximadamente 1 g de KGM se añadieron a 50 mL de una mezcla de etanol y agua al 75% v/v. La disolución se mantuvo en agitación mecánica a 50 °C durante 30 minutos, tras los que se dejó enfriar y, una vez adquirida la temperatura ambiente, se añadieron 40 mL de KOH (0,5N) bajo agitación moderada. Las disoluciones se mantuvieron a temperatura ambiente en recipientes cerrados durante 72 horas, sometidas a agitación ocasional. El exceso de álcali se valoró por retorno con ácido

clorhídrico 0,5 N usando fenolftaleína como indicador. Tras 2h en reposo se valoraron los posibles restos de álcali que quedaron retenidos en las muestras. Se valoró un blanco en paralelo (Laignel y cols. 1997).

El porcentaje de acetilación se determinó de acuerdo con ecuación propuesta por Laignel y cols. (1997):

$$\% \text{ acetilo} = 100 \times \frac{(V_a - V_b) \times N_{\text{HCl}} \times M_{\text{acetilo}}}{m_s}$$

donde V_a representa el volumen de HCl para el blanco en litros, V_b corresponde al volumen de HCl consumido por la muestra en litros, $N_{\text{HCl}}=0.5\text{N}$ es la normalidad del HCl, $M_{\text{acetilo}}=43$ g/mol y m_s el peso de la muestra de KGM en gramos.

El grado de sustitución (DS) se calcula a partir del porcentaje de acetilación de acuerdo con la ecuación:

$$DS = \frac{162 \times \% \text{ acetilo}}{(M_{\text{acetilo}} \times 100) - (M_{\text{acetilo}} - 1) \times \% \text{ acetilo}}$$

Estructura cristalina

Se evaluó mediante difracción de rayos X en un equipo Siemens D-5005 (Holanda), a temperatura ambiente, utilizando un ánodo de Cu ($\lambda_{\alpha 1}=1,54060$; $\lambda_{\alpha 2}=1,54439$). El intervalo de medida empleado fue 2-50 °2 θ a una velocidad de barrido de 0,004 °2 θ /min.

Densidad real

Se empleó un picnómetro de Helio Quantachrome MPY-2 (USA). Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se utilizó un equipo Shimadzu DSC-50 (Japón), en el que se dispusieron muestras de 2-3 mg en cápsulas de aluminio abiertas. Se aplicó, en atmósfera de aire, una velocidad de calefacción de 10 °C/min en el intervalo de temperaturas 25-300 °C.

Termogravimetría (TGA)

Se utilizó un equipo Shimadzu TGA-50 (Japón). Las muestras, de aproximadamente 4 mg, se colocaron en cápsulas de aluminio y se aplicó una velocidad de calefacción de 20 °C/min entre 25 y 250 °C.

Reología de las dispersiones

Se prepararon dispersiones acuosas de glucomanano de diferentes concentraciones hasta un máximo del 2% p/v de polisacárido en agua destilada. Para ello los sistemas se mantuvieron en agitación mecánica a 400 rpm (Ika Rw-20 DZM, Alemania) durante una hora a una temperatura de 85 °C ± 1 °C en un recipiente hermético para evitar la pérdida de agua por evaporación. Las dispersiones se dejaron enfriar y se mantuvieron en reposo a temperatura ambiente durante 12 horas para permitir una hidratación completa del glucomanano.

La evaluación reológica se llevó a cabo, por duplicado, a 37 °C en un reómetro Rheolyst AR-1000N (TA Instruments, Reino Unido), empleándose, como elemento de medida, un cono de 6 cm de diámetro.

Viscosimetría Rotacional

Se determinó la viscosidad para velocidades de cizalla comprendidas entre los valores de velocidad mínimos estables instrumentalmente posibles, y 1000 s⁻¹.

Los resultados obtenidos se ajustaron a los modelos newtoniano, de Ostwald-de Waele (de Waele, 1923; Ostwald, 1925), de Carreau (Carreau, 1972), Cross (Cross, 1965), Sisko, Williamson, y de Ellis (Bird y col., 1977; Barnes y col., 1989; Carreau y col., 1997).

Propiedades viscoelásticas

El comportamiento viscoelástico de las dispersiones de polímero se evaluó, por duplicado, en ensayos de cizalla oscilatoria. En primer lugar, para cada concentración, se determinó el intervalo de viscoelasticidad lineal mediante barridos de torsión de oscilación a una frecuencia de oscilación intermedia de 1 rad/s.

A continuación, se determinó el espectro mecánico de cada una de las dispersiones en un intervalo de frecuencias de 0,1 a 100 rad/s, empleando en todos los casos, un porcentaje de deformación comprendido en el intervalo de viscoelasticidad lineal previamente determinado.

Sorción de agua

Se evaluó la higroscopicidad de los glucomananos determinando la captación de agua mediante un analizador gravimétrico de sorción (DVS-1000 Water Sorption Instrument, Surface Measurement Systems Limited, London, UK). Las muestras, con un peso de 5-10 mg, se secaron inicialmente en un ambiente de 0% de humedad relativa (HR) a 25 °C. A continuación, la humedad relativa se incrementó a intervalos del 10%, considerando que la muestra alcanzó el equilibrio cuando la variación de su masa fue inferior a 0,00050% por minuto en un intervalo de 10 minutos. La cantidad de agua captada se expresa como el porcentaje de incremento de peso con respecto a la masa de la muestra seca.

Propiedades de las partículas

Morfología de las partículas

Para la caracterización morfológica de las partículas se utilizó un microscopio electrónico de barrido 435 VP dotado de un detector QBSD (LEO, Reino Unido). Se obtuvieron fotomicrografías, previa metalización de las muestras en baño de oro/paladio.

Análisis granulométrico

Se obtuvieron las distribuciones de tamaños de partícula para las diferentes variedades de KGM por tamización de muestras de 25g, utilizando catorce tamices de entre 0,03 y 1,40 mm de abertura de malla (CISA, España). Los correspondientes ajustes a una distribución normal o logarítmico normal permitieron determinar, en cada caso, el diámetro medio de partícula y su correspondiente desviación estándar.

Propiedades de flujo

Para llevar a cabo la caracterización reológica de los KGM pulverulentos se determinaron, por triplicado, los valores de ángulos de reposo, de caída y de espátula y los porcentajes de dispersabilidad y de compresibilidad (20 min. a 50 golpes/min), en un aparato Hosokawa Powder tester PT-E (Japón). A partir de los resultados experimentales, se calcularon los índices de Carr de "floodability" y de "flowability" (Carr, 1965).

Conducta de compresión

Las características de compresión de los glucomananos se evaluaron preparando compactos de 9 mm de diámetro y 300 mg de peso en una

máquina de comprimir excéntrica instrumentalizada Bonals, (modelo B tipo MT España) (Martínez-Pacheco y col., 1985). La velocidad de compresión fue de 8 ciclos/min. a una presión máxima de 250 MPa.

3.4 Resultados y discusión

La evaluación de las propiedades organolépticas, color y olor de los productos (Tabla 3.1), permitió poner de manifiesto la existencia de grandes diferencias entre las variedades estudiadas, sin duda derivadas del tipo de tubérculo utilizado como materia prima y/o del procedimiento seguido para su extracción (Takigami y Phillips, 1995).

Origen	Color	Olor
Japonés	Blanco con algunas partículas negras	Alcohol
Europeo	Amarillo no uniforme	Pescado (fuerte)
Americano	Marrón uniforme	Pescado (ligero)

Tabla 3.1- Características organolépticas de los KGMs.

En función de su aspecto, y dado que el color blanco se asume como indicativo de calidad (Peiying y col., 2002), el producto japonés se presenta como el material de mayor pureza, si bien hay que señalar la presencia en él de pequeñas partículas de color negro de origen y naturaleza indeterminados.

El olor a pescado más o menos intenso de las otras dos variedades debe atribuirse a deficiencias en el proceso de extracción (Takigami y Phillips, 1995).

Las diferencias en el aspecto de los KGM prácticamente se eliminan cuando se someten al proceso de clarificación aplicado en nuestro

laboratorio. Así, en todos los casos se obtuvieron productos clarificados de color blanco sin olor apreciable.

El análisis elemental llevado a cabo con muestras de los glucomananos, antes y después del proceso de clarificación (Tabla 3.2), ratifica los comentarios anteriores. La proporción C/H, para todas las muestras de glucomanano, resultó ligeramente inferior a la calculada teóricamente para este producto ($C_6H_{10}O_5$) (Maeda y col., 1980). Como puede observarse (Tabla 3.2), en el caso de las variedades europea y americana, se detecta un porcentaje significativo de N que se ha atribuido a un pequeño contenido de alcaloides, restos proteicos y también, como han señalado algunos autores (Takigami y Phillips, 1995; Kimura y col., 2001), a la presencia de trietilamina y dietilamina derivadas del tratamiento alcalino al que se somete la harina de konjac en el proceso de extracción del glucomanano. Estos compuestos, que proporcionan el característico olor a pescado, son eliminados mayoritariamente con el proceso de clarificación al que se sometieron las muestras.

Otro aspecto destacable es la presencia de azufre en la muestra de glucomanano de origen europeo. El azufre es una impureza común en las harinas de konjac, derivada de su proceso de obtención. El secado de los tubérculos se realiza habitualmente mediante aire caliente producido por la combustión de carbones y de aceites pesados, lo que da lugar a una contaminación con SO_2 . Además, en los procesos de blanqueo también se emplean compuestos sulfurados (Takigami y Phillips, 1995).

Origen	% C	%H	%N	%S	C/H
Japonés	43,80	6,97	0,01	-	6,28
Europeo	41,80	6,42	0,64	0,27	6,51
Americano	42,93	6,68	0,83	-	6,43
Japonés-C	41,99	6,25	-	-	6,72
Europeo-C	43,23	6,36	-	-	6,80
Americano-C	40,14	6,14	0,01	-	6,54

Tabla 3.2.- Resultados del análisis elemental llevado a cabo con las muestras de glucomananos, antes y después (-C) del proceso de clarificación.

La espectroscopía de infrarrojos (IR) es una técnica muy útil para la identificación y caracterización de polisacáridos. A este respecto, los análisis de espectroscopía IR (Figura 3.2) indican que, para todas las variedades analizadas, el espectro coincide con el descrito por otros autores para el glucomanano de konjac (Jacon y col., 1993; Zhang y col., 2001). El estudio de la región de la huella dactilar de los productos (entre 960 y 730 cm^{-1}) permite afirmar que se trata de un polisacárido formado por unidades de glucosa y manosa unidas mediante enlaces beta, ya que, a la presencia de una débil banda de absorción a 894 cm^{-1} , se une la ausencia de otra a 840 cm^{-1} indicativa de productos que contienen únicamente derivados de β -glucopiranososa y, adicionalmente, aparecen bandas a 876 y 893 cm^{-1} características de los derivados de β -manopiranososa (Tipson, 1968).

La principal diferencia observada entre los espectros IR de los tres materiales es la ausencia, en el glucomanano americano, de la banda de absorción a 1733 cm^{-1} presente en las otras dos variedades. Esta banda, según algunos autores (Nishinari y col., 1992), se debe a la existencia de grupos acetilo en su estructura, que a su vez se ha relacionado con la

hidrosolubilidad (Dea y col., 1977; Brownsey y col., 1988), la capacidad de absorción de agua (Koroskenyi y McCarthy, 2001) y de formación de geles de los KGMs (Maekaji, 1974).

La clarificación de los productos mejora la resolución de los espectros de infrarrojo y corrobora las afirmaciones anteriores.

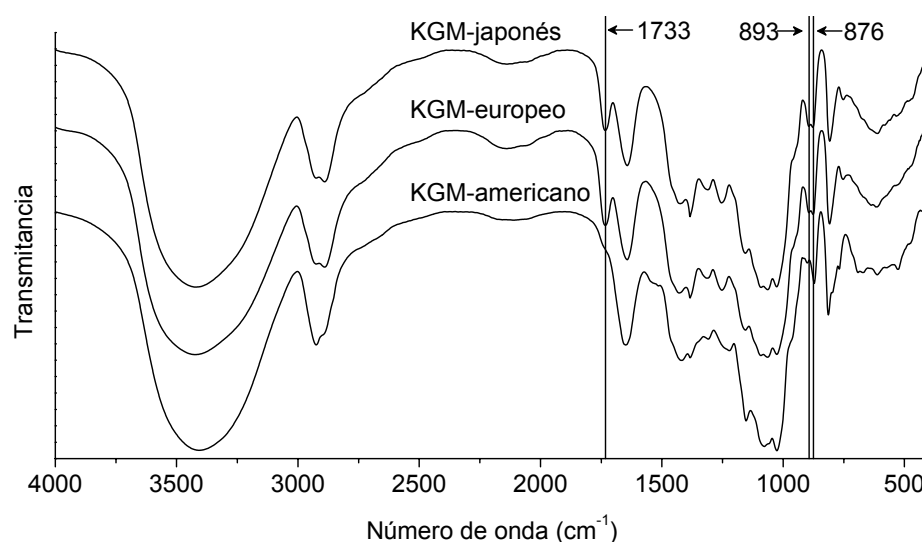


Figura 3.2.- Espectros de infrarrojos correspondientes a cada uno de los glucomananos analizados.

Las diferencias en el grado de acetilación sugeridas por la interpretación de los espectros de infrarrojos se cuantificaron mediante el método propuesto por Laignel y cols. (1997) que permite determinar colorimétricamente el porcentaje de acetilación y el grado de sustitución del producto. Los resultados obtenidos para los tres KGMs estudiados se resumen en la tabla 3.3.

	% Acetilación	DS
KGM- japonés	1,863 (0,271)	0,07 (0,01)
KGM- europeo	4,336 (0,271)	0,17 (0,01)
KGM- americano	0,645 (0,124)	0,02 (0,00)

Tabla 3.3. Porcentaje de acetilación y grado de sustitución de las tres variedades de KGM.

Estos resultados muestran que la variedad americana presenta un grado de sustitución muy bajo: tan solo 1 de cada 50 residuos monosacáridicos incorpora un grupo acetilo. En el caso del KGM japonés el resultado coincide con los encontrados por otros autores que han estimado el grado de sustitución del KGM entre 0,05 y 0,10 (Maekaji, 1978; Koroskenyi y McCarthy, 2001). El KGM-europeo presenta el mayor grado de sustitución de las tres variedades estudiadas con, aproximadamente un grupo acetilo presente cada 6 residuos monosacáridicos de la cadena del esqueleto del KGM.

A la luz de los resultados obtenidos es previsible que la variedad americana, que presenta un contenido de grupos acetilo claramente menor, presente propiedades diferentes a las de las otras variedades con un grado de acetilación muy superior en lo que se refiere a solubilidad y a capacidad de formación de geles.

Los termogramas de DSC (Figura 3.3) mostraron, para todos los productos, una endoterma por debajo de 100 °C debida a la pérdida de agua no fuertemente unida. Al mismo tiempo, pusieron de manifiesto la elevada resistencia a la temperatura de estos productos, dado que su descomposición se produce, en todos los casos, por encima de 200 °C.

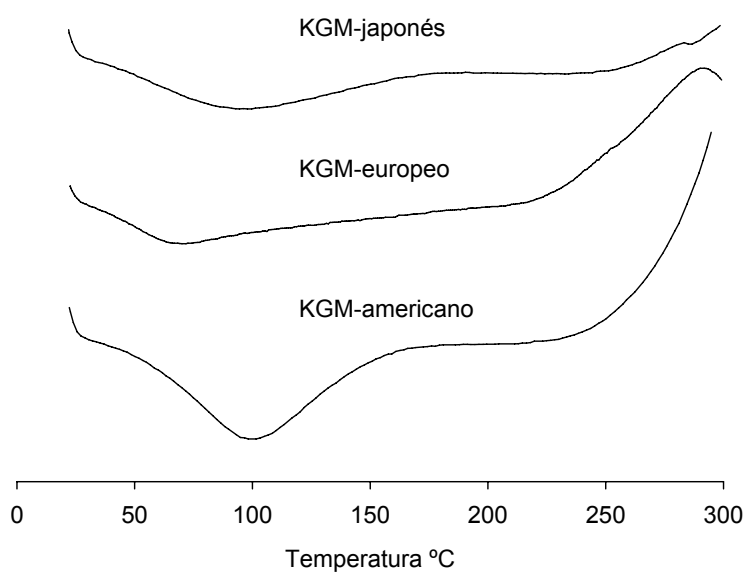


Figura 3.3.- Termogramas de DSC obtenidos para los gluomananos de konjac objeto de estudio.

En los difractogramas de rayos X (Figura 3.4) se observa un pico ancho a, aproximadamente, $20^\circ 2\theta$ característico de este tipo de polisacáridos, sin que se detecten, en ninguna de las variedades, los picos a $15^\circ 2\theta$, $24^\circ 2\theta$ y $30^\circ 2\theta$ indicativos de la presencia de gluomanano en estado cristalino (Yu y col., 2006). Estos resultados ponen de manifiesto la naturaleza amorfa de los tres productos estudiados (Nishinari y col., 1992; Dave y col., 1998).

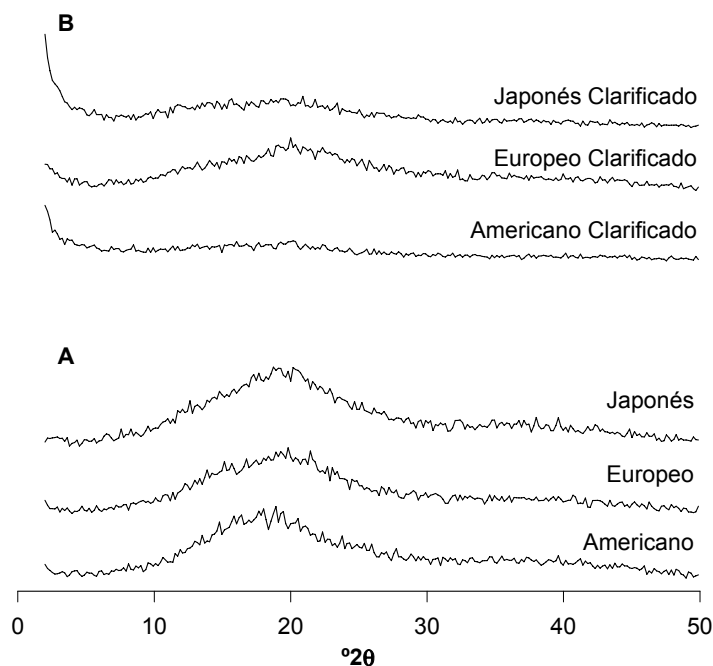


Figura 3.4.- Espectros de difracción de rayos X obtenidos para los tres glucomananos antes (A) y después (B) del proceso de clarificación.

La interacción del agua con los glucomananos se evaluó mediante la técnica de captación dinámica de agua (DVS). La captación estática de agua no resulta útil para este tipo de polisacáridos debido a que, en ambientes de elevada humedad relativa, resultan excelentes medios de cultivo para un gran número de microorganismos. A pesar de que en los ensayos de DVS se emplean cantidades pequeñas de muestra (10 mg), como consecuencia de la marcada hidrofilia de los productos, la duración de los análisis resultó prolongada, entre 3 y 4 días. Los contenidos iniciales de agua se situaron en valores de 4,88, 8,20, y 11,01% para los glucomananos japonés, europeo y americano, coincidiendo con los resultados obtenidos mediante TGA (Tabla 3.7). El comportamiento

posterior de los KGMs en ambientes de diferente humedad relativa (Figura 3.5) fue similar para las tres variedades, dando lugar a perfiles ligeramente sigmoidales en los que aumenta la cantidad de agua captada de modo progresivo al incrementar la humedad relativa ambiental. Los contenidos de agua en equilibrio entre 10 y 70% de H.R. se ordenan de modo inverso al tamaño de partícula (Tabla 3.7), probablemente debido a la diferente superficie específica de los productos.

Las diferencias más importantes entre las tres variedades se detectaron para la humedad relativa del 90% a la que, para los glucomananos europeo y americano, se obtienen valores de contenido en humedad del 40 y el 38%, respectivamente, en tanto que para el glucomanano japonés es de tan solo el 25%. Los perfiles obtenidos son similares a los encontrados por Cheng y col. para films de KGM (Cheng y col., 2002; Cheng y col., 2007), si bien en el caso de los films el contenido máximo de humedad no supera el 20%. Esta importante captación de agua está relacionada con la elevada superficie de exposición de los KGM en estado pulverulento. Este hecho, unido a su elevada hidrofilia y al estado amorfo de los glucomananos estudiados (corroborado mediante estudios de rayos X), aconsejan la adopción de precauciones para su almacenamiento durante periodos de tiempo prolongados.

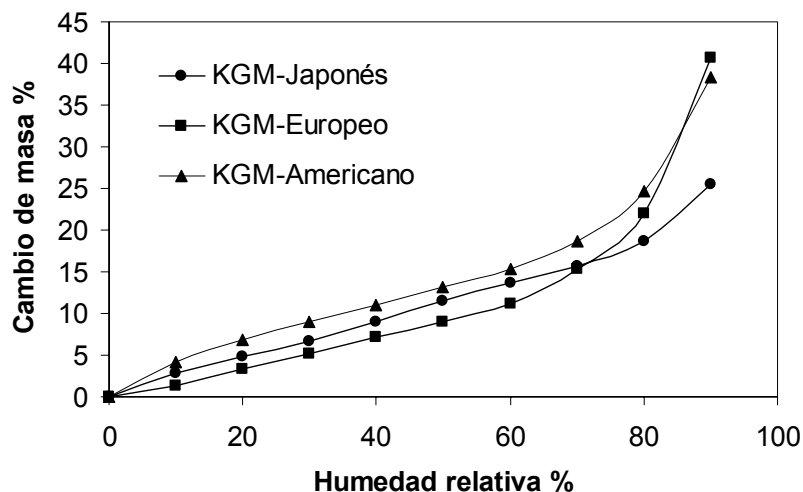


Figura 3.5. Isotermas de sorción de agua a 25 °C de los tres glucomananos.

Los valores de peso molecular medio (Figura 3.6) obtenidos mediante GPC para los glucomananos japonés, europeo y americano fueron de $4,7 \cdot 10^6$, $5,3 \cdot 10^6$ y $5,4 \cdot 10^6$ Da, respectivamente; muy similares, por tanto, para las tres variedades, observándose, en el caso de los productos japonés y americano, una distribución ligeramente más abierta del intervalo de pesos moleculares.

La determinación del peso molecular de los productos clarificados fue posible mediante viscosimetría capilar. La Figura 3.7 representa los ajustes al modelo de Huggins $\eta_{sp}/C = [\eta] + k'[\eta]^2C$ (Huggins, 1942) de los valores de la viscosidad cinemática de series de dispersiones acuosas diluidas de los glucomananos.

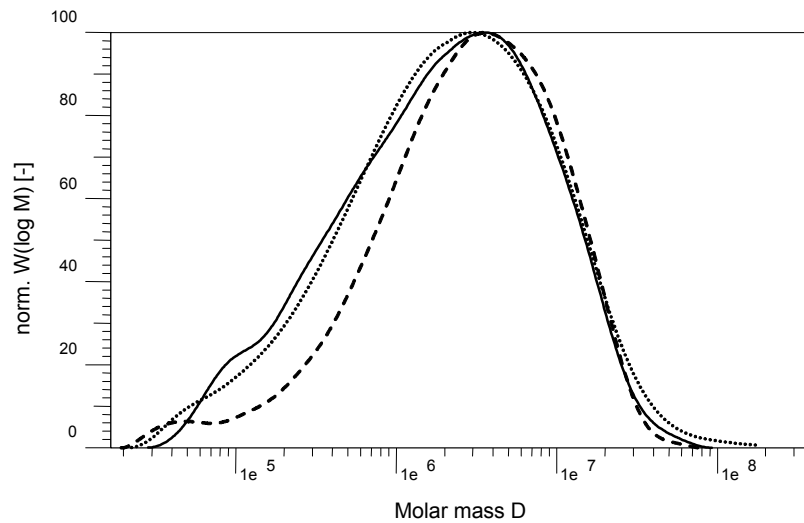


Figura 3.6. Pesos moleculares medios obtenidos mediante GPC para los glucomananos japonés (—), europeo (-----) y americano (.....) a 25 °C en Na_2HPO_4 0,1M.

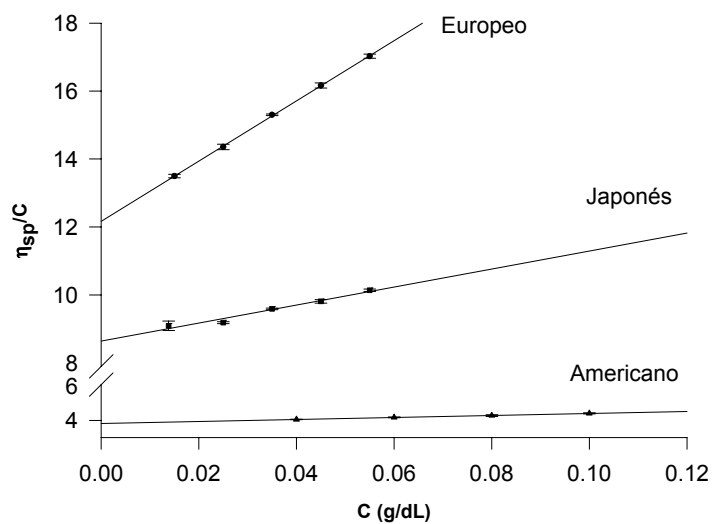


Figura 3.7.- Valores de viscosidad reducida de las dispersiones diluidas respecto de su concentración, para cada una de las variedades de glucomanano objeto de estudio.

Hay que señalar que, en el caso de la variedad americana, se observa una pérdida de linealidad cuando se utilizan las concentraciones más diluidas. Este fenómeno, observado por algunos autores (Maeda y col., 1980; Nishinari y col., 1992), se asocia a la presencia de grupos iónicos (ácido glucurónico o fosfato) como residuos en la molécula de glucomanano. Para obviar el problema, con este producto se utilizaron concentraciones más elevadas, en un intervalo en el que se comprobó la existencia de una relación lineal entre ambas variables.

Para el cálculo de la viscosidad intrínseca $[\eta]$ y los correspondientes pesos moleculares medios \overline{M}_v (Tabla 3.4), se utilizaron los parámetros obtenidos por Yang y colaboradores (1998) para dispersiones acuosas de glucomanano de konjac a 25 °C ($K=3,8 \cdot 10^{-4}$ y $\alpha = 0,723$)

Origen	k'	r^2	$[\eta]$ (dL/g)	\overline{M}_v
KGM-americano	0,402	0,999	3,825	$3,4 \cdot 10^5$
KGM-europeo	0,599	0,999	12,167	$1,7 \cdot 10^6$
KGM-japonés	0,354	0,968	8,644	$1,1 \cdot 10^6$

Tabla 3.4.- Resultados del ajuste de los valores de viscosidad reducida de las dispersiones diluidas al modelo de Huggings (k' y r^2) y valores de viscosidad intrínseca $[\eta]$ y de peso molecular medio \overline{M}_v de los KGM objeto de estudio.

Las discrepancias observadas en la estimación de los pesos moleculares de los KGMs por GPC y por viscosimetría capilar pueden atribuirse a las limitaciones de ambas técnicas.

Por una parte, la necesidad de aplicar la clarificación, como proceso previo a la determinación del peso molecular mediante viscosimetría

capilar, podría dar lugar a una precipitación selectiva de determinadas fracciones moleculares para cada variedad de glucomanano.

Por otra parte, los pesos moleculares obtenidos mediante GPC se han establecido mediante comparación con dextranos y, por tanto, deben ser considerados como pesos moleculares equivalentes de dextrano.

La diversidad encontrada en los valores obtenidos de peso molecular medio mediante viscosimetría capilar corrobora las observaciones de Kiriya y colaboradores (1972). Estos autores evaluaron un elevado número de muestras de glucomanano de konjac, y encontraron diferencias significativas en los valores de peso molecular de productos obtenidos, no sólo de especies diferentes, sino también de cultivos procedentes de distintas localizaciones geográficas.

El peso molecular se considera un índice de la calidad del KGM (Kishida, 1979) ya que juega un papel importante en las características del proceso de gelificación de estos productos y en las características de sus geles. Así, las muestras de glucomanano de konjac de elevado peso molecular experimentan procesos de gelificación lentos, dando lugar a geles estables, mientras que los glucomananos de bajo peso molecular gelifican a mayor velocidad, pero los geles obtenidos sufren procesos de sinéresis (Zhang y col., 2001). De acuerdo con estas observaciones y los resultados obtenidos por viscosimetría capilar, la variedad de origen americano debe dar lugar a geles poco estructurados, mientras que las procedentes de Europa y de Japón formarán geles más resistentes y estables.

Como se ha indicado en la introducción de esta memoria, el KGM es uno de los polisacáridos con mayor capacidad viscosizante, característica

que además se emplea como criterio de evaluación de la calidad del producto. Con el fin de obtener la mayor información posible desde el punto de vista de la funcionalidad de estos productos en el ámbito de la tecnología farmacéutica (posibles aplicaciones como agentes estabilizantes de suspensiones y emulsiones o formadores de matrices o geles), se llevó a cabo una amplia caracterización reológica de los KGMs a temperatura fisiológica, puesto que en la bibliografía apenas se dispone de este tipo de datos obtenidos a 37°C.

La caracterización reológica de las disoluciones de cada una de las variedades de KGM se inició mediante el estudio de sus propiedades de flujo (Figura 3.8).

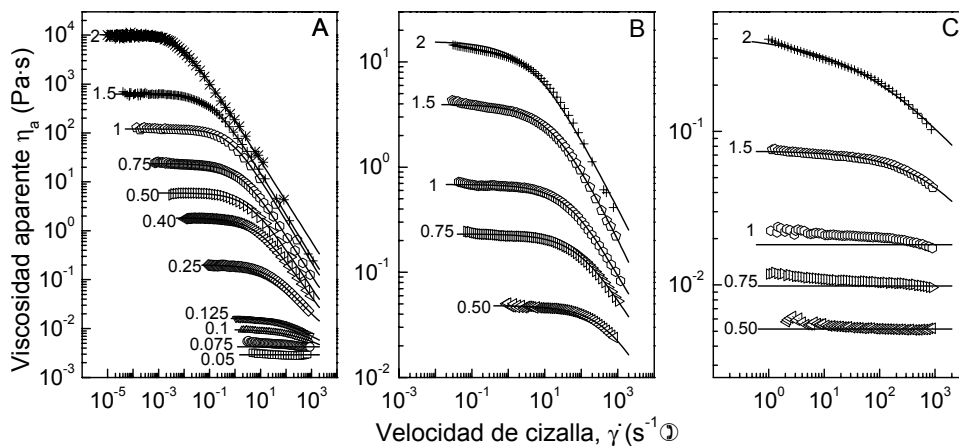


Figura 3.8. Viscosidad aparente vs velocidad de cizalla para dispersiones de (A) KGM japonés a concentraciones comprendidas entre 0,05 y 2% y de (B) KGM europeo y (C) americano entre 0,5 y 2% a 37°C. Las líneas representan el ajuste al modelo newtoniano o al de Cross.

El ajuste de los datos obtenidos mediante viscosimetría rotacional a diversos modelos matemáticos mostró, para las tres variedades, los mejores resultados con el modelo newtoniano - en el caso de los reogramas de dispersiones de KGM a baja concentración- y para el modelo de Cross (1965) - en el caso de dispersiones de KGM de concentraciones elevadas- (Tabla 3.5).

Origen KGM	Concentración (g/dL)	η_0 (Pa·s)	K (s^m)	Índice de fluidez	Error
Japonés	0,05	0,0029			5,351
	0,075	0,0042			13,265
	0,1	0,0093	0,003	0,777	7,630
	0,125	0,0162	0,004	0,719	6,685
	0,25	0,210	0,029	0,747	3,597
	0,4	1,887	0,142	0,751	1,483
	0,5	5,651	0,286	0,779	3,550
	0,75	21,415	0,553	0,824	3,927
	1	79,345	1,171	0,850	5,348
	1,5	670,550	8,146	0,828	5,891
Europeo	2	11875,000	165,900	0,822	6,909
	0,5	0,046	0,003	0,953	5,739
	0,75	0,226	0,006	0,779	4,003
	1	0,680	0,014	0,802	2,086
	1,5	3,912	0,051	0,738	6,253
Americano	2	13,805	0,120	0,757	11,045
	0,5	0,0052			2,410
	0,75	0,0098			0,010
	1	0,0180			16,565
	1,5	0,076	0,001	0,666	16,365
	2	0,413	0,011	0,477	18,755

Tabla 3.5. Valores obtenidos en el ajuste de los reogramas de los glucomananos a los modelos newtoniano y de Cross.

Los resultados obtenidos para la variedad de glucomanano de origen japonés revelan que este polisacárido presenta una capacidad viscosizante muy elevada. Debido a la notable viscosidad que es capaz de conferir al

medio, el intervalo de concentraciones en el que es posible determinar su viscosidad (0,05-2%) es más amplio que para los otros dos KGMs (0,5-2%).

A partir de los datos de viscosimetría de cizalla de equilibrio se observó que el glucomanano japonés da lugar a dispersiones con comportamiento newtoniano para concentraciones inferiores al 0,1% (Figura 3.8). Por el contrario, para concentraciones iguales o superiores a este valor se observa un comportamiento pseudoplástico en el que, a medida que se incrementa la concentración, se reduce la velocidad de cizalla crítica y, por tanto, el intervalo en el que la dispersión muestra un comportamiento newtoniano. La bondad del ajuste de los datos experimentales a estos modelos (Tabla 3.5) permite estimar el valor de viscosidad en el caso de soluciones newtonianas, y los valores de consistencia, fluidez y viscosidad en reposo de las dispersiones de KGM que presentan un comportamiento pseudoplástico (Tabla 3.5).

La menor capacidad viscosizante de las variedades de KGM de origen europeo y americano (Figura 3.8) con respecto a la de origen japonés imposibilita su estudio mediante viscosimetría rotacional a concentraciones inferiores al 0,5%.

En el intervalo de concentraciones 0,5-2% p/v, las dispersiones de la variedad de glucomanano de origen europeo, muestran invariablemente un comportamiento pseudoplástico (Figura. 3.8B), recogiendo en la Tabla 3.5 los parámetros característicos de estas dispersiones.

Los resultados de las determinaciones de viscosimetría de cizalla para la variedad americana, llevadas a cabo en el mismo intervalo que para la variedad europea, se recogen en la Figura 3.8C. En ella se puede

observar para las dispersiones de concentraciones más bajas un comportamiento newtoniano, que evoluciona lentamente a pseudoplástico al aumentar la concentración, lo que se refleja en un progresivo incremento del término error del ajuste a este modelo (Tabla 3.5). Para concentraciones iguales o superiores a 1,5 g/dL el comportamiento es de tipo pseudoplástico y, una vez más, es el modelo de Cross (1965) el que describe su comportamiento de forma más adecuada.

Para eliminar la influencia de la viscosidad del disolvente sobre los valores de viscosidad a bajas concentraciones de polímero, se emplea la viscosidad específica, $\eta_{sp}=(\eta - \eta_0)/\eta_0$ en la que η_0 para el agua a 37°C toma el valor de 0,6915 mPa·s (Weast y col., 1990).

Si se representan los valores de viscosidad específica frente a concentración para el glucomanano japonés (Figura 3.9A) se obtienen dos regiones lineales separadas, para los regímenes diluido y concentrado, característicos de numerosas dispersiones poliméricas (Morris y col., 1981). El empleo de la regresión lineal permite conocer las ecuaciones que definen cada una de las regiones, obteniéndose valores de 2,08 y 4,37 para las respectivas pendientes. El punto de cruce de estas zonas lineales nos permite calcular la concentración a la que se produce el cambio de régimen (C^*). El valor de C^* estimado para el glucomanano japonés es de 0,14 g/dL, similar a los estimados por otros autores a temperatura de 25 °C (Ratcliffe y col., 2005).

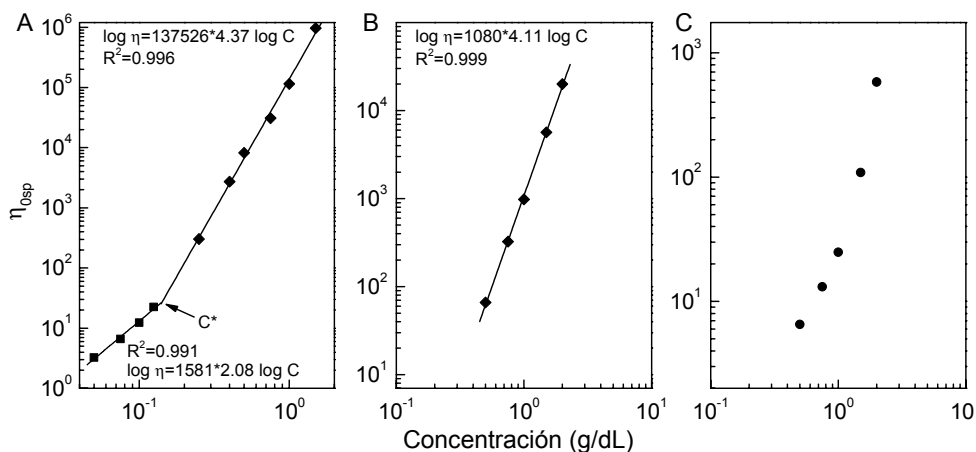


Figura 3.9. Determinación de la concentración C^* mediante la aproximación doble logarítmica.

Para concentraciones inferiores a 0,14 g/dL del KGM japonés, nos encontramos en la zona diluida en la que apenas existe contacto entre las cadenas de KGM. Por encima de este valor de concentración de KGM los contactos entre las cadenas polisacáridicas originan un rápido incremento de la viscosidad. De este modo, doblar la concentración en la zona diluida supone cuadruplicar la viscosidad. El mismo incremento en la zona concentrada, implica una viscosidad 20 veces superior.

Mediante representación doble logarítmica y posterior regresión lineal de los valores de viscosidad específica respecto a concentración se obtiene, para el KGM europeo (Figura. 3.9B), una pendiente de 4,11, próxima a la obtenida para la zona concentrada del glucomanano japonés. Este hecho es indicativo de que todas las dispersiones a las que da lugar esta variedad de KGM en el intervalo de concentraciones estudiadas (0,5-2%), se encuentran por encima de la C^* .

El efecto que produce el aumento de la concentración en la viscosidad específica para la variedad americana se muestra en la Figura

3.9C. En este caso no es posible obtener un buen ajuste doble logarítmico mediante regresión lineal entre viscosidad específica y concentración de KGM ($R^2=0.94$). Además, el valor de la pendiente (3,18) no corresponde a los valores encontrados ni para la zona diluida ni para la concentrada de las otras variedades.

Los valores de pendiente (2,0) obtenidos para el régimen diluido en el KGM japonés son ligeramente superiores a los valores recogidos en la bibliografía (1,4, 1,7) mientras que los obtenidos para el régimen concentrado en el caso de las variedades japonesa y europea son similares a los referenciados por otros autores de 3,98 y de 4,3 (Jacon y col., 1993; Ratcliffe y col., 2005).

El motivo por el cual la pendiente obtenida para la variedad americana no se corresponde a las encontradas para las regiones diluida y concentrada de las otras variedades de KGM puede atribuirse a que el intervalo de concentraciones objeto de estudio se sitúa en la zona de transición entre las regiones diluida y concentrada de esta variedad, hecho que se ve apoyado por el deficiente ajuste lineal de la pendiente.

La Figura 3.10 incluye una tabla comparativa de los valores de viscosidad que confieren al medio cada uno de los KGM a diferentes concentraciones y, a modo de ejemplo, los reogramas de flujo de éstos a la concentración de 0,5%.

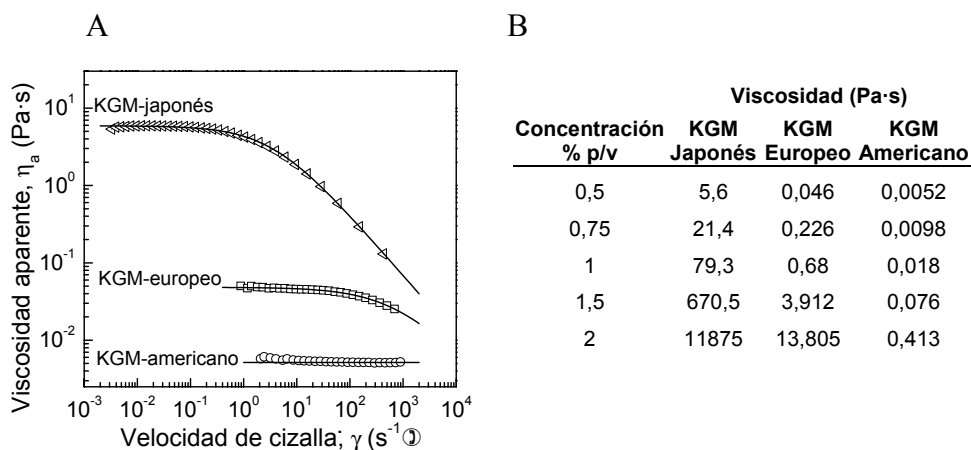


Figura 3.10. (A) Evolución de los valores de viscosidad aparente en función de la velocidad de cizalla para dispersiones al 0,5% de KGM japonés, europeo y americano a 37 °C. La línea continua representa el ajuste al modelo newtoniano o al de Cross. (B) Tabla comparativa de la viscosidad que confiere al medio cada una de las tres variedades de KGM.

Las diferencias en los reogramas de flujo tanto de carácter cualitativo como cuantitativo para las tres variedades resultan claramente apreciables. En cuanto al primer aspecto, se observa que el glucomanano americano es el único que da lugar a dispersiones con un comportamiento newtoniano en el intervalo de concentraciones objeto de estudio (0,5-2%), en tanto que los glucomananos europeo y japonés muestran un claro comportamiento pseudoplástico en ese intervalo de concentraciones. Por otra parte, sus capacidades viscosizantes son muy diferentes (Figura 3.10B). Así, a bajas concentraciones, las diferencias encontradas son de tres órdenes de magnitud, aumentando éstas a medida que lo hace la

concentración de KGM, llegando a superar los cuatro órdenes de magnitud a las concentraciones más elevadas.

Si se acepta que la capacidad viscosizante del KGM es un parámetro indicativo de su calidad (Takigami y Phillips, 1995), los resultados de los ensayos realizados permiten concluir que existen grandes diferencias entre los KGMs suministrados por los tres proveedores. El KGM de origen japonés podría considerarse, de acuerdo con Peiying y col. (2002), como el de mayor calidad ya que sus dispersiones al 1% proporcionan 79 Pa·s (Figura 3.10B), valor muy superior a los 22 Pa·s de referencia. Por el contrario los KGM europeo y americano presentan calidades claramente inferiores (Figura 3.10B), especialmente este último cuyas dispersiones al 1% apenas proporcionan 18 mPa·s (aproximadamente 4000 veces menos que KGM japonés). Estas diferencias deben atribuirse a la variable naturaleza de los tubérculos, a sus condiciones de cultivo (Kishida, 1979; Maekaji y Kawamura, 1985) o a los procesos de extracción, purificación y mezclado de harinas de KGM empleados por los fabricantes (Takigami y Phillips, 1995).

La caracterización de las dispersiones de los glucomananos se completó con el estudio de su comportamiento como sistemas viscoelásticos.

Los espectros mecánicos obtenidos para dispersiones de los tres KGM (0,5-2%) se muestran en la figura 3.11.

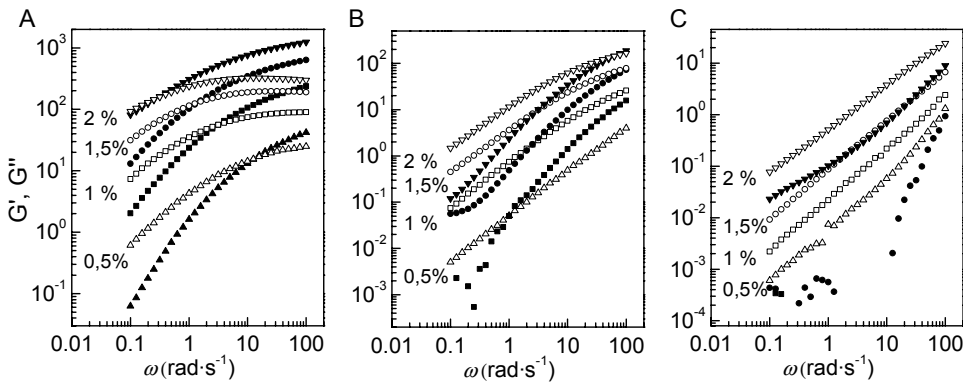


Figura 3.11. Dependencia de los valores módulo elástico (G' , símbolos cerrados) y viscoso (G'' , símbolos abiertos) respecto de la frecuencia angular, para las dispersiones de KGM japonés (A), europeo (B) y americano (C).

Los perfiles experimentales del KGM de origen japonés (Figura 3.11A), son similares a los obtenidos previamente por Nishinari (2000). En estos espectros puede observarse, además, que el aumento de la concentración de KGM produce el típico desplazamiento de los perfiles de la región viscosa o terminal del espectro mecánico a la región de transición al flujo (1,0- 1,5%), para terminar (2 %) entre la región de transición al flujo y la región gomosa o constante (Barnes, 2000). En estos espectros se puede observar que el módulo viscoso prevalece sobre el elástico a bajas frecuencias, sin embargo, la mayor pendiente de éste último da lugar al entrecruzamiento de ambos módulos a frecuencias mayores, llegando a predominar claramente durante buena parte del espectro correspondiente a las dispersiones concentradas.

El entrecruzamiento de los módulos G' y G'' , permite conocer el tiempo de vida media o tiempo de relajación de las uniones del entramado

polimérico (Picton y Muller, 1996). En la Tabla 3.6 se recogen los tiempos de relajación para las distintas concentraciones de KGM japonés.

Concentración %	Tiempo de relajación (s)
0,5	0,072 (0,004)
1	0,338 (0,036)
1,5	0,771 (0,081)
2	3,362 (0,691)

Tabla 3.6. *Tiempos de relajación de las dispersiones de glucomanano japonés y sus desviaciones estándar (entre paréntesis).*

El aumento de los tiempos de relajación con la concentración es indicativo de un incremento del tiempo que los enlaces entre las cadenas de KGM son capaces de almacenar energía, y por tanto del carácter elástico de estos sistemas.

Para el glucomanano europeo (Figura 3.11 B), los valores obtenidos de módulo elástico y viscoso fueron claramente inferiores a los de la variedad japonesa (Figura 3.11A y 3.12). A la concentración más baja estudiada (0,5%) no es posible detectar el módulo elástico, apareciendo únicamente el módulo viscoso. A medida que aumenta la concentración de polisacárido se incrementa el valor de G' y los sistemas adquieren mayor carácter viscoelástico. Sin embargo, el módulo elástico sólo llega a sobrepasar al viscoso a las frecuencias más elevadas para la concentración del 2 % lo que indica que esta variedad presenta tiempos de relajación muy pequeños (inferiores a 0,02 s).

La variedad americana (Figura 3.11 C) da lugar a espectros mecánicos cuyos valores de G' y de G'' son inferiores a los de la variedad europea. En ellos destaca el hecho de que el módulo elástico G' solo se detecta para las concentraciones más elevadas (1,5-2%) de polímero.

Incluso a la mayor concentración estudiada (2%), los valores de módulo elástico no superan a los de módulo viscoso, lo que indica un claro predominio del comportamiento viscoso para todas las condiciones estudiadas con esta variedad de glucomanano.

Al igual que en el caso de los ensayos de viscosimetría rotacional, los de cizalla oscilatoria también pusieron de manifiesto importantes diferencias entre las tres variedades de KGM objeto de estudio tal y como se desprende de la comparación de sus espectros mecánicos (Figura 3.12).

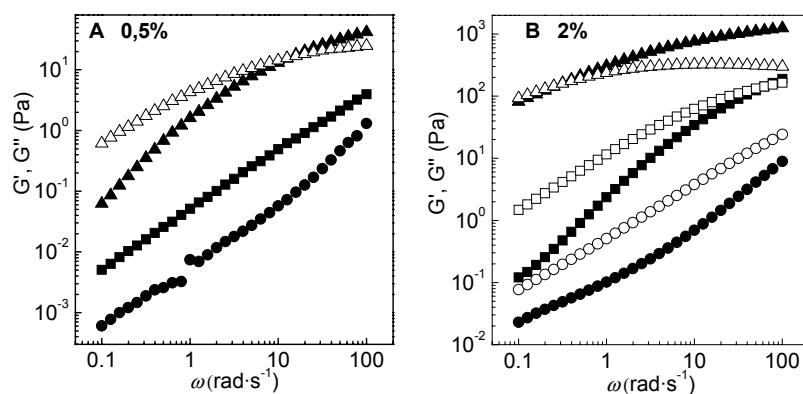


Figura 3.12. Espectros mecánicos de los glucomananos japonés (triángulos), europeo (cuadrados) y americano (círculos) a las concentraciones de 0,5% p/v (A) y de 2% (B). Módulo elástico (símbolos cerrados), módulo viscoso (símbolos abiertos).

La ordenación de las variedades de glucomanano, tanto en cuanto a las viscosidades que son capaces de conferir al medio (Figura 3.10), como a los valores de módulo elástico/viscoso (Figura 3.11) y sus correspondientes tiempos de relajación, sugiere la marcada incidencia del peso molecular del KGMs en las tres variedades estudiadas. Sin embargo, ninguna de las dos técnicas empleadas para la determinación del peso

molecular, viscosimetría capilar y GPC, permite corroborar este extremo. Las diferencias reológicas encontradas deben por tanto justificarse teniendo en cuenta el mayor contenido de impurezas en los glucomananos europeo y americano, tal y como se comprobó mediante análisis elemental (Tabla 3.2), los diferentes contenidos en humedad y en el caso de la variedad americana, a su bajo grado de acetilación, que constituye un factor adicional, al limitar su solubilidad en medio acuoso.

En lo que se refiere a las características granulométricas de los tres productos, cabe señalar que los datos obtenidos se ajustaron a una distribución normal que proporcionó los mejores resultados (Tabla 3.7).

	Americano	Europeo	Japonés
% Humedad (TGA)	11,2	10,6	3,7
Densidad real (mg/ml)	1,468 (0,049)	1,511 (0,007)	1,445 (0,007)
Diámetro medio (mm)	0,055 (0,049)*	0,212 (0,059)*	0,176 (0,054)*
Compresibilidad	27,88 (0,64)	2,65 (0,68)	8,85 (0,05)
Flowability	50,5 (mala)	93(muy buena)	85 (buena)
Floodabilily	68,5 (buena)	83 (muy alta)	74 (alta)

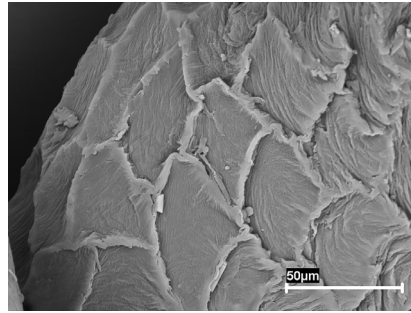
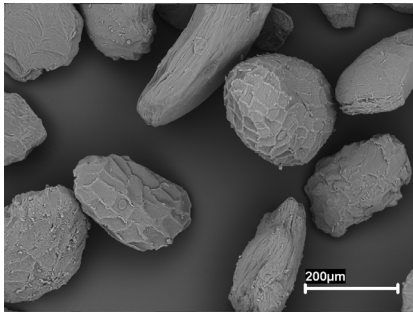
* Desviación estándar de la distribución normal de tamaños de partícula.

Tabla 3.7.- Características granulométricas y reológicas de las partículas de las variedades de glucomanano de konjac objeto de estudio. Desviación estándar entre paréntesis

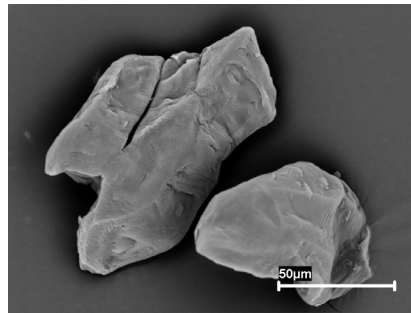
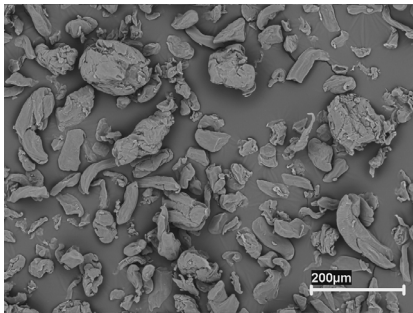
Las diferencias observadas en el tamaño medio de partícula resultan patentes en las correspondientes fotomicrografías de microscopía electrónica de barrido (Figura 3.13). También se aprecian diferencias significativas en cuanto a morfología y a características superficiales de los productos. Así, el material de origen japonés (Figura 3.13A) está compuesto de partículas con formas regulares, similares a las descritas por

algunos autores para la harina de konjac (Takigami y Phillips, 1995), el de origen americano presenta fibras irregulares de superficie lisa (Figura 3.13 C) y, por último, en el producto europeo es de destacar la esfericidad que caracteriza a sus partículas (Figura 3.13C).

A



B



C

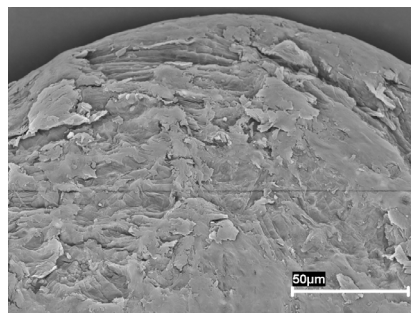
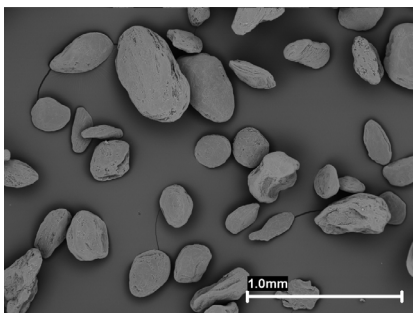


Figura 3.13. Fotomicrografías SEM de los tres glucomananos de konjac (A) japonés, (B) Americano, (C) Europeo.

Las peculiaridades de los materiales pulverulentos en cuanto a tamaño, forma y superficie se reflejan directamente en sus propiedades de flujo (Tabla 3.7), caracterizadas mediante el parámetro compresibilidad y los índices de Carr. Estos nos permiten clasificar a las variedades europea y japonesa dentro del grupo de productos con excelentes propiedades de flujo, mientras que las propiedades reológicas de la variedad de origen americano resultan claramente deficientes (Tabla 3.7).

Finalmente, los ensayos dirigidos a caracterizar la conducta de compresión de estos materiales no permitieron la obtención de resultados de utilidad, ya que con ninguno de ellos es posible la formación de comprimidos con suficiente resistencia mecánica, por lo que su utilización estará condicionada al empleo de otros excipientes que subsanen estas deficiencias.

En conclusión, existen diferencias muy marcadas en las propiedades de los tres KGM objeto de estudio, tanto en lo que se refiere a su contenido en impurezas- que se eliminan mediante procesos de clarificación relativamente sencillos- como a su estructura y propiedades reológicas.

Desde el punto de vista de su utilización como productos formadores de geles para formas de cesión controlada, resultaría necesario el establecimiento de especificaciones en cuanto a peso molecular y a la presencia de grupos acetilo en su estructura.

Las diferencias detectadas en morfología, tamaño medio y características superficiales de las partículas, deben condicionar, de forma muy marcada, su funcionalidad como componente de formas sólidas. Su

incorporación a comprimidos requiere una mejora de sus características de densificación, posiblemente mediante procesos de granulación.

3.5 Bibliografía

- Barnes,H.A.**, 2000. A handbook of elementary rheology. 1 Ed., The University of Wales Institute on Non-Newtonian Fluid Mechanics, Aberystwyth, Wales.
- Barnes,H.A., Hutton,J.F., Walters,K.**, 1989. An introduction to rheology. 1 Ed., Elsevier, Amsterdam.
- Bird,R.B., Armstrong,R.C., Hassager,O.**, 1977. Dynamics of polymeric liquids. Wiley, New York.
- Brownsey,G.J., Cairns,P., Miles,M.J., Morris,V.J.**, 1988. Evidence for Intermolecular Binding Between Xanthan and the Glucomannan Konjac Mannan. Carbohydr. Res., 176, 329-334.
- Carr,R.**, 1965. Chemical Engineering. McGraw-Hill, New-York.
- Carreau,P.J.**, 1972. Rheological Equations from Molecular Network Theories. Transactions of the Society of Rheology, 16, 99-127.
- Carreau,P.J., De Kee D.C.R, Chhabra R.P.**, 1997. Rheology of polymeric systems: principles and applications. Hanser, Munich.
- Cheng,L.H., Karim,A., Norziah,M.H., Seow,C.C.**, 2002. Modification of the microstructural and physical properties of konjac glucomannan-based films by alkali and sodium carboxymethylcellulose. Food Research International, 35, 829-836.
- Cheng,L.H., Karim,A., Seow,C.C.**, 2007. Effects of acid modification on physical properties of konjac glucomannan (KGM) films. Food Chemistry, 103, 994-1002.

- Cross, M.M.**, 1965. Rheology of Non-Newtonian Fluids - A New Flow Equation for Pseudoplastic Systems. *J. Colloid Sci.*, 20, 417-437.
- Dave, V., Sheth, M., McCarthy, S.P., Ratto, J.A., Kaplan, D.L.**, 1998. Liquid crystalline, rheological and thermal properties of konjac glucomannan. *Polymer*, 39, 1139-1148.
- de Waele, A.**, 1923. Viscometry and plastometry. *Oil Color Chem. Assoc. J.*, 6, 33.
- Dea, I.C.M., Morris, E.R., Rees, D.A., Welsh, E.J., Barnes, H.A., Price, J.**, 1977. Associations of Like and Unlike Polysaccharides - Mechanism and Specificity in Galactomannans, Interacting Bacterial Polysaccharides, and Related Systems. *Carbohydr. Res.*, 57, 249-272.
- Houwink, R.**, 1940. Relation between the polymerization degree determined by osmotic and viscosimetric methods. *J. Prakt. Chem.*, 157, 15-18.
- Huggins, M.L.**, 1942. The Viscosity of Dilute Solutions of Long-Chain Molecules. IV. Dependence on Concentration. *J. Am. Chem. Soc.*, 64, 2716-2718.
- Jacon, S.A., Rao, M.A., Cooley, H.J., Walter, R.H.**, 1993. The Isolation and Characterization of A Water Extract of Konjac Flour Gum. *Carbohydrate Polymers*, 20, 35-41.
- Kimura, T., Sugahara, T., Kameda, K., Sasaki, H., Fukuya, Y., Masahiko, G.**, 2001. Effects of ultrasonication on the physicochemical properties and sensory characteristics of konnyaku. *J. Home Econ. Jpn*, 52, 227-234.
- Kiriyama, S., Enishi, A., Shimahara, H., Sugiyama, N., Yoshida, A.**, 1972. Hypocholesterolemic Activity and Molecular-Weight of Konjac Mannan.

- Kishida,N.**, 1979. Relationship Between the Quality of Konjac Flour and the Molecular Matter Nature of Konjac Mannan. *Agric. Biol. Chem.*, 43, 2391-2392.
- Koroskenyi,B., McCarthy,S.P.**, 2001. Synthesis of acetylated konjac glucomannan and effect of degree of acetylation on water absorbency. *Biomacromolecules*, 2, 824-826.
- Laignel,B., Bliard,C., Massiot,G., Nuzillard,J.M.**, 1997. Proton NMR spectroscopy assignment of D-glucose residues in highly acetylated starch. *Carbohydr. Res.*, 298, 251-260.
- Maeda,M., Shimahara,H., Sugiyama,N.**, 1980. Studies of Mannan and Related-Compounds .5. Detailed Examination of the Branched Structure of Konjac Glucomannan. *Agric. Biol. Chem.*, 44, 245-252.
- Maekaji,K.**, 1974. Mechanism of Gelation of Konjac Mannan. *Agric. Biol. Chem.*, 38, 315-321.
- Maekaji,K.**, 1978. Determination of Acidic Component of Konjac Mannan. *Agric. Biol. Chem.*, 42, 177-178.
- Maekaji,K., Kawamura,D.**, 1985. Variation in Rheological Properties of Konjac Gel with the Corm Cultivar. *Agric. Biol. Chem.*, 49, 2483-2484.
- Mark,H.**, 1938. The formation and properties of highly polymerized solids. *Der Feste Körper*, 65-104.
- Martínez-Pacheco,R., Gómez-Amoza,J.L., Vila-Jato,J.L.**, 1985. Diseño de un sistema de registro de presión en máquinas de comprimir excéntricas. *Cienc. Ind. Farm.*, 4, 207-211.
- Moreton R.C.**, Tablet excipients to the year 2001: A look into the crystal ball. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 22 (1), 11.

- Morris,E.R., Cutler,A.N., Ross-Murphy,S.B., Rees,D.A., Price,J.**, 1981. Concentration and shear rate dependence of viscosity in random coil polysaccharide solutions. *Carbohydrate Polymers*, 1, 5-21.
- Nishinari,K.**, 2000. Konjac Glucomannan. In: Doxastakis,G., Kiosseoglou,V. (Eds.), ELSEVIER, 309-330.
- Nishinari,K., Williams,P.A., Phillips,G.O.**, 1992. Review of the Physicochemical Characteristics and Properties of Konjac Mannan. *Food Hydrocolloids*, 6, 199-222.
- Ostwald,W.**, 1925. Ueber die Geschwindigkeitsfunktion der Viskosität disperser Systeme. I. *Kolloid-Z*, 36, 99-117.
- Peiyong, L., Shenglin, Z., Guohua, Z., Yan, C., Huaxue, O., Mei, H, Zhongfeng, W, Wei, X, y Hongyi, P.**, 2002 Professional standard of the People's Republic of China for agriculture. Konjac Flour. NY/T 494.
- Picton,L., Muller,G.**, 1996. Rheological properties of modified cellulosic polymers in semidilute regime: effect of salinity and temperature. *Pogr. Colloid. Polym. Sci.*, 102, 26-31.
- Ratcliffe,I., Williams,P.A., Viebke,C., Meadows,J.**, 2005. Physicochemical characterization of konjac glucomannan. *Biomacromolecules*, 6, 1977-1986.
- Takigami,S., Phillips,G.O.**, 1995. The production and quality of konjac mannan. In: Phillips,G.O., Williams,P.A., Wedlock,D.J. (Eds.), 385-391.
- Tipson,R.S.**, 1968. Infrared spectroscopy of carbohydrates. A review of the literature. National Bureau of Standards Monograph 110, 1-21.
- Vuksan,V., Sievenpiper,J.L., Xu,Z., Wong,E.Y.Y., Jenkins,A.L., Beljan-Zdravkovic,U., Leiter,L.A., Josse,R.G., Stavro,M.P.**, 2001. Konjac-mannan

and American ginseng: Emerging alternative therapies for type 2 diabetes mellitus. *J. Am. Coll. Nutr.*, 20, 370S-380S.

Weast,R.C., Lide,D.R., Astle,M.J., Beyer,W.H., 1990. Handbook of chemistry and physics. 70 Ed., CRC Press Inc., Florida.

Yang,G.A., Zhang,L.N., Yamane,C., Miyamoto,I., Inamoto,M., Okajima,K., 1998. Blend membranes from cellulose konjac glucomannan cuprammonium solution. *Journal of Membrane Science*, 139, 47-56.

Yu,H.Q., Huang,A., Xiao,C.B., 2006. Characteristics of konjac glucomannan and poly(acrylic acid) blend films for controlled drug release. *Journal of Applied Polymer Science*, 100, 1561-1570.

Zhang,H., Yoshimura,M., Nishinari,K., Williams,M.A.K., Foster,T.J., Norton,I.T., 2001. Gelation behaviour of konjac glucomannan with different molecular weights. *Biopolymers*, 59, 38-50.

CHARACTERIZATION OF DIFFUSION OF MACROMOLECULES IN KONJAC GLUCOMANNAN SOLUTIONS AND GELS BY FLUORESCENCE RECOVERY AFTER PHOTBLEACHING TECHNIQUE

International Journal of Pharmaceutics (316) 2006 37-46

Felipe Alvarez-Manceño^a, Kevin Braeckmans^b, Stefaan C. De Smedt^b,
Joseph Demeester^b, Mariana Landin^{a,*}, Ramón Martínez-Pacheco^a

^a*Departamento Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia,
Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain*

^b*Laboratory of General Biochemistry and Physical Pharmacy, University of Gent,
Harelbekestraat 72, 9000 Gent, Belgium*

Abstract

Konjac glucomannan (KGM) is a neutral polysaccharide with interesting properties as gelling agent and thickener. Its peculiar biodegradability, being not degradable in the small intestine but degradable by the anaerobic human intestinal bacteria, turn it into a promising candidate for colonic drug delivery systems. In this study aqueous systems (0.5%, w/v) of KGM from three different origins and their mixtures with xanthan gum (XG) (1:1) were evaluated as regards their rheological properties and the diffusion coefficients and mobile fraction of macromolecules (dextrans of different molecular weight). Rheological data illustrate the synergism between KGM and XG at a stoichiometric relationship 1:1. Moreover, fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) data indicate that diffusion of probes through the polysaccharide systems cannot be completely explained by the macroscopic properties of the medium but it is related to their molecular size and as a consequence to a sieving mechanism. The strong differences between KGM from different suppliers suggest the convenience of establishing specifications for this material in order to use it as pharmaceutical excipients

4.1. Introduction

In the last years an important work has been carried out within the pharmaceutical field directed to establish the utility of various natural polysaccharides as base excipients for the elaboration of specific drug delivery systems (Kumar and Kumar, 2001). Particularly challenging is the delivery of drug macromolecules like peptides or protein to the systemic circulation through colonic absorption which is unfeasible until now.

Among the various approaches used for colon drug targeting it is remarkable the use of natural polysaccharides, modified natural polysaccharides or its mixtures. These materials have been traditionally used both in food and pharmaceutical industries and are considered non-toxic, low cost and available in a variety of structures and interesting properties. Large number of polysaccharides has already been tried for their potential as colon-specific drug carrier systems, such as chitosan, pectin, chondroitin sulphate, cyclodextrins, dextrans, guar gum, inulin, pectin, locust bean gum and amylose (Sinha and Kumria, 2001).

Konjac glucomannan (KGM) is a natural neutral water soluble polysaccharide obtained from the tubers of *Amorphophallus konjac*. It is composed of a backbone chain of β -1,4 linked D-mannose and D-glucose with a low degree of acetyl groups related to its gel formation properties (Williams et al., 2000; Katsuraya et al., 2003; Gao and Nishinari, 2004). This soluble fibre has an extraordinarily high water-holding capacity, forming highly viscous solutions when dissolved in water. It has the

highest viscosity at lowest concentration of any known dietary fibre (Ozu et al., 1993; Yaseen et al., 2005).

While the use of KGM as a gelling agent, thickener, film former and emulsifier has been receiving considerable attention in the food area, little attention has been paid to its possible use in the pharmaceutical area. However, the interest of researchers for KGM has increased recently because it has been demonstrated that this polysaccharide has the ability to lower blood cholesterol and sugar level, help with weight loss, promote intestinal activity, immune function, etc. (Vuksan et al., 1999, 2000; Fang and Wu, 2004).

Due to its gel-forming and biodegradability, being not degradable in the small intestine but degradable by the anaerobic human intestinal bacteria (Nakajima and Matsuura, 1997; Nakajima et al., 2002), can be considered a promising candidate for colonic drug delivery systems. In fact, studies on KGM have been carried out in recent years in order to establish its utility as colon-specific delivery excipient for hormones (Gonzalez et al., 2004) and some proteins as insuline or bovine serum albumin (Wang and He, 2002; Liu et al., 2004).

Specially interesting it is the synergistic interaction between KGM and other polysaccharides, such as xanthan gum pointed out by different authors. (Goycoolea et al., 1995a, 1995b; Paradossi et al., 2002).

Xanthan gum (XG) is an exopolysaccharide from *Xanthomonas campestris* that can play a successful role in matrix formulations for oral controlled-release drug delivery (Talukdar and Kinget, 1995; Santos et al., 2005).

Xanthan solutions exhibit weak gel-like properties at low shear rates, but it does not form true gels at any concentration or temperature (Millane and Wang, 1990).

Mixtures of KGM and XG, even at extremely low concentration, produce strong and elastic gels (Goycoolea et al., 1995a) the utility of which as drug delivery systems has not been yet established.

When a solid dosage form based on KGM–XG is placed into an aqueous environment it absorbs water from the medium and forms a gel through which drug is released. A key aspect from a pharmaceutical point of view if we like to be able to modulate drug delivery is to know and understand how diffusion of the drug is influenced by the structure of the polymer network (DeSmedt et al., 1997).

Several techniques like nuclear magnetic resonance, light scattering or fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) have been proved very useful for the characterization of macromolecules diffusion within hydrogels (Gumbleton and Stephens, 2004; Burke et al., 2005; Van Tomme et al., 2005).

FRAP denotes a method for measuring the motion of fluorescently labelled molecules. A microscopic small area of the fluorescent sample is photobleached by a brief exposure to an intense focused laser beam. Recovery occurs by replenishment of intact fluorophore in the bleached area by diffusion from the surrounding medium. Interesting information obtainable from FRAP experiments includes determination of the diffusion coefficient and total fraction of fluorophore which is mobile (Axelrod et al., 1976; Perry et al., 2006).

Nowadays, most confocal scanning laser microscopes (CSLM) are equipped with the feature to bleach user-defined regions within fluorescent samples. This allows FRAP experiments to be easily carried out.

The goals of the present study were:

(a) to evaluate the utility of CSLM in conjunction with FRAP for measuring diffusion coefficients in konjac glucomannan solutions and the intermanufacturer variability of KGM;

(b) to assess the influence of molecular weight macromolecules on their diffusion coefficients and mobile fraction;

(c) to study the effect of the interaction between KGM and xanthan gum on diffusion coefficients and total mobile fraction of macromolecules.

4.2. Materials and methods

4.2.1. Raw materials

Konjac glucomannans from different suppliers and geographical origins: American (Triple Crown America Inc., Lot: 3500C), European (Escuder, Spain, Lot: 019) and Japanese (Propol A®, Lot: AKG07) and Xanthan gum (Guinama, Spain, Lot: 016) were studied as received.

Fluorescein isothiocyanate dextran (FITC-dextran) probes of different averaged molecular weights (M_w): 7.7×10^4 , 1.3×10^5 , 5.11×10^5 g/mol and approximate $M_w = 2 \times 10^6$ g/mol and 4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulphonic acid, (HEPES) were obtained respectively from Sigma Aldrich and Fluka Biochimika.

4.2.2. KGM or KGM/XG systems preparation and rheological characterization

Polysaccharide systems in distilled water at a concentration of 0.5% (w/v) were prepared by mechanical stirring for one hour at 85 °C in an hermetic container. When KGM/XG mixture systems were elaborated a ratio of 1:1 in weight was used and total polysaccharide concentration maintained. Solutions were left to cool and equilibrate overnight and its rheological properties characterized using a rheometer AR1000 (TA Instruments, Newcastle, UK) fitted with a cone- and plate geometry (2° cone angle, 60 mm diameter, 59 µm gap). For the gel systems preheating of the rheometer peltier plate above gel temperature was needed to avoid the appearance of harmonic signals.

Steady shear measurements and dynamic rheological characterization were carried out at least in triplicate at 25 °C.

Steady shear measurements were made using a logarithmic torque ramp in order to decrease the initial acceleration and the effects of inertia.

Dynamic rheological characterization started with torque sweeps to ensure operation within the linear viscoelastic region of the viscoelastic samples. The extension of the linear viscoelastic regime has been determined under oscillatory shear conditions at a frequency of 1 rad/s. Dynamic frequency sweep experiments have been carried out at constant strain amplitude within the limits of the linear viscoelastic region in the range of 0.1–100 rad/s.

Samples were covered with a thin layer of paraffin oil to limit evaporation.

4.2.3. Laser scanning confocal microscope experiments

Fluorescein isothiocyanate dextran (FITC-dextran) probe solutions with a concentration range from 0.45 to 20 mg/mL were prepared in 20mM HEPES buffer pH 7.4. Solutions or gels of the three KGM, XG or KGM/XG mixtures (1:1) were prepared in 20mM HEPES buffer pH 7.4 at a total polysaccharide concentration of 0.5% (w/v) by mechanical stirring for 1 h at 85 °C in an hermetic container.

The fluorescent probes were added to an aliquot of the KGM solutions or KGM/XG gels, stirred and left to cool at room temperature to obtain homogeneous samples. Concentration of the sample probes was always 1.5 mg/mL.

FRAP experiments were performed on a CSLM (model MRC1024UV, Bio-Rad, UK) modified to be able to bleach arbitrary regions (Wedekind et al., 1994; Braeckmans et al., 2003). Bleaching experiments have been performed with the 488-nm line of a 4W Ar-ion laser (model Stabilite 2017; Spectraphysics, Germany). A 10× objective lens (CFI Plan Apoformat; Nikon, The Netherlands) with a numerical aperture of 0.45 was used. Typical photobleaching and measuring powers in the sample were 2 mW and 5.5 μW, respectively.

The sample was positioned on the microscope stage and a location of interest brought into focus. After a disk of a particular diameter (25 μm) has been drawn in the bleaching software a time-series is recorded with the CSLM resulting in a stack of images. The first image of the series shows the sample before bleaching, the second one shows the disk at the time of bleaching and the subsequent images show the recovery process after bleaching (see Fig. 4.3). Usually we have recorded stacks of 30

images with a time interval between 2.5 and 30 s depending on the recovery speed.

To extract the experimental recovery curve from the stack of images, at first the centre of the bleached disk is accurately calculated by a centre of mass algorithm. Secondly, each of the recovery images is normalized to the first image, the prebleach image. Next the mean fluorescence intensity inside the disk is calculated for each image and normalized to one background user-defined region on the same image to correct for possible bleaching during the recording process. Finally the experimental parameters – effective diffusion coefficient (D) and mobile fraction (k) – are determined by a least-squares fit of the equations, as described in Braeckmans et al. (2003), to the experimental recovery curve.

4.2.4. Statistical analysis

The statistical package SPSS 12.0S for Windows was used to study the variability among group means by analysis of variance (ANOVA) and post hoc comparisons among pairs by Scheffe test (Walpole et al., 1998).

4.3. Results and discussion

It is well documented that the structure and the percentage of glucomannan in the *A. konjac* roots vary considerably depending on the cultivars, strains, time or producing areas of tubers (Takigami and Phillips, 1996; Fang and Wu, 2004). The variations in the methods of extraction and purification increase the rheological and biochemical differences inherent to this type of products meaning high intermanufacturer variability in the same way as other natural products. There are not yet pharmaceutical specifications for this material, therefore it is necessary to

consider the intermanufacturer variability in order to establish its utility as raw material in the development of dosage forms.

Fig. 4.1 presents the typical flow curves at 25 °C for the solutions at 0.5% (w/v) for the three KGM from different origins studied showing marked differences between them. American-KGM solution (0.5%, w/v) shows a Newtonian behaviour being the shear rate proportional to the shear stress. The shear viscosity is low (7 mPa s) and does almost not vary with the shear rate. This could be related to a lower molecular weight for the American-KGM and as a consequence, at a concentration of 0.5% the number of entanglements created between molecules and disrupted by the shear is the same, so the viscosity is constant. European and Japanese KGM show a clearly shear thinning behaviour at high shear rates after a first Newtonian region at low shear rates, in agreement with other authors for the KGM (Jacon et al., 1993) and other polysaccharides as galactomannans, chitosan or gellan (Miyoshi and Nishinari, 1999; Hwang and Shin, 2000; Oblonsek et al., 2003).

At low shear rates the disruption of entanglements imposed by the shear is balanced by the formation of new ones, so no net change in the entanglements occurs and the viscosity is maintained constant. The constant viscosity value is called zero-shear rate apparent viscosity η_0 . As the shear rate increases the disruption of entanglements overcomes the formation of the new ones and as a consequence apparent viscosity decreases.

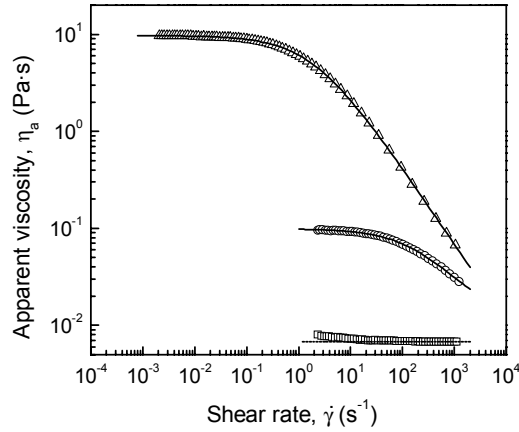


Fig. 4.1. Flow curves for 0.5% konjac glucomannan solutions at 25 °C. Symbols: Japanese KGM (\circ), American KGM (∇) and European KGM ($-$). Full lines represent cross-model predictions and dashed line Newtonian model prediction.

Many equations have been proposed to describe the shear thinning behaviour of polysaccharide solutions (Lapasin and Prici, 1995). Cross model has provided the better fit to describe accurately the flow properties of the European and Japanese KGM (0.5%, w/v) solutions and predict zero-shear rate viscosity values. Cross model may be defined in the equation:

$$\frac{\eta - \eta_{\infty}}{\eta_0 - \eta_{\infty}} = \frac{1}{1 + (k \cdot \dot{\gamma})^m}$$

where $\dot{\gamma}$ is the shear rate (s^{-1}), η_a the apparent viscosity (Pa s), η_0 the zero-shear rate viscosity (Pa s), η_{∞} the infinite shear rate viscosity (Pa s), K a time constant (s) and m is a dimensionless constant which dictates the degree of shear thinning. Values of m tending to zero describe more Newtonian liquids while the most shear thinning liquids have a value of m tending to unity.

Table 4.1 presents the parameters derived from Cross model for European and Japanese KGM and the viscosity value for the American KGM. Very good agreement between experimental data and model predictions can be observed in Fig. 4.1 and also is illustrated by the low magnitudes of the standard error and allowed to an accurate determination of the zero-shear rate viscosity.

Simples	Model	η (Pa s)	K (s)	M	Standard Error ^a
American KGM	Newtonian	0,007 (0,000)	-	-	3,985
European KGM	Cross	0,103 (0,007)	0,005 (0,000)	0,810 (0,024)	3,834
Japanese KGM	Cross	9,471 (0,338)	0,500 (0,013)	0,792 (0,002)	2,374
XG	Cross	32,250 (1,456)	39,217 (1,670)	0,829 (0,002)	3,307

$$\text{Mean (standard deviation). } ^a\text{Standard Error} = \frac{\left[\frac{\sum_{i=1}^{i=n} (x_{\text{exp},i} - x_{\text{cal},i})^2}{n - 2} \right]^{1/2}}{\text{Range}(x_{\text{exp}})} \times 1000$$

Table 4.1. Magnitudes of the Newtonian and Cross model parameters for steady shearing, obtained for American KGM, European KGM, Japanese KGM and XG solutions.

The magnitude of zero-shear rate viscosity is a macroscopic representation of microstructural nature of biopolymers indicating that the Japanese KGM establish a higher number of entanglements than the European KGM. Results demonstrate clear flow rheological differences among KGMs from different suppliers that could be a priori determinant of its behaviour as excipient in drug delivery systems.

Fig. 4.2 corresponds to the mechanical spectra of the KGM or KGM/XG systems at a 0.5% (w/v) concentration.

Despite of the visual appearance of the systems elaborated with the Japanese and the European KGM (Fig. 2A), from a rheological point of view, neither of them can be classified as a gel but viscous solutions.

Almdal et al. (1993) have established two conditions to distinguish between viscous solutions and gels according to which: (a) a gel is a soft, solid or solid-like material of two or more components one of which is a liquid, present in substantial quantity and (b) solid-like gels are characterized by the absence of an equilibrium modulus, by a storage modulus, $G'(\omega)$, which exhibits a pronounced plateau extending to times at least of the order of seconds, and by a loss modulus $G''(\omega)$, which is considerably smaller than the storage modulus in the plateau region.

The rheological spectra obtained for all 0.5% KGM alone (Fig. 2A) are typical of polysaccharide solutions at a concentration well below the minimum critical gelling concentration, with $G'' \gg G'$ and strong frequency dependence in both moduli. It is also evident from Fig. 4.2A that at this concentration neither of the polysaccharides fulfill the requirement of a pronounced plateau with G' over G'' and therefore cannot be considered as gels.

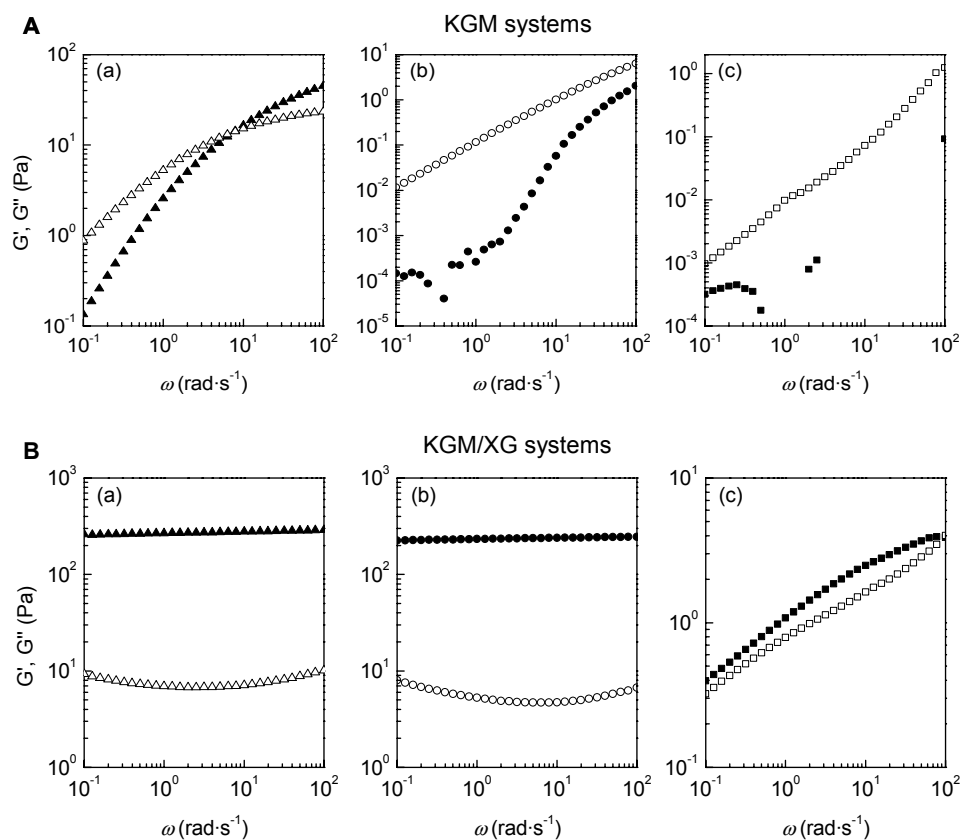


Fig. 4.2. Dynamic elastic (G') and viscous (G'') moduli as function of frequency. (A) 0.5% (w/v) KGM systems. (B) 0.5% (w/v) KGM/XG (1:1) aqueous systems. (a) Japanese KGM, (b) European KGM and (c) American KGM (closed symbols: G' ; open symbols: G'').

When XG is present in the polysaccharide system composition, the rheological response undergoes a great change and shows for all the KGM/XG mixtures gel-like characteristics (Fig. 4.2B). It can be seen that G' exceeds G'' throughout the accessible frequency range, being the relative magnitude of the two moduli roughly constant and higher than ten times for the Japanese and the European KGM. Those systems have a

definite shape and can be considered as true gels. For American KGM however can be observed that both moduli have a lower magnitude and a much greater frequency dependence. Similar behavior is observed for single-polymer gelling systems close to gel point, and is characteristic of a very sparingly cross-linked network.

In brief, rheological properties of KGM or KGM/XG systems indicate a high intermanufacturer variability in glucomannans from Konjac. Moreover, all KGM (0.5%) water systems can be considered viscous solutions from a macroscopic and rheological point of view. The mixture of KGM with XG (1:1) at the same concentration (0.5%) gives strong gels with a defined shape for the Japanese and European varieties. Data suggest that their three-dimensional structure can be described as a mesh, with spaces between the polymer chains filled with water being the cross-links formed by physical entanglements.

Gel rheological properties has been pointed out as determining factor in controlling drug diffusion process in matrices of mixtures of polysaccharides (Vendruscolo et al., 2005) suggesting that both the Japanese and the European KGM should have better control release ability than the American KGM variety.

Moreover, the synergistic effect on rheological properties observed when KGM and XG are mixed should have a consequence on the diffusion of molecules through the gel structure. In order to study molecular diffusion through those KGM and KGM/XG systems fluorescence recovery after photobleaching measurements were carried out.

Before performing FRAP measurements on KGM solutions or gels, the concentration range in which a linear relation exists between the observed fluorescence and the fluorophore concentration has to be determined. FITC-dextran solutions with a concentration range from 0.45 to 20 mg/mL were prepared and its fluorescence measured. A linear region was found for concentrations up to 2 mg/mL ($r^2 > 0.9947$) for all the FITC-dextran probes. For higher concentrations there is a deviation from the linear relation due to the well-known inner-filter effect (DeSmedt et al., 1997).

Diffusion coefficients (D) and mobile fractions (k) of FITC-dextran probes in Konjac, xanthan gum or KGM/XG systems were measured by recording stacks of approximately 30 images with a CSLM at regular time intervals. Fig. 4.3 shows the first six images of a typical experiment.

The first image corresponds to the FITC-dextran/KGM solution before bleaching, the second image was taken at the moment of bleaching the region of interest (disk), and subsequent images show the recovery of the fluorescence in the bleached area of the KGM system. Images were processed to obtain the fluorescence recovery curve.

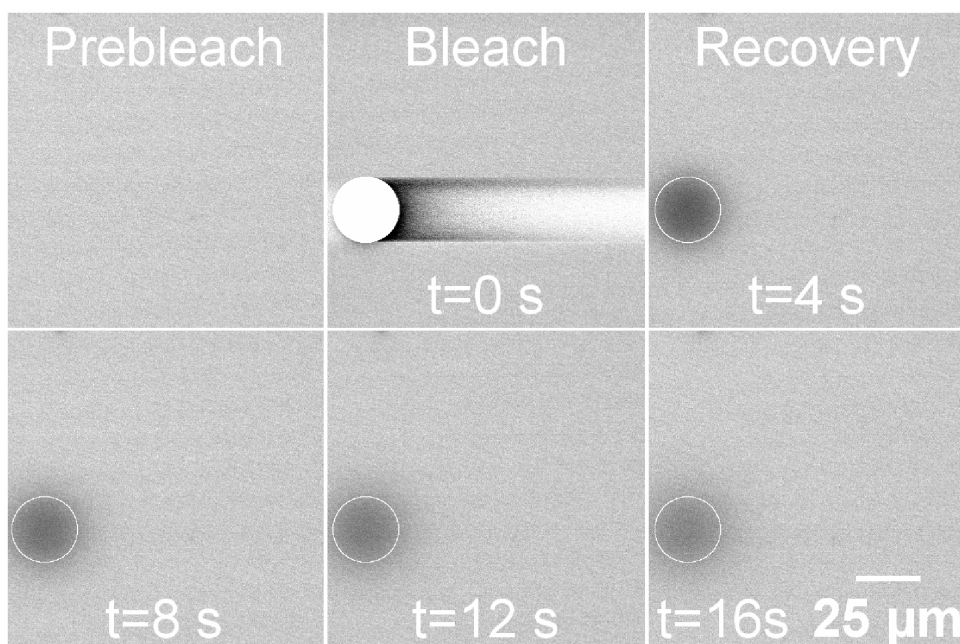


Fig. 4.3. Sequence of the first six images of the experiment with 511000 g/mol FITC-dextran in the Japanese KGM solution. The first image (prebleach), acquired with a highly attenuated laser beam, shows an homogeneous distribution of fluorophore through out the KGM/XG system. When the second image is scanned laser power is increased at the region of interest and a user-defined 25 μm diameter disk is uniformly bleached. The white circles traced onto the following images mark the 2D size and position of the original bleach disk and indicate the area over which fluorescence recovery is measured during the recovery phase with the laser intensity switched back to the prebleach level.

Fig. 4.4 shows an example of the obtained recovery curves corresponding to the 2×10^6 g/mol FITC-dextran in the KGM solutions and

KGM/XG gels. The solid lines are the fit of the uniform disk model (Braeckmans et al., 2003) to the experimental data.

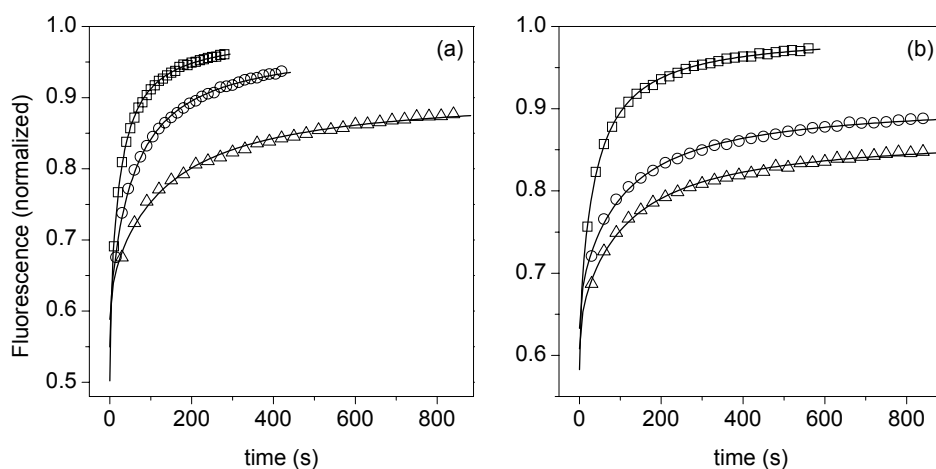


Fig. 4.4. Fluorescence recovery curves for the 2 000 000 g/mol FITC-dextran in KGM solutions (a), and KGM/XG gels (b). Symbols: Japanese KGM (\square), European KGM (\circ) and American KGM (∇). Solid line corresponds to the fit of the uniform disk model (Braeckmans et al., 2003).

Three different phenomena can explain the probe diffusion process: fluid phase viscosity, binding and crowding. For unrestricted diffusion of single fluorescent species in an homogeneous unhindered environment, just limited by fluid phase viscosity, fluorescence recovers to the initial (pre-bleached) level (Verkman, 2002). However, fluorescence recovery can be incomplete if the probe diffusion is restricted by binding or a crowding phenomena. Fluorescence recovery profiles showed a total fluorescence recovery after several minutes for most probes (data not shown) but for the 2×10^6 g/mol FITC-dextran probe incomplete recovery was observed in the Japanese and the European KGM systems. As no reason exists for binding of FITC-dextran in KGM or KGM/XG systems,

incomplete recovery that gives a reduction in the calculated mobile fraction (k) suggests a possible crowding or sieving mechanism for the diffusion of the macromolecules.

Mean and standard deviation of at least five diffusion coefficient measurements in different sample locations as a function of the probe molecular weight are presented in Fig. 4.5.

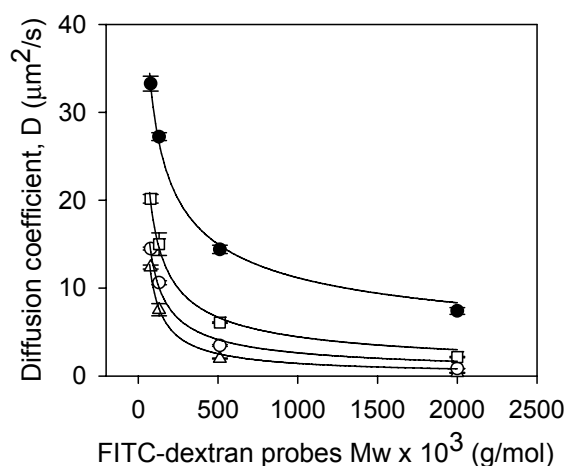


Fig. 4.5. Diffusion coefficients (D) of FITC-dextrans in 0.5% KGM solutions from different origin as a function of its molecular weight and fitting to $D \sim M_w^a$ (solid lines). Symbols: HEPES buffer (\circ), Japanese KGM (\odot), European KGM (\square) and American KGM (∇).

Presence of a 0.5% KGM in the HEPES buffer has a large effect on the FITC-dextran diffusion. Polysaccharides act as a barrier to the probe diffusion producing reductions in the D values of more than 40% compared to the buffer solution. Variations in diffusion coefficients between KGM solutions for a specific probe are statistically significant showing the Scheffé test four subsets. The following represents diffusion

coefficient means found to be significant different using Scheffe's procedure:

HEPES buffer ≠ American KGM ≠ European KGM ≠ Japanese KGM

The results could be explained according to Stokes–Einstein equation in which diffusion coefficient D and dynamic viscosity η are indirectly related (Cheng et al., 2002):

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r_H}$$

Despite of linear correlation between viscosity and diffusion coefficients could not be established, a clear effect of viscosity on diffusion coefficients can be noticed. The variety with the lowest viscosity, the American KGM, shows the lowest reduction for all the probes and the Japanese KGM with the highest viscosity presents the greatest reductions.

FITC-dextran chains diffuse slower as increasing its molecular size. Dependence of diffusion coefficient as a function of FITC-dextran molecular weight in KGM solutions from different origins was analysed and found that it can be described by the potential relationship:

$$D \sim M_w^a$$

Data of the fitting obtained are summarized in Table 4.2.

	a	R ²
HEPES buffer	-0.46	0.9997
Japanese KGM	-0.97	0,9998
European KGM	-0.74	0.9979
American KGM	-0.64	0.9994

Table 4.2. Exponents and correlation factors for the $D \sim M_w^a$ fitting to the experimental data for FITC-dextrans in buffer and 0.5% KGM solutions.

As can be derived from the exponent values the dependence is not the same for the KGM varieties studied. If the increasing in viscosity produced by KGM was just the mechanism involved in the reduction of diffusion coefficients, having in mind Stokes–Einstein equation, the same exponent for FITC-dextran in buffer and KGM solutions and the same relative reduction at a given molecular weight probe should be expected. On the contrary, reduction percentages of the FITC-dextran diffusion coefficients in the varieties of KGM with respect to FITC-dextran diffusion coefficients in buffer (Table 4.3) are different as a function of its molecular weights indicating an additional effect of the polymer network (Braeckmans et al., 2003). Konjac network sterically hinders the diffusion of FITC dextran: the larger the molecule, the stronger the sterical hindrance.

FITC-Dextran Mw	Japanese KGM	European KGM	American KGM
	Reduction \pm SD %	Reduction \pm SD %	Reduction \pm SD %
77000	62.7 \pm 3.1	56.5 \pm 3.0	39.4 \pm 3.1
130000	72.3 \pm 3.2	61.0 \pm 2.1	44.9 \pm 5.0
511000	86.2 \pm 4.4	76.0 \pm 4.2	57.8 \pm 3.9
2000000	95.2 \pm 7.1	88.7 \pm 6.8	71.0 \pm 6.3

Table 4.3. *Reduction percentages of diffusion coefficients and standard deviations (SD) of FITC-dextran in the varieties of KGM with respect to diffusion coefficients in buffer*

Furthermore, by analysing the mobile fraction (k) data obtained by the uniform disk model (Fig. 4.6), it can be seen that this parameter also reduces as dextran probe molecular weight increases. The ANOVAs show

statistically significant differences among probe molecular weights for a specific KGM variety. For all the KGM solutions k values are close to 1, except for FITC-dextran $M_w 2 \times 10^6$ in the Japanese KGM solution. Reduction in this value is important (20.8%) and shows that bigger molecules will be entrapped in the Japanese KGM chains, conditioning its release.

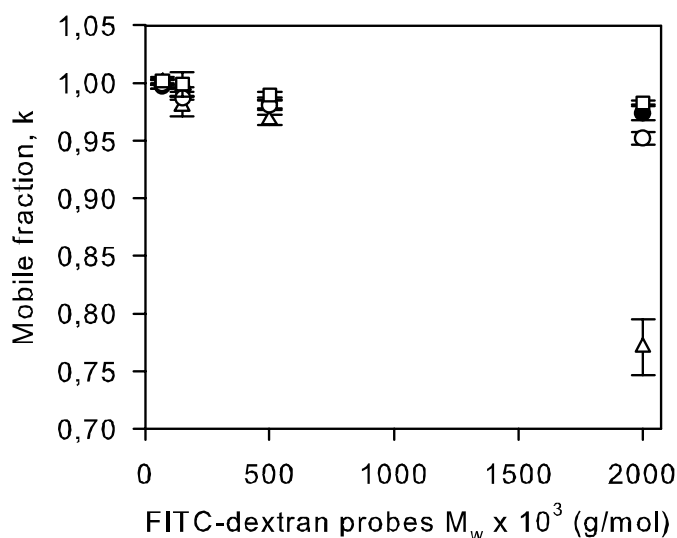


Figure 4.6. Mobile fraction (k) of FITC-dextrans in 0,5% KGM water solutions as a function of its molecular weight. Symbols: Hepes buffer (.), Japanese KGM (8), European KGM (-) and American KGM (∇).

When the analysis of the dependence of FITC-dextran diffusion coefficient as a function of probe molecular weight for the KGM/XG gels was performed, the same relationship $D \sim M_w^a$ was found. Data of the fitting obtained are summarized in Table 4.4.

a	R^2
---	-------

Japanese KGM/XG	-0.94	0.9996
European KGM/XG	-0.80	0.9976
American KGM/XG	-0.81	0.9992

Table 4.4. Exponents and correlation factors for the $D \sim M_w^a$ fitting of the experimental data for FITC-dextran in buffer and 0.5% KGM/XG gels.

Exponents for the European and American KGM varieties are similar and close to the value obtained for the xanthan gum (exponent and correlation factor for the $D \sim M_w^a$ fitting of the experimental data for FITC dextran in 0.5% XG solution; $a = -0.84$, $R^2 = 0.9987$) at the same conditions suggesting that FITC-dextran probes diffusion in the KGM/XG gels is determined by the xanthan gum structure.

Fig. 4.7 shows FITC-dextran probes diffusion coefficients versus percentage of KGM in the KGM/XG mixtures. It can be observed differences in the behaviour of the KGM from different origin suggesting the need of specifications for this material.

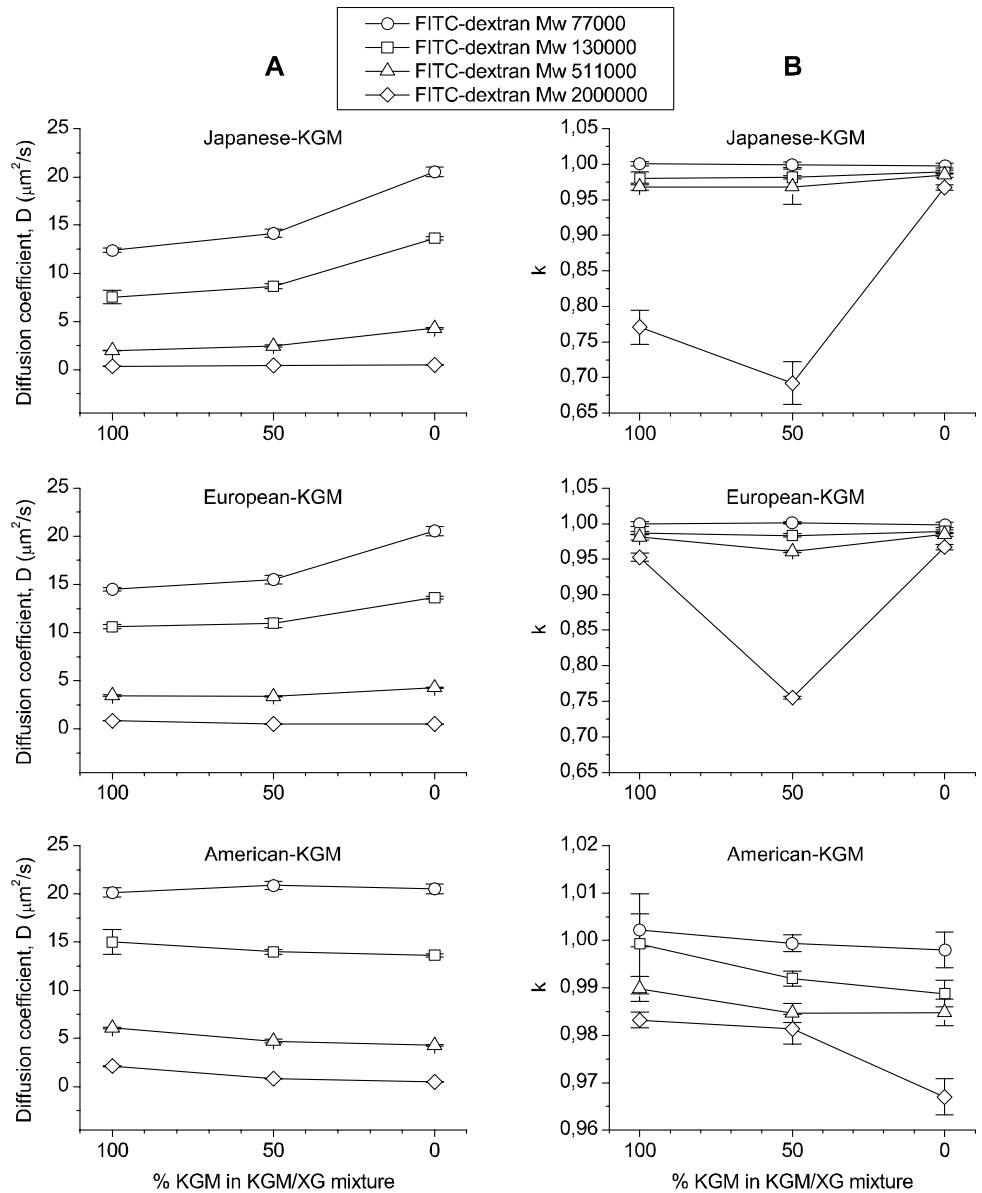


Figure 4.7. Diffusion coefficient (D) and mobile fraction (k) of FITC-dextran as a function of 0.5% (w/v) KGM / XG system composition

The variations in diffusion coefficients among KGM/XG gels for a given probe are once more statistically significant showing the Scheffé test

three subsets. The following represents diffusion coefficient means found to be significant different using Scheffe's procedure:

American KGM/XG \neq European KGM/XG \neq Japanese KGM/XG

However, the synergistic effect deduced from the rheological measurements cannot be stated from the dextran probe diffusion coefficients. Diffusion coefficients in the KGM/XG mixtures were not significantly lower than D values in the single polysaccharide solutions as expected indicating that the interactions between KGM and XG supported by rheological studies do not influence translation diffusion coefficient of probes.

On the contrary, a synergistic effect can be observed when the FITC- dextran mobile fraction is analysed (Fig. 4.7). While a complete fluorescence recovery ($k \rightarrow 1$ for $t \rightarrow \infty$) was observed for the smaller FITC- dextran probe (7.7×10^4 g/mol) with no differences between KGM/XG systems, reductions of 25% and 30% for the European and Japanese varieties, respectively, were found for bigger probe molecules. The fluorescence for the biggest probes recovered only partially in the KGM/XG gels indicating that its mobility is restricted to a greater extent.

It highlighted that diffusion of probes through the polysaccharide system cannot be completely explained by the macroscopic properties of the medium but it is related to a sieving mechanism as it has been found previously for other polymers (DeSmedt et al., 1997).

In conclusion, we have characterized KGM from different suppliers showing strong differences that suggest the necessity of establishing specifications for this material. Rheological data illustrate the synergism between KGM and XG at a stoichiometric relationship 1:1. At 0.5%

systems prepared with KGM or XG can be considered from a rheological point of view solutions, but systems elaborated with mixtures 1:1 KGM/XG in the same proportion and conditions form true gels.

Results also have shown the utility of FRAP in conjunction with CSLM in order to characterize diffusion of different molecular weight macromolecules through KGM systems. FRAP has been shown as a very sensitive technique allowing differentiation between varieties of KGM.

The determination of the diffusion coefficients of small and large solutes measured in KGM and KGM/XG systems indicates that rheological properties of the gels cannot be used to predict changes in the diffusivities of FITC-dextran chains through the network and that the size of the solutes is an important factor in controlling the diffusion. This technique seems very promising for characterizing diffusion through polysaccharide solutions and gels based on konjac glucomannan polysaccharide.

The combination of rheological and FRAP measurements allows the selection of KGM/XG systems with physical strength and limited solute diffusion which could be potentially used as colonic drug delivery systems.

4.4 Acknowledgments

Authors thank the Spanish Government for financial support (SAF2002-03440). Felipe Alvarez Manceñido thanks Xunta de Galicia and Sócrates-Erasmus program for the predoctoral grant and support for the stage in Belgium. Authors gratefully acknowledge Shimizu Chemical Corporation (Japan) for the Propol A® sample.

4.5 References

- Almdal, K., Dyre, J., Hvidt, S., Kramer, O., 1993. Towards a phenomenological definition of the term 'gel'. *Polym. Gels Networks* 1, 5–17.
- Axelrod, D., Koppel, D.E., Schlessinger, J., Elson, E., Webb, W.W., 1976. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys. J.* 16, 1055–1069.
- Braeckmans, K., Peeters, L., Sanders, N.N., De Smedt, S.C., Demeester, J., 2003. Three-dimensional fluorescence recovery after photobleaching with the confocal scanning laser microscope. *Biophys. J.* 85, 2240–2252.
- Burke, M.D., Park, J.O., Srinivasarao, M., Khan, S.A., 2005. A novel enzymatic technique for limiting drug mobility in a hydrogel matrix. *J. Contr. Release* 104, 141–153.
- Cheng, Y., Prud'homme, R.K., Thomas, J.L., 2002. Diffusion of mesoscopic probes in aqueous polymer solutions measured by fluorescence recovery after photobleaching. *Macromolecules* 35, 8111–8121.
- DeSmedt, S.C., Meyvis, T.K.L., Demeester, J., VanOostveldt, P., Blonk, J.C.G., Hennink, W.E., 1997. Diffusion of macromolecules in dextran methacrylate solutions and gels as studied by confocal scanning laser microscopy. *Macromolecules* 30, 4863–4870.
- Fang, W.X., Wu, P.W., 2004. Variations of konjac glucomannan (KGM) from *Amorphophallus konjac* and its refined powder in China. *Food Hydrocolloids* 18, 167–170.

- Gao, S.J., Nishinari, K., 2004. Effect of degree of acetylation on gelation of konjac glucomannan. *Biomacromolecules* 5, 175–185.
- Gonzalez, A., Fernandez, N., Sahagun, A., Garcia, J.J., Diez, M.J., Castro, L.J., Sierra, M., 2004. Effect of glucomannan and the dosage form on ethinylestradiol oral absorption in rabbits. *Contraception* 70, 423–427.
- Goycoolea, F.M., Richardson, R.K., Morris, E.R., Gidley, M.J., 1995a. Stoichiometry and conformation of xanthan in synergistic gelation with locust bean gum or konjac glucomannan—evidence for heterotypic binding. *Macromolecules* 28, 8308–8320.
- Goycoolea, F.M., Morris, E.R., Gidley, M.J., 1995b. Screening for synergistic interactions in dilute polysaccharide solutions. *Carbohydr. Polym.* 28, 351–358.
- Gumbleton, M., Stephens, D.J., 2004. Coming out of the dark: the evolving role of fluorescence imaging in drug delivery research. *Adv. Drug Delivery Rev.* 57, 5–15.
- Hwang, J.K., Shin, H.H., 2000. Rheological properties of chitosan solutions. *Korea-Aust. Rheol. J.* 12, 175–179.
- Jacon, S.A., Rao, M.A., Cooley, H.J., Walter, R.H., 1993. The isolation and characterization of a water extract of konjac flour gum. *Carbohydr. Polym.* 20, 35–41.
- Katsuraya, K., Okuyama, K., Hatanaka, K., Oshima, R., Sato, T., Matsuzaki, K., 2003. Constitution of konjac glucomannan: chemical analysis and C-13 NMR spectroscopy. *Carbohydr. Polym.* 53, 183–189.
- Kumar, M.N.V.R., Kumar, N., 2001. Polymeric controlled drug-delivery systems: perspective issues and opportunities. *Drug Development Ind. Pharm.* 27, 1–30.

- Lapasin, R., Pricl, S., 1995. Rheology of polysaccharide systems. In: Lapasin, R., Priels, S. (Eds.), *Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications*. Chapman & Hall, London, pp. 250–267.
- Liu, Z.L., Hu, H., Zhuo, R.X., 2004. Konjac glucomannan-graft-acrylic acid hydrogels containing azo crosslinker for colon-specific delivery. *J. Polym. Sci. Polym. Chem.* 42, 4370–4378.
- Millane, R.P., Wang, B., 1990. A Cellulose-like conformation accessible to the xanthan backbone and implications for xanthan synergism. *Carbohydr. Polym.* 13, 57–68.
- Miyoshi, E., Nishinari, K., 1999. Non-Newtonian flow behaviour of gellan gum aqueous solutions. *Colloid Polym. Sci.* 277, 727–734.
- Nakajima, N., Ishihara, K., Matsuura, Y., 2002. Dietary-fiber-degrading enzymes from a human intestinal *Clostridium* and their application to oligosaccharide production from nonstarchy polysaccharides using immobilized cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 182–189.
- Nakajima, N., Matsuura, Y., 1997. Purification and characterization of Konjac glucomannan degrading enzyme from anaerobic human intestinal bacterium, *Clostridium butyricum*, *Clostridium beijerinckii* group. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 1739–1742.
- Oblonsek, M., Sostar-Turk, S., Lapasin, R., 2003. Rheological studies of concentrated guar gum. *Rheol. Acta* 42, 491–499.
- Ozu, E.M., Baianu, I.C., Wei, L.-S., 1993. Physical and chemical properties of glucomannan gels and related polysaccharides. In: Baianu, I.C., Pressen, H., Kmosinski, T.F. (Eds.), *Physical Chemistry of Food Processes*, vol. 2. Van Nostram Reinhold, New York, pp. 487–517.

Paradossi, G., Chiessi, E., Barbiroli, A., Fessas, D., 2002. Xanthan and glucomannan mixtures: synergistic interactions and gelation. *Biomacromolecules* 3, 498–504.

Perry, P.A., Fitzgerald, M.A., Gilbert, R.G., 2006. Fluorescence recovery after photobleaching as a probe of diffusion in starch systems. *Biomacromolecules* 7, 521–530.

Santos, H., Veiga, F., Pina, M.E., Sousa, J.J., 2005. Compaction, compression and drug release properties of diclofenac sodium and ibuprofen pellets comprising xanthan gum as a sustained release agent. *Int. J. Pharm.* 295, 15–27.

Sinha, V.R., Kumria, R., 2001. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. *Int. J. Pharm.* 224, 19–38.

Takigami, S., Phillips, G.O., 1996. The production and quality of Konjac mannan. In: Phillips, G.O., Williams, P.A., Wedlock, D.J. (Eds.), *Gums and Stabilizers for the Food Industry*, vol. 8. IRL Press, Oxford, pp.385–391.

Talukdar, M.M., Kinget, R., 1995. Swelling and drug-release behavior of xanthan gum matrix tablets. *Int. J. Pharm.* 120, 63–72.

Van Tomme, S.R., De Geest, B.G., Braeckmans, K., De Smedt, S.C., Siepmann, F., Siepmann, J., van Nostrum, C.F., Hennink, W.E., 2005. Mobility of model proteins in hydrogels composed of oppositely charged dextran microspheres studied by protein release and fluorescence recovery after photobleaching. *J. Contr. Release* 110, 67–78.

Vendruscolo, C.W., Andreatza, I.F., Ganter, J.L.M.S., Ferrero, C., Bresolin, T.M.B., 2005. Xanthan and galactomannan (from *M-scabrella*)

matrix tablets for oral controlled delivery of theophylline. *Int. J. Pharm.* 296,1–11.

Verkman, A.S., 2002. Solute and macromolecule diffusion in cellular aqueous compartments. *Trends Biochem. Sci.* 27, 27–33.

Vuksan, V., Jenkins, D.J., Spadafora, P., Sievenpiper, J.L., Owen, R., Vidgen, E., Brighenti, F., Josse, R., Leiter, L.A., Bruce-Thompson, C., 1999. Konjac-mannan (glucomannan) improves glycemia and other associated risk factors for coronary heart disease in type 2 diabetes. A randomized controlled metabolic trial. *Diabetes Care* 22, 913–919.

Vuksan, V., Sievenpiper, J.L., Owen, R., Swilley, J.A., Spadafora, P., Jenkins, D.J., Vidgen, E., Brighenti, F., Josse, R.G., Leiter, L.A., Xu, Z., Novokmet, R., 2000. Beneficial effects of viscous dietary fiber from Konjac-mannan in subjects with the insulin resistance syndrome: results of a controlled metabolic trial. *Diabetes Care* 23, 9–14.

46 F. Alvarez-Manceñido et al. / *International Journal of Pharmaceutics* 316 (2006) 37–46

Walpole, R.E., Myers, R.H., Myers, S.L., 1998. In: Walpole, R.E. (Ed.), *Probability and Statistics for Engineers and Scientists*, 6th ed. Prentice Hall International Inc., New York, p. 235.

Wang, K., He, Z.M., 2002. Alginate-konjac glucomannan-chitosan beads as controlled release matrix. *Int. J. Pharm.* 244, 117–126.

Wedekind, P., Kubitscheck, U., Peters, R., 1994. Scanning microphotolysis—a new photobleaching technique based on fast intensity modulation of a scanned laser-beam and confocal imaging. *J. Microsc.* (Oxford) 176, 23–33.

Williams, M.A.K., Foster, T.J., Martin, D.R., Norton, I.T., Yoshimura, M., Nishinari, K., 2000. A molecular description of the gelation mechanism of konjac mannan. *Biomacromolecules* 1, 440–450.

Yaseen, E.I., Herald, T.J., Aramouni, F.M., Alavi, S., 2005. Rheological properties of selected gum solutions. *Food Res. Int.* 38, 111–119.

**KONJAC GLUCOMANNAN AND
KONJAC GLUCOMANNAN/
XANTHAN MIXTURES
AS EXCIPIENTS FOR CONTROLLED
DRUG DELIVERY SYSTEMS.
DIFFUSION OF SMALL DRUGS**

Under review in International Journal of Pharmaceutics
Felipe Alvarez-Manceño¹, Mariana Landin^{1*}, Igor Lacik², Ramón
Martínez-Pacheco¹

¹*Departamento Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia,
Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, España.*

²*Dept. of Special Polymers and Biopolymers, Polymer Institute of the Slovak
Academy of Sciences. Dubravská cesta 9, 84236 Bratislava, Slovakia*

Abstract

Konjac glucomannan (KGM) is a neutral polysaccharide with interesting properties as gelling agent and thickener that has been proposed as an excipient for drug delivery systems. In this study, aqueous systems (0.5% w/v) of KGM from the three main different areas for excipient harmonization and their mixtures with xanthan gum (XG) at different ratios were evaluated as regard their rheological properties at physiological temperature.

Rheological data illustrate significant variability in used KGMs that can be attributed to its differences in the acetylation degree. KGM and XG interact synergically for two of the KGMs studied (Japanese and European varieties) exhibiting a maximum at a ratio 1:1 while American KGM does not show such effect giving only viscous solutions but not gels at any ratio. Systems of KGM/XG ratio with the best rheological properties were selected and drug diffusion coefficients of two model drugs theophylline and diltiazem HCl, different in molecular size and net charge, were evaluated. Drug diffusion experiments demonstrate that the presence of XG in KGM/XG systems determines drug diffusion rate. Moreover, the gel formation contributes to control drug mobility for both diltiazem HCl and theophylline pointing out the potential utilization of mixtures of some KGM types with xanthan gum to develop delivery systems capable to

maintain physical integrity and drug release control for up to 8-hour period.

5.1. Introduction

Konjac glucomannan (KGM) is a natural neutral polysaccharide frequently used as an ingredient in the food area as gelling agent or thickener. Little attention has been paid to its applications in the pharmaceutical area since the 70's when konjac gels were evaluated as excipients for sustained release of dibucaine and theophylline (Nakano et al., 1979a; Nakano et al., 1979b; Nakano et al., 1979c). Recent studies on KGM have also demonstrated its utility as controlled release excipient for hormones (Gonzalez et al., 2004) and some macromolecules as dextrans, insuline and bovine serum albumine (Wang and He, 2002; Liu et al., 2004; Alvarez-Manceñido et al., 2006). Furthermore its peculiar biodegradability turns it into a promising candidate for colonic drug delivery purposes (Nakajima and Matsuura, 1997; Nakajima et al., 2002). The synergistic interaction between KGM and other gelling polysaccharides (agarose, κ -carrageenan, gellan gum) or non gelling polysaccharides (xanthan gum, acetan) has been pointed out by different authors (Goycoolea et al., 1995a; Miyoshi et al., 1996; Miyoshi et al., 1997; Ridout et al., 1998; Chandrasekaran et al., 2003; Penroj et al., 2005).

Those combinations yield the formation of strong and thermoreversible hydrogels even under conditions at which the components alone do not gel (Morris, 1995). Among those polysaccharides, xanthan gum (XG) seems to be very interesting due to its well known properties as pharmaceutical excipient due to formation of the

hydrophilic matrix systems following zero order or almost time independent release kinetics (Talukdar and Kinget, 1995; Talukdar et al., 1996; Talukdar and Kinget, 1997).

Synergistic interaction between KGM and XG is potentially useful to develop controlled release formulations. When a solid dosage form based on KGM/XG is placed into an aqueous environment, it absorbs water from the medium and forms a gel through which the drug is released. A key aspect from a pharmaceutical point of view, if we like to modulate drug delivery, is to know and understand how diffusion of the drug it is influenced by the structure of the polymer network.

In a previous paper (Alvarez-Manceñido et al., 2006), the diffusion of macromolecules as dextrans in KGM and KGM/XG systems was evaluated by fluorescence recovery using the photobleaching technique. Results indicated that rheological properties cannot be used to predict changes in the diffusivities of large molecules through KGM/XG systems and that the size of the diffusing drug is an important factor. A crowding or a sieving mechanism was involved in controlling macromolecules diffusion.

There are not any data in the literature about the properties of KGM/XG binary systems at physiological temperature or about its effects on the small molecules release.

On this basis, the goals of the present study were: a) to investigate KGM intermanufacturing variability by using konjac glucomannan from the three main areas for excipient harmonization: Japan, Europe and America; b) to evaluate, from the rheological point of view, the interactions of KGM from different sources with xanthan gum in order to

establish the optimum ratio of KGM/XG to produce the strongest gels at physiological temperature, and c) to study the effect of the interaction between KGM/XG polysaccharides on the diffusion process of two small model drugs, theophylline and diltiazem HCl, different in net charge and molecular weight.

5.2. Materials and methods

5.2.1 Raw materials.

Konjac glucomannans from different suppliers and geographical origins: American (Triple Crown America Inc. Lot. 3500C), European (Escuder, Spain, Lot. 019), Japanese (Propol A®, Lot. AKG07) and Xanthan gum (Guinama, Spain, Lot: 016) were studied as received.

Theophylline anhydrous (Lot. 102K0547) was supplied by Sigma, USA and Diltiazem hydrochloride European Pharmacopoeia compliant (Lot. 0307362) was provided by Roig-Farma, Spain.

5.2.2 Gel permeation chromatography (GPC).

Molecular weight distributions of KGMs, being neutral polysaccharides, were analyzed by employing the aqueous-phase gel permeation chromatography (GPC). Samples at a concentration of ~ 1mg/mL were prepared in 0.1 M Na₂HPO₄ and injected onto Waters GPC setup consisting of degasser, 515 pump, Rheodyne injector 7725i with 200 µL loop, and differential refractive detector DRI 2400. Separation was performed on Suprema column system using 8 x 50 mm guard column and 8 x 300 mm Suprema 1000 and 3000 Å columns (PSS Germany) with particle sizes 10 µm. Eluent of composition 0.1 M Na₂HPO₄ with 100 ppm NaN₃ was flowing at 1 ml/min and flow rate was controlled by ethylene

glycol added to each sample in a minute amount used as a flow standard. The GPC system was calibrated using the 3rd polynomial fit to calibration curve made of dextran standards from American Polymer Standards Corp. (Ohio, USA) with the weight average molecular weights between 3 500 and 2200000 g/mol. Thus the molecular weight of KGMs reported in this work should be considered as the effective ones towards the dextran standards. Data acquisition and evaluation was performed by means of PSS WinGPC7.0 (PSS Germany).

5.2.3. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR).

Transmittance spectra from KGM samples in KBr disks were recorded by a Bruker IFS-66v (Germany) in the range from 400 to 4000 cm⁻¹.

5.2.4 Preparation and rheological characterization of the KGM, XG and KGM/XG systems.

Polysaccharide systems were prepared in distilled water at a total concentration of 0.5% (w/v) by mechanical stirring for one hour at 85 °C in an hermetic container. In order to evaluate the interaction between KGM and XG, several weight ratios (1:0 3:1, 1:1, 1:3 and 0:1) were prepared keeping total polysaccharide concentration at 0.5% (w/v). Solutions were left to cool and equilibrate overnight and its rheological properties characterized using a rheometer AR1000-N (TA instruments, Newcastle, UK) fitted with a cone and plate geometry (2° cone angle, 60 mm diameter, 59 μm gap).

Steady-shear measurements and dynamic rheological characterization were carried out at least in triplicate at 37 °C.

Macroviscosities of glucomannan dispersions were determined from steady-shear measurements using a logarithmic torque ramp in order to decrease the initial acceleration and the effects of inertia.

Experimental data were fitted to the Newtonian or the Cross model (Barnes, 2000) from which viscosity or zero shear rate viscosity (η_0), consistency (K) and shear rate index (m) were obtained, respectively, as previously described (Alvarez-Manceñido et al., 2006).

Dynamic rheological characterization started with torque sweeps to ensure operation within the linear viscoelastic region of the viscoelastic samples. The extension of the linear viscoelastic regime has been determined under oscillatory shear conditions at a frequency of 1 rad/s. Dynamic frequency sweep experiments were carried out at a constant strain amplitude within the limits of the linear viscoelastic region in the range of 0.1-100 rad/s.

For the gel systems preheating of the rheometer peltier plate above gel temperature was needed to avoid the appearance of harmonic signals.

Samples were covered with a thin layer of paraffin oil to limit evaporation.

5.2.5 Drug diffusion measurements on KGM, XG and KGM/XG systems.

Diffusion coefficients of two different drugs, anhydrous theophylline and diltiazem hydrochloride, were estimated as previously described (Alvarez-Lorenzo et al., 1999). Diltiazem hydrochloride or anhydrous theophylline were added to the prepared KGM or KGM/XG systems at a total drug concentration of 0.05% w/v and 0.02% w/v, respectively. Drug loaded systems were stirred at 85 °C for five extra

minutes in order to ensure homogenous drug distribution and allowed to cool and equilibrate in a water bath at 37 °C.

Assays for the characterization of the diltiazem or theophylline release from the studied systems were performed in triplicate in Franz-Chien vertical diffusion cells (Vidra Foc, Spain) fitted with 0.45 µm pore size cellulose acetate membrane filters (Albet AC-045-25-BL, Spain) between the donor and the recipient compartments. A test formulation sample of 2.0 mL was placed at the donor compartment. The recipient compartment, containing 5.8 mL of distilled water or isoosmotic NaCl solution, was thermostated at 37 °C and stirred with a magnetic bar. The surface available for diffusion was 0.785 cm². Samples of 0.5 mL were taken from the recipient compartment at given intervals over the 8-hour period and immediately replaced with the same volume of fresh thermostated medium, which assures full contact between the test formulation and receptor liquid. Samples were analyzed spectrophotometrically in a diode array spectrophotometer (Agilent Technologies 8453, Germany) at 272 nm and 237 nm for theophylline and diltiazem, respectively. For each experiment, the cumulative percentage of drug released was calculated using validated calibration curves and diffusion coefficients estimated by fitting the experimental data to the Higuchi equation (Higuchi, 1962):

$$\frac{Q}{A} = 2 \cdot C_0 \sqrt{\frac{D \cdot t}{\pi}} \quad (\text{eq. 1})$$

Q is the amount of drug (theophylline or diltiazem) in milligrams released by time t (s), A is the diffusion area (cm²), C₀ is the initial

concentration of drug in the formulation (mg/mL) and D is the diffusion coefficient (cm^2/s)

The microviscosities of these systems were calculated using the Stokes-Einstein relation (Armstrong et al., 1987):

$$\frac{D_0}{D} = \frac{\eta}{\eta_0} \quad (\text{eq. 2})$$

Where, D and D_0 are diffusion coefficients (cm^2/s) of the drug in the presence and absence of polymer, respectively, and η and η_0 are the viscosities (mPa.s) of the polysaccharide dispersion (microviscosity) and medium without polymer, respectively.

5.2.6 Statistical analysis

The statistical package SPSS 13.0 for Windows was used to study the variability among the different KGM formulations by the analysis of variance (ANOVA) test and *post hoc* comparisons among pairs by Scheffé tests ($\alpha < 0.05$) (Bolton, 1997).

5.3. Results and discussion

5.3.1 Characterization of the KGM or XG single systems at physiological temperature

In order to explore the utility of KGM and KGM/XG systems as pharmaceutical controlled delivery systems, it is necessary to characterize their rheological behaviour at physiological temperature and to establish its influence on the diffusion of small molecules through them.

Flow experiments, shown in Figure 5.1, were carried out at 37 °C for the solutions of American, European and Japanese KGMs at a concentration of 0.5% w/v.

Flow profiles of KGM systems at 37°C were similar to those previously obtained at 25°C (Alvarez-Manceñido et al., 2006). European and Japanese (0.5%w/v) KGMs clearly show the shear thinning behaviour at high shear rates after the initial Newtonian region at low shear rates, which is in agreement with previous findings (Jacon et al., 1993). On the other hand, the American KGM shows a non-typical (for KGMs) Newtonian behaviour with the constant apparent viscosity indicating the shear stress being proportional to the shear rate.

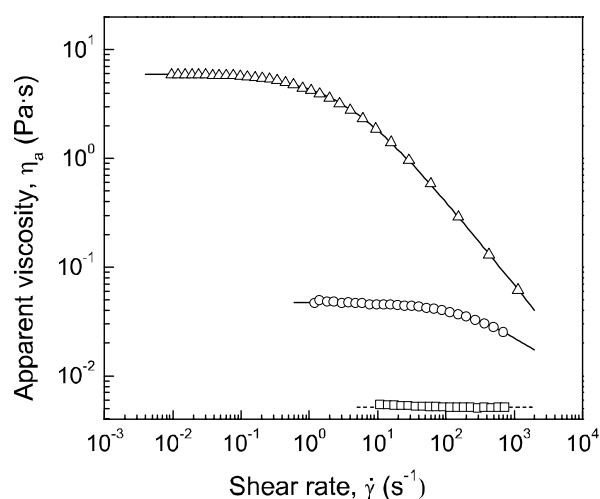


Figure 5.1. Flow curves for 0.5% Konjac glucomannan solutions at 37 °C. Symbols: Japanese KGM (triangles), European KGM (circles) and American KGM (squares). Full lines represent Cross model predictions and dashed line Newtonian model prediction.

Table 5.1 presents the parameters derived from fitting Newtonian and Cross models to the rheological data at 37°C and, for comparison, also the viscosities determined at 25°C in our previous work (Alvarez-Manceñido et al., 2006). It can be seen that an increase in temperature by

12°C causes an important reduction in the viscosity values for all glucomannans studied and especially for the xanthan gum system.

Samples	Model	η (Pa s)	K (s)	m	Standard Error ^a	η (Pa s) at 25°C*
American KGM	Newtonian	0.005 (0.000)	-	-	2.410	0.007
European KGM	Cross	0.046 (0.001)	0.003 (0.000)	0.953 (0.011)	5.739	0.103
Japanese KGM	Cross	5.651 (0.474)	0.286 (0.006)	0.779 (0.009)	3.556	9.471
XG	Cross	10.442 (0.766)	11.95 (1.107)	0.753 (0.004)	4.720	32.25

$$^a\text{Standard Error} = \frac{\left[\frac{\sum_{i=1}^n (x_{\text{exp},i} - x_{\text{cal},i})^2}{n-2} \right]^{1/2}}{\text{Range}(x_{\text{exp}})} \times 1000 \quad * \text{from Alvarez-Manceñido et al., 2006}$$

Table 5.1. Zero shear rate viscosity (η), shear rate index (m) and consistency (K) obtained by fitting steady shear measurements to Newtonian or Cross model parameters for the American, European and Japanese KGMs and XG solutions (0.5% w/v) at 37 °C. Standard deviations in parentheses.

Rheological properties of konjac glucomannan are considerably different according to the methods of preparation, the strain and the producing areas of *Amorphophallus k.* tubers (Kishida, 1979). The different rheological properties have been either related to the molecular weight variability (Zhang et al. 2001) or to the acetylation degree of KGMs (Maekaji, 1974). Might surprisingly in terms of the rheological data, the GPC elution curves (and, derived effective molecular weight distributions) in Figure 5.2 show a close agreement among all the KGMs (American KGM: $\overline{M}_w \sim 5.4 \times 10^6$ g/mol, polydispersity ~ 8 ; European

KGM: $\overline{M}_w \sim 5.3 \times 10^6$ g/mol, polydispersity ~ 7 , Japanese KGM: $\overline{M}_w \sim 4.7 \times 10^6$ g/mol, polydispersity ~ 7), which suggests that the variation in molecular weight cannot explain the strong variability in rheological profiles seen in Figure 5.1

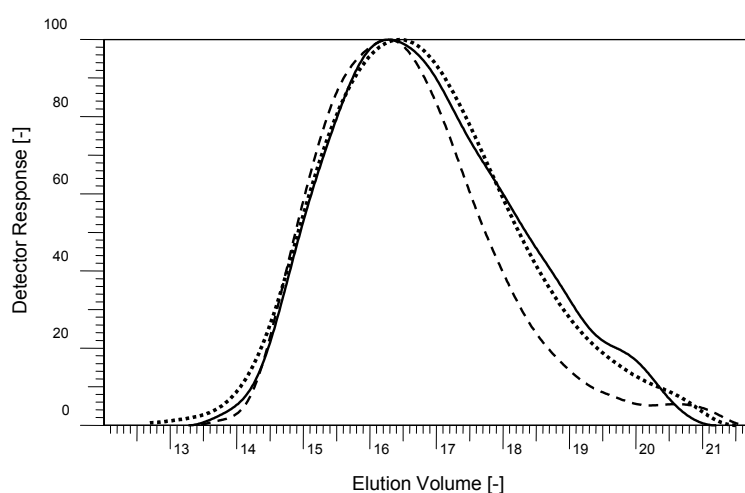


Figure 5.2. Elution curves for Japanese-KGM (solid line), European-KGM (dashed line) and American-KGM (dotted line) at 25°C in 0.1 M Na_2HPO_4 .

Therefore the differences among the KGMs have been assigned to be dominated by their chemical composition, particularly to the content of acetyl groups.

Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) spectra show (Figure 5.3) the absence of the peak at 1730 cm^{-1} for the American variety as the main difference between KGMs, which has been assigned to the acetyl group (Zhang et al, 2001) and related to the capacity of water absorption and gel formation (Williams et al., 2000).

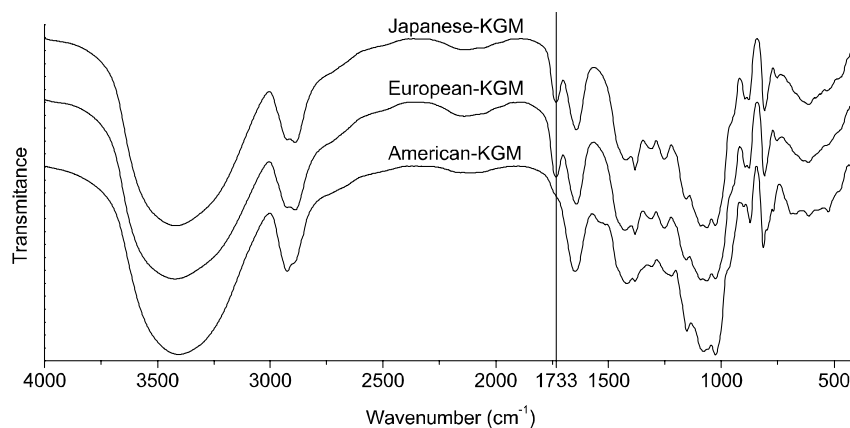


Figure 5.3. FTIR spectra of KGM samples from different suppliers.

The information on rheological variations among KGMs from different suppliers could be a priori determinant of its behaviour as controlled delivery systems. This is because the magnitude of zero-shear rate viscosity is, in fact, a macroscopic representation of microstructural nature of biopolymers. Diffusion coefficient (D) and dynamic viscosity (η) are indirectly related through the well-known Stokes-Einstein relationship (Cheng et al., 2002). If diffusion of diltiazem and theophylline through this type of systems is governed just by Stokes-Einstein equation, significant differences in diffusion coefficients should be expected with respect to the variability in viscosity. Additionally, the highest value found for the XG system (Table 5.1) suggests that diffusion of small molecules should be highly influenced by the presence of XG in the mixtures.

Dynamic viscoelastic characterization of the solutions of individual polysaccharides at 0.5% (w/v) polymer concentration at 37°C is presented in Figure 5.4. The frequency dependence of the elastic (G') and viscous (G'') moduli obtained for all the systems at physiological temperature is typical for polysaccharide solutions in the dilute (circles and squares of

Figure 4a; negligible G' values) or concentrated (triangles of Figure 5.4a and Figure 5.4b) regimes (Nishinari, 2000). Profiles at 37°C agree with our previous results at 25 °C (Alvarez-Manceñido et al., 2006). Obviously, lower values of elastic and viscous moduli were obtained in this work indicating the effect of an increased temperature on rheology of KGMs solutions.

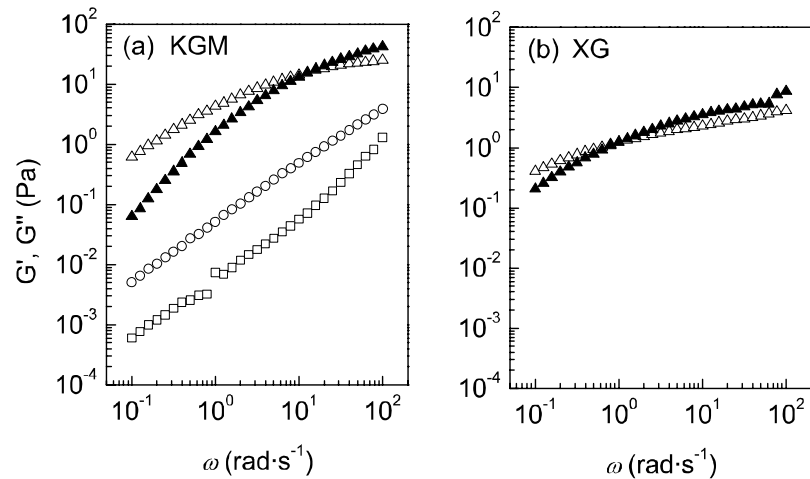


Figure 5.4. Dynamic elastic (G') and viscous (G'') moduli at 37 °C as a function of frequency of (a) 0.5% w/v KGM systems: (triangles) Japanese KGM, (circles) European KGM, (squares) American KGM and (b) 0.5% w/v xanthan gum system. (Closed symbols - G' ; open symbols - G'').

At physiological temperature, none of the solutions of individual polysaccharides can be considered as gels from the rheological point of view. This statement follows the Almdal and co-workers' considerations (Almdal et al., 1993).

5.3.2 Characterization of the KGM/XG binary systems at physiological temperature

When XG is present within the polysaccharide system composition, the rheological response undergoes a great change. Figure 5.5 depicts the mechanical spectra for different ratios of the KGM/XG systems at 0.5% (w/v) total polysaccharide concentration.

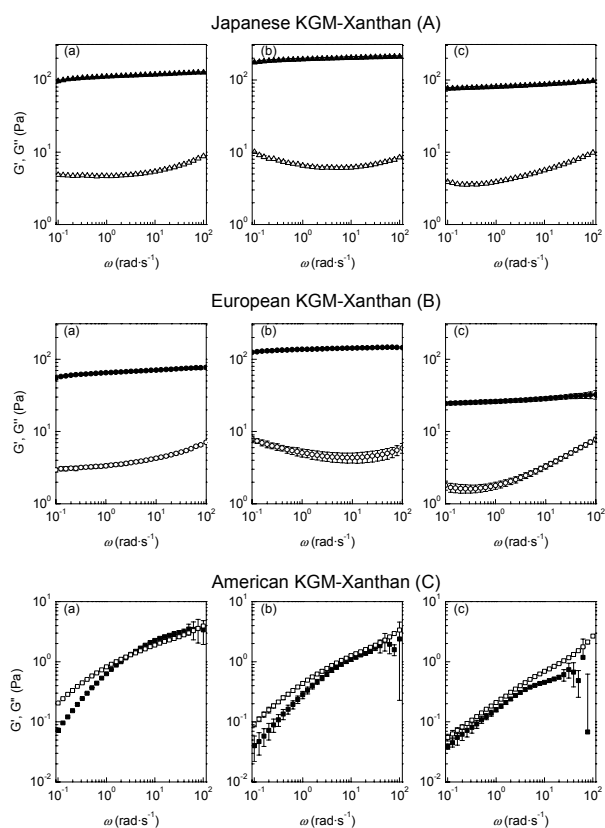


Figure 5.5. Dynamic elastic (G' ; closed symbols) and viscous (G'' ; open symbols) moduli as a function of frequency for 0.5% w/v KGM/XG systems at 37 °C for the different KGMs studied. (a) KGM/XG ratio 3:1; (b) KGM/XG ratio 1:1 and (c) KGM/XG ratio 1:3.

It has been described that synergistic effect between polysaccharides can be recognised as an enhancement in viscosity values in dilute solutions or even as an unexpected gelation at higher polysaccharide concentrations (Morris, 1995). The Japanese and the European KGM/XG systems showed a definite shape. A clear synergistic effect can be observed (figure 5.5A and 5.5B) for all the compositions studied. G' exceeds G'' throughout the accessible frequency range and the relative magnitude of both moduli is roughly independent of the frequency within a few orders of magnitude. From a rheological point of view, they can be considered as true gels (Almdal et al., 1993).

Interactions between KGM and other anionic polysaccharides similar to XG have generated great scientific interest and discussion (Ridout et al., 1998; Chandrasekaran et al., 2003; Ridout et al., 2004). The synergistic interaction is manifested as a maximum value in both G' (Figure 5.6a) and G'' (Figure 5.6b) at a mixing ratio 1:1 for KGMs from Japanese and European KGMs, which corresponds to previous results from other authors. DSC and rheology measurements have shown that there is an evidence for the intermolecular binding in xanthan-konjac mannan gels with maximum in the enthalpy change and the storage modulus at the 1:1 stoichiometry ratio (Tako, 1993; Goycoolea et al., 1995b; Paradossi et al., 2002).

On the contrary, the presence of XG in the American KGM binary systems results in an important increase in both G'' and G' compared to the solution of the American KGM (Figure 4). However, they cannot be considered as true gels at any ratio because G'' and G' showed a strong frequency dependence in almost the whole frequency range and G' does

not exceed G'' , both features being characteristic for the non gelled systems. American-KGM/XG systems (Figures 6a and 6b) did not show a maximum G' or G'' at any composition studied suggesting that there is no positive deviation from additivity.

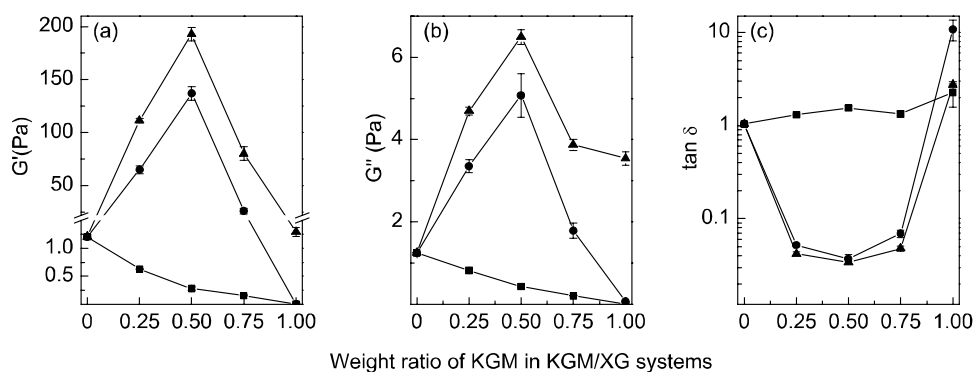


Figure 5.6. Dynamic elastic (G'), viscous (G'') moduli and $\tan \delta$ as function of the mixing ratio in 0.5 % w/v KGM/XG systems at 1 rad/s for the three varieties of KGM studied at 37 °C: (triangles) Japanese KGM, (circles) European KGM, (squares) American KGM.

The variation in the relative contributions of the liquid-like and solid-like responses with increasing the ratio of KGM in the binary mixtures can be evaluated through the $\tan \delta$ parameter introduced in Figure 5.6c. For Japanese KGM/XG and European KGM/XG, the gel like character is manifested by $\tan \delta$ values lower than 0.1 presenting a minimum value at a ratio 1:1 stoichiometry of 0.034 and 0.037 respectively. For the American-KGM/XG systems, however, $\tan \delta$ lie around 1 for all ratios indicating that the values of G' and G'' are very close to each other and that those systems do not behave as true gels at any ratio. Again, the possible explanation for the different behaviour of the American KGM could lie in its lower acetylation degree compared to the

Japanese and European KGMs detected by FTIR. (Maekaji, 1974; Zhang et al, 2001).

Importantly, the differences between (0.5% w/v) American KGM/XG (1:1) system properties at 25°C (Alvarez-Manceñido et al., 2006) and 37°C suggest that temperature is a critical parameter in this range generating a great performance change (gel like to liquid like) for the American KGM/XG combinations which should be considered when this KGM was used in the development of controlled dosage forms.

From our rheological results, KGM/XG systems in a ratio 1:1 were selected to carry out drug diffusion experiments, as it produces hydrogels or physically cross-linked networks rigid enough to maintain their structure under small stress (Erós et al, 2003).

5.3.3 Drug release from single and binary systems

A key-factor in determining the drug release rate from pharmaceutical preparations after administration is the drug diffusion rate in the gel formed on hydration of the polymer component of the formulation (Alvarez-Lorenzo et al., 1999). Among the models developed to describe the time course of the release process (Costa et al., 2001), the simplified Higuchi model (eq. 5.1) allows to directly compare drug diffusion coefficients (D) in different systems. Diltiazem HCl and Theophylline release profiles fit Higuchi equation ($r^2 > 0.99$, $\alpha < 0.05$), which is an indicative of the fickian diffusion process, allowing diffusion coefficients calculation for both drugs in KGM, XG and KGM/XG systems (Table 5.2). As an example, two diltiazem HCl release profiles from European KGM and European KGM/XG systems are shown in Figure 5.7.

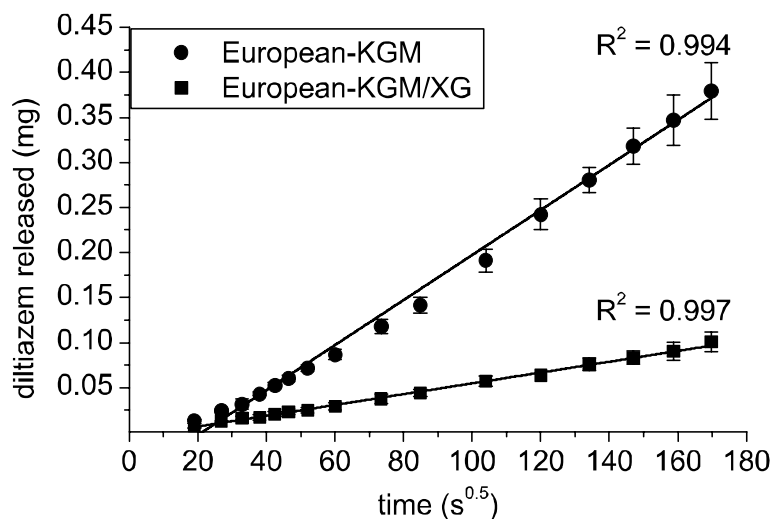


Figure 5.7. Squared root fitting for diltiazem HCl release profile at 37 °C for the European-KGM and European KGM/XG systems.

Quantification of diffusion coefficients allowed to make the estimate of microviscosity values from Stokes Einstein relation (eq. 5.2) which has been related to the resistance to diffusion offered by the medium (Alvarez-Lorenzo et al., 1999). It can be seen that diffusion coefficients listed in Table 5.2 are higher for theophylline than for diltiazem HCl which can be partially explained by the size of the drug in the KGM solutions. The molecular weight and radius of the diltiazem HCl (450.98 g/mol and 4.24 Å) are greater than theophylline ones (180.17 g/mol and 3.78 Å) (Peppas et al., 1999) meaning a higher difficulty for diffusion of the diltiazem HCl in the same medium but certainly the interaction between the net positive charge of the diltiazem and the negative charge of the gels should justify the lower drug diffusion rate for this molecule. Ion-ion interactions between charged polymers and drugs have been reported by different authors (Seki et al., 2003; Bonferoni et al., 2000; Sousa et al.,

2005; Cornejo-Bravo et al., 2005). The effect of which should be considered in the development of delivery systems with this kind of materials.

Microviscosities obtained in all KGMs and XG solutions from diltiazem and theophylline diffusion coefficients (Table 5.2) were lower than the macroviscosities (Table 5.1) as has also been found in gels of hydroxypropylcellulose (Alvarez-Lorenzo et al., 1999) and chondroitin sulphate solutions (Seki et al., 2003). No linear correlation between macroviscosities from flow rheology experiments (Table 5.1) and microviscosities (Table 5.2) could be established for the solutions of individual polysaccharides. Stokes Einstein equation, widely used as a routine predictor of drug mobility, can not explain drug diffusion results in agreement with other authors data on aqueous HPMC and PVP solutions (Desmidt et al., 1986; Alvarez-Lorenzo et al., 1999).

It is interesting to note that among the solutions of individual polysaccharides, XG solution exhibits the highest resistance to drug molecule diffusion. As a consequence, when XG was present as the constituent of the polysaccharide system, diffusion coefficients were statistically significantly reduced and close to the D values in the XG solutions clearly indicating that the structure of the XG polymer determines drug mobility.

	Diltiazem HCl		Theophylline	
	D (x10 ⁶) (cm ² /s)	η (mPa.s)	D (x10 ⁶) (cm ² /s)	η (mPa.s)
Single system				
Japanese-KGM	11.15 (3.26)	6.49 (1.85)	13.62 (3.57)	6.69 (1.76)
European-KGM	29.87 (4.33)	2.33 (0.33)	56.19 (6.84)	1.55 (0.18)
American-KGM	25.39 (2.12)	2.70 (0.24)	35.24 (7.89)	2.55 (0.55)
XG	3.65 (0.30)	18.81 (1.50)	9.72 (0.48)	8.91 (0.45)
Binary system				
Japanese-KGM /XG	3.49 (0.48)	19.86 (2.65)	8.72 (0.38)	9.93 (0.43)
European-KGM/XG	4.05 (0.33)	16.98 (1.34)	9.70 (0.14)	8.92 (0.13)
American-KGM/XG	5.18 (0.84)	13.43 (1.99)	14.74 (0.56)	5.87 (0.22)

Table 5.2. Diffusion coefficients (D) (cm²/s) and microviscosities (η) (mPa.s) for diltiazem HCl and theophylline through the polysaccharide systems studied at 37°C (0.5% w/v total polysaccharide concentration) Standard deviations in parentheses.

Variations in diffusion coefficients between KGM/XG systems for a specific drug are also statistically significant. Scheffé tests indicated that the American-KGM/XG systems, which rheologically cannot be considered as gels, show significantly higher drug diffusion coefficients than KGM/XG systems for Japanese and European KGM types. This suggests that either more entanglement points or a stronger gel network improve the control over drug release by a crowding or a sieving mechanism as pointed out for macromolecules diffusion through this kind of systems (Alvarez-Manceño et al., 2006).

KGM/XG gels elaborated with both, Japanese and European varieties, control drug release as XG systems but maintaining physical integrity, which is an advantage for control drug release purposes.

In conclusion, rheological characterization of glucomannans of a different origin at physiological temperature corroborates the importance of considering the variability of KGM. The specifications for KGM materials are therefore highly required. Variations between polysaccharides in the degree of acetylation strongly influence the interactions between KGM and XG. The Japanese and European KGMs show a synergistic interaction at a ratio 1:1 giving strong gels at a total polysaccharide concentration of 0.5% (w/v) and 37°C. On the contrary, American KGM does not show such a synergistic effect giving viscous solutions at any ratio.

Drug diffusion experiments demonstrate that XG addition determines the drug diffusion rate in the KGM/XG systems. Additionally, the gel formation contributes to the control of drug mobility for both diltiazem HCl and theophylline. The mixtures of two KGMs used in this study, namely the Japanese and European KGMs, with xanthan gum were found useful to develop delivery systems capable to maintain physical integrity and drug release control for up to 8-hour period.

5.4 Acknowledgments

Authors thank the Xunta de Galicia for the financial support PGIDIT05BTF20301PR. Felipe Alvarez Manceñido thanks the Xunta de Galicia for his predoctoral grant. Authors gratefully acknowledge Shimizu Chemical Corporation (Japan) for the Propol A[®] sample.

5.5 References

- Almdal,K., Dyre,J., Hvidt,S., Kramer,O., 1993. Towards a phenomenological definition of the term 'gel'. *Polym. Gels Networks*, 1, 5-17.
- Alvarez-Lorenzo,C., Gomez-Amoza,J.L., Martinez-Pacheco,R., Souto,C., Concheiro,A., 1999. Microviscosity of hydroxypropylcellulose gels as a basis for prediction of drug diffusion rates. *Int. J. Pharm.*, 180, 91-103.
- Alvarez-Manceñido,F., Braeckmans,K., De Smedt,S.C., Demeester,J., Landin,M., Martinez-Pacheco,R., 2006. Characterization of diffusion of macromolecules in konjac glucomannan solutions and gels by fluorescence recovery after photobleaching technique. *Int. J. Pharm.*, 316, 37-46.
- Armstrong,N.A., Gebremariam,T., James,K.C., Kearney,P., 1987. The Influence of Viscosity on the Migration of Chloramphenicol and 4-Hydroxybenzoic Acid Through Glycerogelatin Gels. *J. Pharm. Pharmacol.*, 39, 583-586.
- Barnes,H.A., 2000. A handbook of elementary rheology. 1 Ed., The University of Wales Institute on Non-Newtonian Fluid Mechanics, Aberystwyth,Wales.
- Bolton S. 1997. *Pharmaceutical statistics: practical and clinical applications*. 3rd ed. Swarbrick, J. (Ed). Marcel Dekker Inc. New York. pp. 265-325.
- Bonferoni,M.C., Rossi,S., Ferrari,F., Bettinetti,G.P., Caramella,C., 2000. Characterization of a diltiazem-lambda carrageenan complex. *Int. J. Pharm.*, 200, 207-216.

- Chandrasekaran,R., Janaswamy,S., Morris,V.J., 2003. Acetan: glucomannan interactions - a molecular modeling study. *Carbohydr. Res.*, 338, 2889-2898.
- Cheng,Y., Prud'homme,R.K., Thomas,J.L., 2002. Diffusion of mesoscopic probes in aqueous polymer solutions measured by fluorescence recovery after photobleaching. *Macromolecules*, 35, 8111-8121.
- Cornejo-Bravo,J.M., Flores-Guillen,M.E., Lugo-Medina,E., Licea-Claverie,A., 2005. Drug release from complexes with a series of poly(carboxyalkyl methacrylates), a new class of weak polyelectrolytes. *Int. J. Pharm.*, 305, 52-60.
- Costa,P., Manuel,J., Lobo,S., 2001. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 13, 123-133.
- Desmidt,J.H., Fokkens,J.G., Grijseels,H., Crommelin,D.J.A., 1986. Dissolution of Theophylline Monohydrate and Anhydrous Theophylline in Buffer Solutions. *J. Pharm. Sci.*, 75, 497-501.
- Eros,I., Csoka,I., Csanyi,E., Takacs-Wormsdorff,T., 2003. Examination of drug release from hydrogels. *Polym. Adv. Technol.*, 14, 847-853.
- Gonzalez,A., Fernandez,N., Sahagun,A., Garcia,J.J., Diez,M.J., Castro,L.J., Sierra,M., 2004. Effect of glucomannan and the dosage form on ethinylestradiol oral absorption in rabbits. *Contraception*, 70, 423-427.
- Goycoolea,F.M., Morris,E.R., Gidley,M.J., 1995a. Screening for synergistic interactions in dilute polysaccharide solutions. *Carbohydr. Polym.*, 28, 351-358.
- Goycoolea,F.M., Richardson,R.K., Morris,E.R., Gidley,M.J., 1995b. Stoichiometry and conformation of xanthan in synergistic gelation with

locust bean gum or konjac glucomannan - evidence for heterotypic binding. *Macromolecules*, 28, 8308-8320.

Higuchi, W.I., 1962. Analysis of data on medicament release from ointments. *Pharm. Sci.*, 51, 802-804.

Jacon, S.A., Rao, M.A., Cooley, H.J., Walter, R.H., 1993. The isolation and characterization of a water extract of Konjac flour gum. *Carbohydr. Polym.*, 20, 35-41.

Kishida, N., 1979. Relationship between the quality of konjac flour and the molecular matter nature of konjac mannan. *Agr. Biol. Chem.*, 43, 2391-2392.

Liu, Z.L., Hu, H., Zhuo, R.X., 2004. Konjac glucomannan-graft-acrylic acid hydrogels containing azo crosslinker for colon-specific delivery. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.*, 42, 4370-4378.

Maekaji, K., 1974. The mechanism of gelation of konjac mannan. *Agr. Biol. Chem.*, 38, 315-321.

Miyoshi, E., Takaya, T., Williams, P.A., Nishinari, K., 1996. Effects of sodium chloride and calcium chloride on the interaction between gellan gum and konjac glucomannan. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 2486-2495.

Miyoshi, E., Takaya, T., Williams, P.A., Nishinari, K., 1997. Rheological and DSC studies of mixtures of gellan gum and konjac glucomannan. *Macromol. Symp.*, 120, 271-280.

Morris, V.J., 1995. Synergistic interactions with galactomannans and glucomannans. In: *Biopolymer Mixtures*. Harding, S.E., Hill, S.E., Mitchell, J.R. (Eds.), Nottingham University Press, Nottingham, 289-313.

Nakajima, N., Ishihara, K., Matsuura, Y., 2002. Dietary-fiber-degrading enzymes from a human intestinal *Clostridium* and their application to

oligosaccharide production from nonstarchy polysaccharides using immobilized cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59, 182-189.

Nakajima,N., Matsuura,Y., 1997. Purification and characterization of konjac glucomannan degrading enzyme from anaerobic human intestinal bacterium, *Clostridium butyricum* *Clostridium beijerinckii* group. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61, 1739-1742.

Nakano,M., Takikawa,K., Arita,T., 1979b. Release Characteristics of Dibucaine Dispersed in Konjac Gels. *J. Biomed. Mater. Res.*, 13, 811-819.

Nakano,M., Takikawa,K., Arita,T., 1979a. Sustained-Release of Dibucaine from Konjac Gels After Rectal Administration to Rats. *Chem. Pharm. Bull.*, 27, 2501-2503.

Nakano,M., Takikawa,K., Juni,K., Arita,T., 1979c. Sustained-Release of Drugs from Konjac Gels .4. Sustained-Release of Theophylline from Konjac Gels. *Chem. Pharm. Bull.*, 27, 2834-2837.

Nishinari,K., 2000. Konjac Glucomannan. In: *Novel Macromolecules in Food Systems*. Doxastakis,G., Kiosseoglou,V. (Eds.), Elsevier, 309-330.

Paradossi,G., Chiessi,E., Barbiroli,A., Fessas,D., 2002. Xanthan and glucomannan mixtures: Synergistic interactions and gelation. *Biomacromolecules*, 3, 498-504.

Peppas,N.A., Keys,K.B., Torres-Lugo,M., Lowman,A.M., 1999. Poly(ethylene glycol)-containing hydrogels in drug delivery. *J. Control. Release*, 62, 81-87.

Penroj,P., Mitchell,J.R., Hill,S.E., Ganjanagunchorn,W., 2005. Effect of konjac glucomannan deacetylation on the properties of gels formed from mixtures of kappa carrageenan and konjac glucomannan. *Carbohydr. Polym.*, 59, 367-376.

- Ridout, M.J., Brownsey, G.J., Morris, V.J., 1998. Synergistic interactions of acetan with carob or konjac mannan. *Macromolecules*, 31, 2539-2544.
- Ridout, M., Cairns, P., Brownsey, G., Morris, V., 2004. Synergistic interactions between the genetically modified bacterial polysaccharide P2 and carob or konjac mannan. *Carbohydr. Res.*, 339, 2233-2239.
- Seki, T., Okamoto, M., Hosoya, O., Aiba, D., Morimoto, K., Juni, K., 2003. Effect of chondroitin sulfate on the diffusion coefficients of drugs in aqueous solutions. *STP Pharma Sci.*, 13, 215-218.
- Sousa, R.G., Prior-Cabanillas, A., Quijada-Garrido, I., Barrales-Rienda, J.M., 2005. Dependence of copolymer composition, swelling history, and drug concentration on the loading of diltiazem hydrochloride (DIL.HCl) into poly [(N-isopropylacrylamide)-co-(methacrylic acid)] hydrogels and its release behaviour from hydrogel slabs. *J. Control. Release*, 102, 595-606.
- Tako, M., 1993. Binding sites for mannose-specific interaction between xanthan and galactomannan, and glucomannan. *Colloid Surf. B-Biointerfaces*, 1, 125-131.
- Talukdar, M.M., Kinget, R., 1997. Comparative study on xanthan gum and hydroxypropylmethyl cellulose as matrices for controlled-release drug delivery .2. Drug diffusion in hydrated matrices. *Int. J. Pharm.*, 151, 99-107.
- Talukdar, M.M., Kinget, R., 1995. Swelling and drug-release behavior of xanthan gum matrix tablets. *Int. J. Pharm.*, 120, 63-72.
- Talukdar, M.M., Michoel, A., Rombaut, P., Kinget, R., 1996. Comparative study on xanthan gum and hydroxypropylmethyl cellulose as matrices for

controlled-release drug delivery .1. Compaction and in vitro drug release behaviour. *Int. J. Pharm.*, 129, 233-241.

Wang,K., He,Z.M., 2002. Alginate-konjac glucomannan-chitosan beads as controlled release matrix. *Int. J. Pharm.*, 244, 117-126.

Williams,M.A.K., Foster,T.J., Martin,D.R., Norton,I.T., Yoshimura,M., Nishinari,K., 2000. A molecular description of the gelation mechanism of konjac mannan. *Biomacromolecules*, 1, 440-450.

Zhang,H., Yoshimura,M., Nishinari,K., Williams,M.A.K., Foster,T.J., Norton,I.T., 2001. Gelation behaviour of konjac glucomannan with different molecular weights. *Biopolymers*, 59, 38-50.

**KONJAC
GLUCOMANNAN/XANTHAN GUM
ENZYME SENSITIVE BINARY
MIXTURES
FOR COLONIC DRUG DELIVERY**

Submitted for publication in Journal of Controlled Release

Felipe Alvarez-Manceño¹, Mariana Landin^{1*}, Ramón Martínez-Pacheco¹

¹*Departamento Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, España.*

Abstract

The polysaccharide konjac glucomannan (KGM) is degraded in the colon but not the small intestine, which makes it potentially useful as an excipient for colonic drug delivery. With xanthan gum (XG) KGM forms thermoreversible gels with hitherto unexplored biodegradation properties. In this work, rheological measurements of KGM and KGM/XG systems incubated with and without *Aspergillus niger* β -mannanase (used to mimic colonic enzymes) showed that KGM was degraded by the enzyme even when interacting with XG. Tablets with KGM/XG/sucrose matrices that varied in accordance with a simplex design and bore diltiazem as a typical highly soluble drug load were prepared by wet granulation, and in most cases were found to possess satisfactory mechanical strength and exhibit slow, nearly zero-order drug release. Drug release from these tablets remained zero-order, but was accelerated (presumably due to degradation of KGM), in the presence of *A. niger* β -mannanase at concentrations equivalent to human colonic conditions. However, marked differences between Japanese and American varieties of KGM as regards degree of acetylation and particle size led to significant differences in swelling rate and drug release between formulations prepared with one and the other KGM: whereas a formulation with Japanese KGM released its entire drug load within 24 h in the presence of β -mannanase, only 60% release was achieved under the same conditions by the corresponding formulation with

American KGM, suggesting that with this KGM it will be necessary to optimize technological variables such as compression pressure in order to achieve suitable porosity, swelling rate, and drug release. To sum up, the results of this study suggest that sustained release of water-soluble drugs in the colon from orally administered tablets may be achieved using simple, inexpensive formulations based on combinations of KGM and XG that take the variability of KGM characteristics into account.

6.1. Introduction

In recent years drug delivery systems based on polysaccharides have been receiving considerable attention, especially as regards their potential for controlled release [1] and the targeting of specific *in vivo* delivery sites [2]. Polysaccharides investigated for colon targeting include amylose, guar gum, pectin, chitosan, inulin, cyclodextrins, chondroitin sulphate, dextrans and locust bean gum. Colon targeting would not only allow local treatment of colonic diseases, but would also constitute a potential alternative route for systemic absorption of drugs, peptides and proteins [3,4]. Ideal colonic drug carriers should conserve their integrity and retain their drug load during passage through the upper gastrointestinal tract (UGIT), but once in contact with colonic fluids and flora should swell and deliver entrapped drug [4]. To reduce the hydrosolubility of polysaccharides in the UGIT while maintaining their propensity to swell and undergo biodegradation in the colon, the two main approaches that have been investigated are chemical modification with specific crosslinkers, and physical interaction between polysaccharides [5,6].

Xanthan gum (XG) is a negatively charged microbial exopolysaccharide consisting of a cellulose backbone and trisaccharide side-chains composed of a glucuronic acid residue between two mannose units. XG solutions have high intrinsic viscosity and exhibit weak gel-like properties at low shear rates, but XG does not form true gels at any concentration or temperature [7]. XG is nevertheless an effective excipient for sustained release formulations, achieving near zero-order drug release kinetics [8]. Drug release from XG matrices is a Fickian diffusion process during the first half of the dissolution period, but during the second is mainly due to the erosion or dissolution of the highly hydrophilic XG [8,9]; it is strongly dependent on the ionic strength of the dissolution medium. The possibility of enhancing the release-control capacity of xanthan gum matrices by strengthening them through interaction with galactomannans, hydroxypropylmethyl cellulose or chitosan has been studied [8,10-12].

Konjac glucomannan (KGM) is a water-soluble polysaccharide used in Asian cuisine. It consists of 1,4-linked β -D-mannose and glucose units in a mole ratio of 1.6:1. It is a slightly branched polymer with acetyl groups on between one-ninth and one-nineteenth of its backbone units [13-15]. These acetyl groups contribute to its solubility and swelling properties and help in making it the soluble fibre with the highest viscosity and water-holding capacity in nature [16-18]. Although unmodified KGM by itself only forms gels that are at best very weak, when modified, or in combination with other polymers, it is of proven efficacy as an excipient for controlled release of hormones [19] and macromolecules such as dextrans, insulin and bovine serum albumin [5,20,21]. In particular, good

drug release behaviour may be expected from the thermoreversible gels it forms with polysaccharides such as κ -carrageenan [22], acetan [23] and XG [24-28]. For example, the release of the typical highly soluble drug diltiazem from KGM/XG gels has been shown to obey Higuchi kinetics indicative of a Fickian diffusion process [29]; and in 24-hour dissolution tests of diltiazem-loaded 1:1 KGM/XG-based tablets, the hydrated layer grows progressively but the gelatinous swollen mass maintains its integrity until the final stage of the test, controlling the zero-order diffusive release of the load [30]. However, KGM varieties from the three main producing areas for excipient harmonization exhibit significant differences in rheology and capacity to interact with another polysaccharide, apparently because of differences in their degree of acetylation [21,29]. In particular, previous studies of the Japanese and American varieties used in the present work found the Japanese variety, which is the more acetylated, to afford more viscous KGM/XG mixtures than the other [29].

KGM is degraded by the action of β -mannanases produced by colonic flora [31], but is not degraded in the small intestine. This suggests the possibility of its use for colonic drug delivery: a sufficiently strong gel formed by a mixture of KGM and another polysaccharide might retain its integrity and its drug load while passing through the UGIT, but gradually release its load when attacked by colonic flora. In the study described in the remainder of this paper we characterized a range of KGM/XG-based diltiazem formulations [30] only studied tablets with a 1:1 KGM:XG ratio, and we investigated the probable behaviour of such formulations in the colon. Specifically, the goals of this study were *a)* to check that KGM and

KGM/XG gels are susceptible to degradation by *Aspergillus niger* β -mannanase, an enzyme employed in previous studies to mimic the colonic biodegradation of mannose-based polysaccharides [32]; *b*) to determine the mechanical properties and drug release profiles of a range of KGM/XG-based matrices containing diltiazem as a model of a highly soluble drug; *c*) to determine, for selected matrix formulations, drug release profiles in simulated colonic medium containing β -mannanase; and *d*) to evaluate the extent to which the above properties are affected by the above-noted differences among KGM brands. Since the 2005 study [30] found that release from 1:1 KGM/XG-based tablets was faster at pH 1.2 than pH 7.5 (which suggests that a gastroresistant coating may be necessary to prevent pre-colonic release), in the present study we only worked at pH 7.5.

6.2. Materials and methods.

6.2.1. Raw materials.

Two KGMs with different suppliers and geographical origins were used: a U.S. brand from Triple Crown America Inc. (Lot 3500C), and the Japanese brand Propol A® (Lot AKG07). These KGMs were characterized in our laboratory as having mean particle sizes of 0.055 mm [standard deviation (SD) 0.049 mm] and 0.176 mm (SD 0.054 mm), respectively, and acetylations of 0.6% and 1.9%, respectively; they were used as received, as was XG, which was supplied by Guinama, Spain (Lot 016). Diltiazem hydrochloride Eur. Ph. was supplied by Roig-Farma, Spain (Lot 0307362), sucrose and magnesium stearate NF by C. Barcia (Spain), and *Aspergillus niger* β -mannanase (specific activity 45 U/mL at

40°C and pH 4.0; Lot 00801) by Megazyme (Ireland). All other reagents were of analytical grade.

6.2.2. Rheological characterization of the enzymatic degradation of KGM solutions and KGM/XG gels.

The degradation of KGM solutions and KGM/XG gels by *A. niger* β -mannanase was evaluated by rheological measurements (when this was possible; see Results and Discussion), the rheological properties of polysaccharides being significantly affected by enzymatic degradation [33,34]. Solutions or gels of KGM and 1:1 KGM/XG mixtures in simulated intestinal fluid (pH 7.5) were prepared at a total polysaccharide concentration of 0.5% (w/v) by mechanical stirring in a hermetic container for 1 h at 85°C and 400 rpm. For viscosimetry, samples were left to cool and equilibrate overnight, 0, 5.53×10^{-4} , 5.53×10^{-3} or 0.270 U/mL of β -mannanase was added, and viscosity at 37°C was determined from steady shear measurements carried out over 210 min at a shear rate of 10 s^{-1} in an AR1000-N cone-and-plate rheometer from TA Instruments, Newcastle, UK (cone angle 2°, diameter 60 mm, gap 59 μm). For measurement of complex shear moduli, solutions or gels were prepared by stirring for 1 h at 85°C as described above, the required amount of enzyme was added at 70°C, the mixture was left at 37°C for 210 min, and dynamic oscillatory measurements were performed over a frequency range of 0.05 – 50 rad s^{-1} at a controlled strain within the linear viscoelastic range. Rheological characterization was performed at physiological temperature (37°C).

Tablets 300 mg in weight composed of KGM, XG, sucrose, magnesium stearate (0.5%) and diltiazem HCl (90 mg) were prepared by wet granulation. For each KGM variety, seven formulations differing in the proportions of KGM, XG and sucrose were prepared in accordance with a simplex experimental design [35] with the constraints total polysaccharides > 20% and sucrose > 20% (Fig. 6.1).

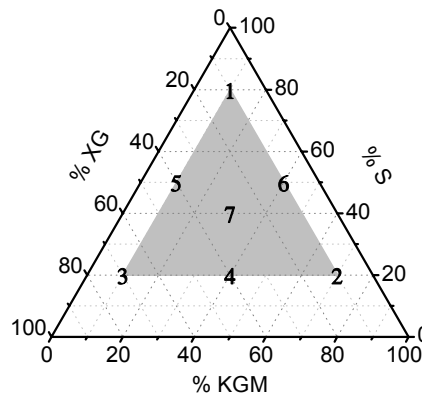


Figure 6.1. Simplex experimental design space (grey area), with the test points. S = sucrose.

Table 6.1 describes these formulations and indicates the nomenclature used.

Formulation		Composition (wt %)			
Japanese	American	Diltiazem	KGM	XG	Sucrose
KGM	KGM				
J1	A1	30	7	7	56
J2	A2	30	49	7	14
J3	A3	30	7	49	14
J4	A4	30	28	28	14
J5	A5	30	7	28	35
J6	A6	30	28	7	35
J7	A7	30	21	21	28

Table 6.1. Compositions of the formulations studied, before addition of 0.5% of magnesium stearate

All ingredients except magnesium stearate were passed through a 120 μm meshes and mixed for 10 min in a Turbula T2C blender (WAB, Switzerland). Wet massing was carried out in a Master Chef planetary mixer (Kenwood, UK) using 50:50 water/ethanol as granulating liquid and a liquid:solids ratio of approximately 20%. The wet mass was passed through a 1-mm-mesh sieve using an AR400 oscillating granulator (Erweka, Germany) and was oven dried at 40° C for 24h. The dried granules were sieved (60 μm -1 mm), mixed with magnesium stearate (0.5%) in a WAB Turbula T2C, and compressed at a constant pressure of 14 kN to form flat-faced tablets 9 mm in diameter in an eccentric tablet press (Bonals MT, Spain) equipped with pressure and punch-run sensors.

Tablet crushing strength (CS) was measured with an Erweka TB24 durometer (Heusenstamm, Germany) for 10 random tablets of each formulation. Tensile strength (TS) was calculated from the equation [36]

$$\text{TS} = (2 \text{ CS}) / (\pi \text{ D E})$$

where D and E are tablet diameter and tablet thickness, respectively.

In vitro dissolution tests were performed in a USP type 2 apparatus (Turu-Grau, Spain) in accordance with the requirements of USP 27 (2004) for diltiazem. Six tablets of each formulation were each stirred for 24 h at 75 rpm in 900 mL of simulated intestinal fluid (pH 7.5 ± 0.1 , temperature $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$) with or without β -mannanase (5.53×10^{-4} , 5.53×10^{-3} or 0.166 U/mL). At predefined times, samples were taken and the volume withdrawn was replaced with the same volume of fresh thermostatted medium. Drug concentrations were determined spectrophotometrically at 236 nm in an Agilent 8453 diode array spectrophotometer (Agilent, Germany) using a validated calibration curve. Dissolved diltiazem

cumulative percentages were fitted with zero-order kinetic curves. The physical integrity of the tablets was examined periodically.

Tablet swelling rate was measured to relate hydration to drug release. Two tablets of each formulation were each weighed on a platform; platform and tablet were then placed in a bath containing mannanase-free simulated intestinal fluid (pH 7.5; $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$); and at various times over the following 24 h, platform and tablet were withdrawn, drained of excess medium, weighed on an analytical balance (Gibertini, Italy) for calculation of percentage increase in weight, and returned to the fluid bath.

6.2.3. Statistical analyses

The statistical significance of results was estimated by analyses of variance corresponding to the experimental designs employed. The results for the properties of the diltiazem tablets were fitted with polynomial functions of KGM, XG and sucrose content by means of stepwise multiple regression analysis. All statistical calculations were performed using SPSS 14.0 [35].

6.3. Results and discussion

6.3.1. Rheological characterization of enzymatic degradation of KGM solutions and KGM/XG gels

Figure 6.2 shows viscosity-time curves obtained by steady shear measurements for a solution of the Japanese KGM and a 1:1 KGM/XG gel prepared from the American KGM. Solutions of the American KGM were all of very low viscosity (< 0.007 Pa.s) even at the start of the experiments, while 1:1 KGM/XG gels prepared with the Japanese KGM

were so solid that their viscosity could not be measured by steady shear experiments in our apparatus.

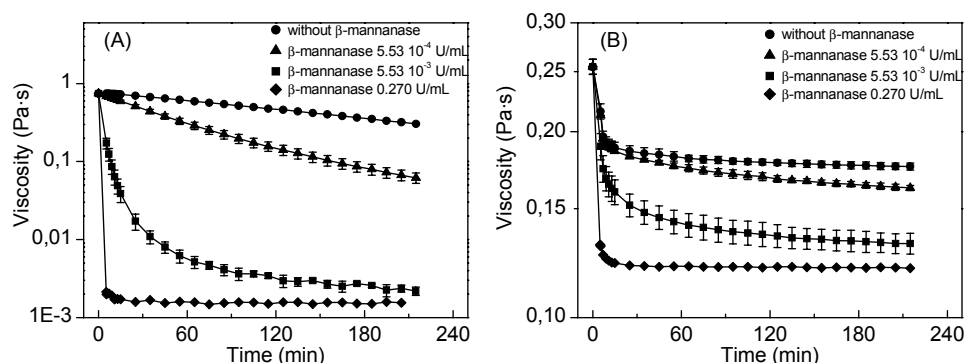


Figure 6.2. Evolution of the viscosities of a Japanese KGM solution (A) and a KGM/XG gel prepared with American KGM (B) in steady shear experiments in the presence of various concentrations of *A. niger* β -mannanase. Total polysaccharide concentration was in all cases 0.5% (w/v).

The viscosity of the Japanese KGM solutions (Fig. 6.2A), which decreased slowly even in the absence of enzyme (probably due to slow reorientation of the KGM chains in the direction of flow), was reduced dose-dependently by added β -mannanase, presumably due to enzymatic cleavage of the KGM backbones into smaller chains. Note that this occurred at physiological temperature and pH 7.5, even though these conditions differ considerably from those reported to afford peak activity by the manufacturers of the *A. niger* β -mannanase used, 60°C and pH 3. At the lowest enzyme concentration the time-dependence of the reduction in viscosity was practically linear, and at the highest concentration degradation was practically complete within 10 min, but at the intermediate concentration the viscosity-time profile suggests the action of

two distinct processes: a fast process that is complete within about 20 min, and a slower process that continues during the remainder of the experiment. Similar two-stage kinetics were observed by Li and coworkers [37] in experiments in which KGM was degraded by a β -mannanase from *Bacillus sp.*

The viscosity of the American KGM/XG gels (Fig. 6.2B) exhibited a two-stage decrease even in the absence of enzyme, the initial fast reduction being attributable to disruption of the weak gel structure by shearing. Otherwise these gels behaved like the Japanese KGM solutions as regards the dose-dependence of the enzyme-induced decrease in viscosity and the rapid completion of the enzymatic action at the highest enzyme concentration, although viscosity always remained within a narrower range of values than in the case of the KGM solutions. It may be noted that although access to the KGM backbone must be hindered to some extent by XG in these gels, enzymatic degradation was detectable even at the lowest enzyme concentration and occurred to a marked extent at a concentration 30 times lower than the concentration of 0.166 U/mL reckoned by Burke and coworkers [32] to be most suitable for prediction of the action of colonic β -mannanase *in vivo*.

Figure 6.3 shows the mechanical spectra of the KGM/XG gels at 37°C 210 min after addition of 0, 5.53×10^{-4} , 5.53×10^{-3} or 0.270 U/mL of β -mannanase. In the absence of enzyme, the system with Japanese KGM behaved as a true gel: both the storage shear modulus G' and the loss shear modulus G'' were almost independent on the three orders of magnitude frequency range, and the loss factor $\tan \delta (= G''/G')$ remained well below unity, especially in the low-frequency region of greatest interest for

inference of gel structure, where $\tan \delta \approx 0.1$. By contrast, the stronger frequency-dependence of G' and G'' for the system with American KGM, and its larger $\tan \delta$ values, show it to be a much weaker gel [38].

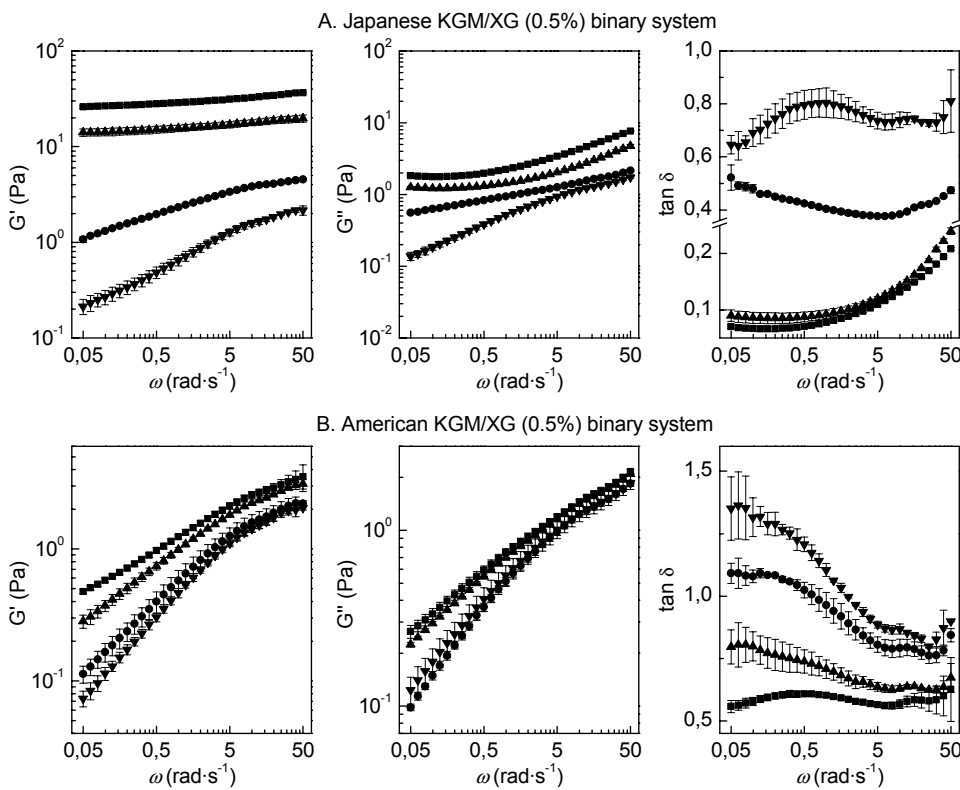


Figure 6.3. Plots of storage shear modulus G' , loss shear modulus G'' and loss factor $\tan \delta$ against frequency ω obtained at 37°C for 0.5% 1:1 KGM/XG mixtures containing Japanese (A) or American (B) KGM 210 min after the addition of 0 (■), 5.53×10^{-4} (▲), 5.53×10^{-3} (●) or 0.270 (▼) U/mL of β -mannanase.

These differences are in keeping with previous observations of rheological differences between KGM/XG gels prepared with materials from different suppliers [21,29], and as noted in the Introduction are

probably due mainly to differences in the degree of acetylation of the KGM.

The addition of β -mannanase at concentrations greater than 5×10^{-3} U/mL reduced G' and G'' , and increased their frequency dependence, in both KGM/XG systems, especially the system with Japanese KGM, while loss of elasticity (attributable to the cleavage of KGM into smaller molecules; [39] was shown by significantly increased values of $\tan \delta$. With these concentrations of β -mannanase, the system with American KGM ceased completely to behave as a gel, exhibiting $\tan \delta$ values > 1 at low frequencies.

Taken together, the above viscosity-time profiles and mechanical spectra show that both the Japanese and American varieties of KGM are degraded by *A. niger* β -mannanase at 37°C and pH 7.5, even when they form gels with XG.

6.3.2 Mechanical properties of KGM/XG-based diltiazem matrices, and drug release profiles in the absence of β -mannanase

Inspection of Table 6.2, which summarizes the measured tensile strengths of the tablet formulations studied, suggests that for a given XG or sucrose content, tensile strength decreased with increasing KGM content [compare formulations N6 and N5 (N= J or A); N2, N3 and N4; N4 and N5; and N1, N2 and N6], and that the American KGM, the particles of which are on average more than three times smaller than those of the Japanese variety, tended to afford stronger tablets than the Japanese KGM. The existence of significant differences in tensile strength among tablets with different compositions was confirmed by analysis of variance.

KGM/XG/S (%)	Japanese KGM		American KGM	
	Formulation	TS (MPa) Mean (SD)	Formulation	TS (MPa) Mean (SD)
10/10/80	J1	2.10 (0.20)	A1	2.55 (0.24)
70/10/20	J2	0.23 (0.03)	A2	0.75 (0.05)
10/70/20	J3	1.41 (0.08)	A3	1.71 (0.08)
40/40/20	J4	0.68 (0.18)	A4	1.52 (0.06)
10/40/50	J5	2.41 (0.18)	A5	2.48 (0.17)
40/10/50	J6	1.03 (0.20)	A6	1.17 (0.08)
30/30/40	J7	1.36 (0.16)	A7	1.50 (0.06)

Table 6.2. Mean tensile strengths *TS* of the formulations, with standard deviations *SD* in parentheses.

The formulations with Japanese and American KGM were respectively fitted by the regression equations

$$TS(\text{MPa}) = 2.037 \times 10^{-2} S + 7.714 \times 10^{-4} S \cdot XG - 1.733 \times 10^{-4} KGM \cdot S - 1.313 \times 10^{-4} KGM \cdot XG$$

$$(r^2 > 0.99; F = 1891.7; 4 \text{ and } 3 \text{ d.f.}; p < 0.01)$$

and

$$TS(\text{MPa}) = 0.028 S + 0.019 XG$$

$$(r^2 > 0.99; F = 135.0; 2 \text{ and } 5 \text{ d.f.}; p < 0.01)$$

where *XG*, *KGM* and *S* are respectively the quantities of XG, KGM and sucrose in the formulations, expressed as percentages of the combined weight of these excipients. In both cases, tensile strength can be described as mainly determined by the percentages of XG and sucrose, both of which are materials known for their good compression properties. The grey areas in Figure 6.6 show the proportions of KGM, XG and sucrose in formulations that the above equations predict to have tensile strengths greater than 1 MPa, a value that may be regarded as the minimum required for (9 mm) tablets of acceptable mechanical properties.

The matrices swollen process was studied by the evaluation of the simulated intestinal fluid (SIF) uptake as a function of time for a 24 hours period. Results are presented in figure 6.4. In agreement with previous authors findings [11, 40] on contact with aqueous medium, the hydrophilic matrix gradually begins to hydrate from the periphery towards the centre, forming a gelatinous swollen mass, the thickness and strength of which control the drug release.

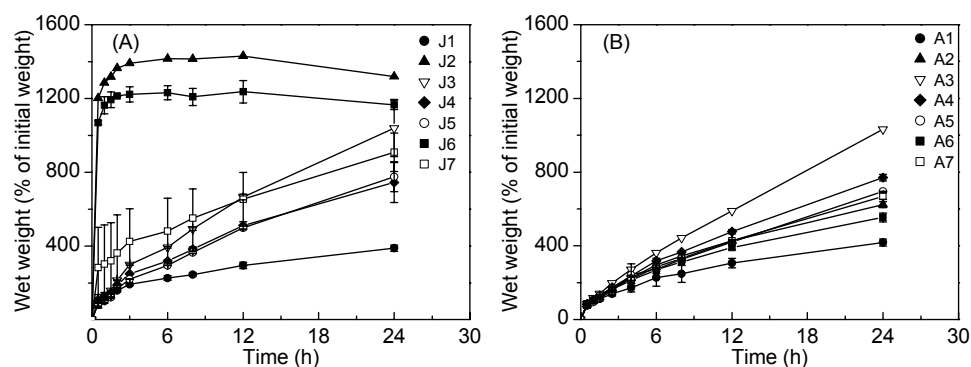


Figure 6.4. Uptake of simulated intestinal fluid over 24 h by tablets prepared with Japanese KGM (A) and American KGM (B).

The amount of SIF uptake by these types of systems is related to the total percentage of polysaccharides in the formulation, but as it can be seen for the same system composition, the American and Japanese KGM formulations present very different swollen profiles. Japanese KGM formulations take a higher total amount of water and at faster rate than the American variety formulations with identical composition. These differences can be explained, firstly by the differences in the acetylation degree of KGMs [29] which determines the interaction polysaccharide/water and secondly, by variations in particle size distribution of both products. The big particles of Japanese KGM absorb

water and swell quickly making this material act as a disintegrant. As a consequence some formulations including high proportions of Japanese KGM (J2 and J6), disintegrate and do not perform as matrices. Formulations elaborated with the American KGM variety, of smaller particle size, lower porosity and stronger from a mechanical point of view, experience a progressive swollen process (fitting nearly zero order kinetics) maintaining their integrity along the experimental time except for the formulation A1, whose main component, sucrose, is dissolved.

Figure 6.5 shows the diltiazem release profiles recorded in simulated intestinal fluid with no mannanase. Like the fluid sorption profiles, most reflect almost zero-order kinetics (with $r^2 \geq 0.94$; see Table 6.3), suggesting that release is limited by the tablet swelling process. The main exceptions were again A1, J2 and J6 (and for the same reasons as before); and J1, which is mostly sucrose, unsurprisingly released a relatively large proportion of its drug load at a very early stage, as the result of the dissolution of the sucrose.

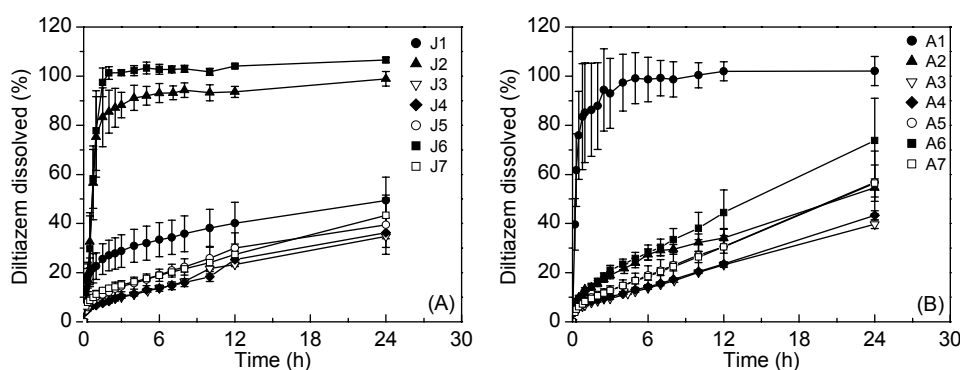


Figure 6.5. Dissolution profiles for release of diltiazem into simulated intestinal fluid from formulations prepared with Japanese KGM (A) and American KGM (B).

Table 6.3 shows a tendency for formulations with American KGM to release their drug load faster than those with Japanese KGM. This is in keeping with the lower viscosity of KGM/XG mixtures when American KGM is used [29].

Ternary mixture % KGM/XG/S	Japanese KGM		American KGM			
	K_0 (h ⁻¹)	r^2	K_0 (h ⁻¹)	r^2		
10/10/80	J1	0.023	0.83	A1	0.026	0.32
70/10/20	J2	0.043	0.23	A2	0.032	0.95
10/70/20	J3	0.021	0.98	A3	0.024	0.99
40/40/20	J4	0.022	0.98	A4	0.026	0.99
10/40/50	J5	0.025	0.94	A5	0.036	0.99
40/10/50	J6	0.049	0.28	A6	0.046	0.98
30/30/40	J7	0.024	0.98	A7	0.035	0.99

Table 6.3. Drug release rate constants (K_0) of zero-order kinetic curves (% diltiazem dissolved = $K_0 t$) fitted to the drug release profiles, with the corresponding determination coefficients (r^2).

The synergistic effect of interaction between KGM and XG on the rheology of their mixtures has been reported to be greatest at a KGM:XG ratio of 1:1 [27,28]. Although drug release might therefore be expected to be slowest with this KGM:XG ratio (since release is in principle slower, the more consistent the matrix; [11]), the virtually identical release curves of formulations J4 (1:1) and J3 (1:7), and of A4 and A3, show that the rheological properties of gels do not completely explain diltiazem release from these matrices. Other characteristics, such as porosity or swelling properties, must also have significant influence.

The striped areas in Figure 6.6 correspond to formulations with approximately zero-order release kinetics.

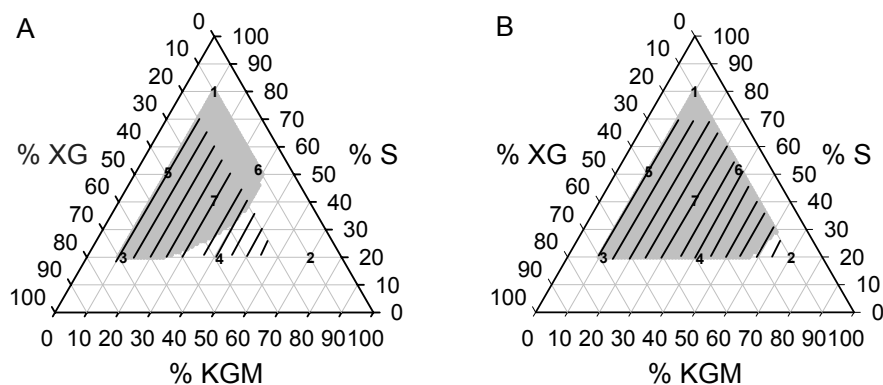


Figure 6.6. KGM:XG:sucrose excipient ratio space. Grey areas show regions where formulations with Japanese KGM (A) or American KGM (B) have tensile strengths greater than 1 MPa, and striped areas regions where the formulations have quasi-zero-order diltiazem release kinetics in simulated intestinal fluid with no mannanase.

When considered jointly with the grey areas corresponding to formulations with acceptable tensile strength, they show that the maximum proportions of KGM that can usefully be incorporated in formulations of this kind is 60% for American KGM but only 40% for the Japanese variety. To study the effect of β -mannanase on drug release, we chose formulations A7 and J7, which are both near the centres of the regions corresponding to useful formulations.

6.3.3 Drug release profiles in the presence of β -mannanase

Figure 6.7 shows that zero-order drug release kinetics were maintained by formulations A7 and J7 in the presence of β -mannanase ($r^2 > 0.98$).

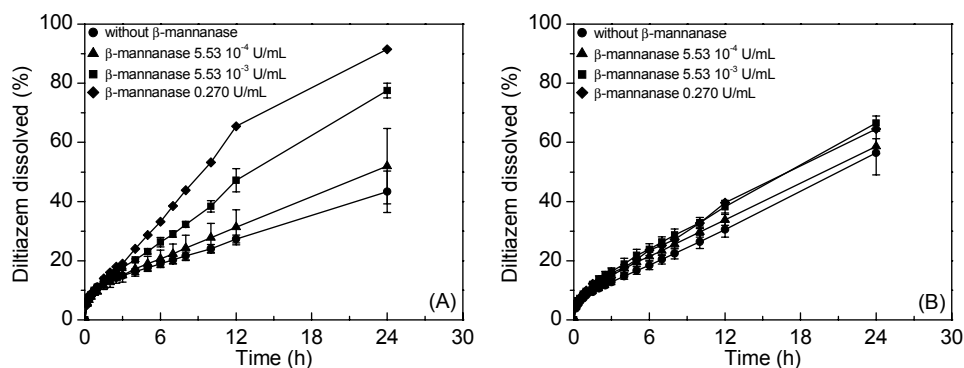


Figure 6.7. Dissolution profiles for release of diltiazem into simulated intestinal fluid containing various concentrations of β -mannanase, for formulations J7 (A) and A7 (B).

The rate of release from both formulations increased with mannanase concentration, but this effect was much more marked for the formulation with Japanese KGM, from which almost all diltiazem had been released within 24 h when the mannanase concentration was that estimated by Burke and coworkers [32] as most appropriate for estimation of *in vivo* behaviour, 0.166 U/mL. That the mannanase had a greater effect with Japanese than with American KGM seems likely to be due to the slower swelling of the latter (see Figure 6.4), which would have hindered the access of mannanase to the KGM backbone. The development of matrices including American KGM variety should be designed taking into account such variables as compression pressure to modulate porosity and swelling properties to achieve 100% drug dissolution at 24 hours. Results indicate that matrices containing KGM/XG mixtures, for both Japanese and American KGM, maintain the biodegradability by colonic enzymes which is the most important fact in the development of polysaccharides colonic formulations [41]

6.4. Conclusions

In this work, rheological measurements showed that KGM is susceptible to degradation by *A. niger* β -mannanase even when it forms binary systems with XG, and hence that these systems may also be degraded by β -mannanases produced by the flora of the human colon. Assays of the tensile strength and drug release profiles of diltiazem tablets prepared with KGM, XG and sucrose as excipients showed that for both Japanese and American KGMs there are significant regions of (KGM, XG, S) space in which the tablets are both satisfactorily strong and exhibit slow, nearly zero-order release of this highly soluble drug. With the Japanese KGM, drug release was virtually complete within 24 h in the presence of a concentration of *A. niger* β -mannanase equivalent to colonic conditions. The smaller effect of the enzyme on release from a formulation with American KGM, and the consequent failure of these tablets to release their entire drug load within 24 h, is attributed to their slower swelling, and suggests that for tablets prepared with this KGM it will be necessary to optimize technological variables such as compression pressure in order to achieve suitable porosity, swelling rate, and drug release.

To sum up, the results of this study suggest that sustained release of water-soluble drugs in the colon from orally administered tablets may be achieved using simple, inexpensive formulations based on combinations of KGM and XG that take the variability of KGM characteristics into account.

6.5 Acknowledgments

Authors thank the Xunta de Galicia for the financial support PGIDIT05BTF20301PR. Felipe Alvarez Manceño thanks the Xunta de Galicia for his predoctoral grant. Authors gratefully acknowledge Shimizu Chemical Corporation (Japan) for the Propol A[®] sample.

6.6 References

- [1] T. Coviello, P. Matricardi, C. Marianecchi, F. Alhaique, Polysaccharide hydrogels for modified release formulations, *J. Controlled Release* 119 (14) (2007) 5-24.
- [2] A.W. Basit, Advances in colonic drug delivery, *Drugs* 14(65) (2005) 1991-2007.
- [3] T.F. Vandamme, A. Lenourry, C. Charrueau, J. Chaumeil, The use of polysaccharides to target drugs to the colon, *Carbohydrate Polymers* 3(48) (2002) 219-231.
- [4] M.K. Chourasia, S.K. Jain, Polysaccharides for colon targeted drug delivery, *Drug Delivery* 2(11) (2004) 129-148.
- [5] Z.L. Liu, H. Hu, R.X. Zhuo, Konjac glucomannan-graft-acrylic acid hydrogels containing azo crosslinker for colon-specific delivery, *Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry* 17(42) (2004) 4370-4378.
- [6] L.G. Chen, Z.L. Liu, R.X. Zhuo, Synthesis and properties of degradable hydrogels of konjac glucomannan grafted acrylic acid for colon-specific drug delivery, *Polymer* 16(46) (2005) 6274-6281.

[7] R.P. Millane, B. Wang, A Cellulose-Like Conformation Accessible to the Xanthan Backbone and Implications for Xanthan Synergism, *Carbohydrate Polymers* 1(13) (1990) 57-68.

[8] M.M. Talukdar, R. Kinget, Swelling and Drug-Release Behavior of Xanthan Gum Matrix Tablets, *Int. J. Pharm.* 1(120) (1995) 63-72.

[9] V. Dhopeswarkar, J.L. Zatz, Evaluation of Xanthan Gum in the Preparation of Sustained-Release Matrix Tablets, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 9(19) (1993) 999-1017.

[11] C.W. Vendruscolo, I.F. Andrezza, J.L.M.S. Ganter, C. Ferrero, T.M.B. Bresolin, Xanthan and galactomannan (from *M-scabrella*) matrix tablets for oral controlled delivery of theophylline, *Int. J. Pharm.* 1-2(296) (2005) 1-11.

[12] M. Fukuda, N.A. Peppas, J.W. McGinity, Properties of sustained release hot-melt extruded tablets containing chitosan and xanthan gum, *Int. J. Pharm.* 1-2(310) (2006) 90-100.

[13] K. Maekaji, Determination of Acidic Component of Konjac Mannan, *Agric. Biol. Chem.* 1(42) (1978) 177-178.

[14] M. Maeda, H. Shimahara, N. Sugiyama, Studies of Mannan and Related-Compounds .5. Detailed Examination of the Branched Structure of Konjac Glucomannan, *Agric. Biol. Chem.* 2(44) (1980) 245-252.

[15] M.A.K. Williams, T.J. Foster, D.R. Martin, I.T. Norton, M. Yoshimura, K. Nishinari, A molecular description of the gelation mechanism of konjac mannan, *Biomacromolecules* 3(1) (2000) 440-450.

[16] E.M. Ozu, I.C. Baianu, L.-S. Wei, Physical and chemical properties of glucomannan gels and related polysaccharides, in: Ion C.Baianu, H.P. , T.F.K. (Eds.), Physical chemistry of food processes, New York, (1993) 487-517.

[17] C. Shinzato, A.M. Broussalis, G.E. Ferraro, Glucomanano: Un aporte a su control de calidad, SAFYBI 95(35) (1996) 26-31.

[18] E.I. Yaseen, T.J. Herald, F.M. Aramouni, S. Alavi, Rheological properties of selected gum solutions, Food Research International 2(38) (2005) 111-119.

[19] A. Gonzalez, N. Fernandez, A. Sahagun, J.J. Garcia, M.J. Diez, L.J. Castro, M. Sierra, Effect of glucomannan and the dosage form on ethinylestradiol oral absorption in rabbits, Contraception 5(70) (2004) 423-427.

[20] K. Wang, Z.M. He, Alginate-konjac glucomannan-chitosan beads as controlled release matrix, Int. J. Pharm. 1-2(244) (2002) 117-126.

[21] F. Alvarez-Mancenido, K. Braeckmans, S.C. De Smedt, J. Demeester, M. Landin, R. Martinez-Pacheco, Characterization of diffusion of macromolecules in konjac glucomannan solutions and gels by fluorescence recovery after photobleaching technique, Int. J. Pharm. 1-2(316) (2006) 37-46.

[22] P. Penroj, J.R. Mitchell, S.E. Hill, W. Ganjanagunchorn, Effect of konjac glucomannan deacetylation on the properties of gels formed from mixtures of kappa carrageenan and konjac glucomannan, Carbohydrate Polymers 3(59) (2005) 367-376.

[23] M.J. Ridout, G.J. Brownsey, V.J. Morris, Synergistic interactions of acetan with carob or konjac mannan, *Macromolecules* 8(31) (1998) 2539-2544.

[24] F.M. Goycoolea, R.K. Richardson, E.R. Morris, M.J. Gidley, Stoichiometry and Conformation of Xanthan in Synergistic Gelation with Locust Bean Gum Or Konjac Glucomannan - Evidence for Heterotypic Binding, *Macromolecules* 24(28) (1995) 8308-8320.

[25] E. Miyoshi, T. Takaya, P.A. Williams, K. Nishinari, Effects of sodium chloride and calcium chloride on the interaction between gellan gum and konjac glucomannan, *J. Agric. Food Chem.* 9(44) (1996) 2486-2495.

[26] E. Miyoshi, T. Takaya, P.A. Williams, K. Nishinari, Rheological and DSC studies of mixtures of gellan gum and konjac glucomannan, *Macromolecular Symposia*(120) (1997) 271-280.

[27] G. Paradossi, E. Chiessi, A. Barbiroli, D. Fessas, Xanthan and glucomannan mixtures: Synergistic interactions and gelation, *Biomacromolecules* 3(3) (2002) 498-504.

[28] M. Tako, Binding sites for mannose-specific interaction between xanthan and galactomannan, and glucomannan, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2(1) (19-7-1993) 125-131.

[29] F. Alvarez-Mancenido, I. Lacik, M. Landín, R. Martínez-Pacheco, Konjac glucomannan and konjac glucomannan/xanthan gum mixtures as excipients for controlled drug delivery systems. Diffusion of small drugs., *Int. J. Pharm.* (2007) In press.

[30] M. Landín, F. Álvarez-Manceñido, R. Martínez-Pacheco, Macro and microviscosity in konjac glucomannan/xanthan gum mixtures:

effects on drug release process., Abstract of 2nd EUFEPS Conference on optimising drug delivery and formulation: Evaluation of drug delivery systems issues and perspectives. Versailles (2005) 91-92.

[31] N. Nakajima, Y. Matsuura, Purification and characterization of konjac glucomannan degrading enzyme from anaerobic human intestinal bacterium, *Clostridium butyricum* *Clostridium beijerinckii* group, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 10(61) (1997) 1739-1742.

[32] M.D. Burke, J.O. Park, M. Srinivasarao, S.A. Khan, A novel enzymatic technique for limiting drug mobility in a hydrogel matrix, *J. Controlled Release* 1(104) (2005) 141-153.

[33] A. Tayal, R.M. Kelly, S.A. Khan, Rheology and molecular weight changes during enzymatic degradation of a water-soluble polymer, *Macromolecules* 2(32) (1999) 294-300.

[34] A. Tayal, V.B. Pai, S.A. Khan, Rheology and microstructural changes during enzymatic degradation of a guar-borax hydrogel, *Macromolecules* 17(32) (1999) 5567-5574.

[35] G.A. Lewis, D. Methieu, R. Phan-Tan-Luu, Mixtures in a constrained region of interest. Screening, defining the domain, and optimizing formulations, in: J. Swarbrik(Ed.), *Pharmaceutical experimental design*, Marcel Dekker Inc., New York, (1999) 413-454.

[36] M.P. Summers, R.P. Enever, J.E. Carless, Influence of Crystal Form on Tensile-Strength of Compacts of Pharmaceutical Materials, *J. Pharm. Sci.* 8(66) (1977) 1172-1175.

[37] G.J. Li, L. Qi, A.P. Li, R. Ding, M.H. Zong, Study on the kinetics for enzymatic degradation of a natural polysaccharide, Konjac glucomannan, *Macromolecular Symposia*(216) (2004) 165-178.

[38] K. Almdal, J. Dyre, S. Hvidt, O. Kramer, Towards a phenomenological definition of the term gel; *Polymer Gels and Networks* 1(1) (1993) 5-17.

[39] H. Zhang, M. Yoshimura, K. Nishinari, M.A.K. Williams, T.J. Foster, I.T. Norton, Gelation behaviour of konjac glucomannan with different molecular weights, *Biopolymers* 1(59) (2001) 38-50.

[40] P. Colombo, R. Bettini, P. Santi, N.A. Peppas, Swellable matrices for controlled drug delivery: gel-layer behaviour, mechanisms and optimal performance, *Pharm. Sci. Technolo. Today* 6(3) (2000) 198-204.

[41] M.K. Chourasia, S.K. Jain, Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems, *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 1(6) (2003) 33-66.

DISCUSIÓN GENERAL

7. DISCUSIÓN GENERAL

La caracterización de las tres variedades de KGM seleccionadas para este estudio puso de manifiesto la existencia de diferencias, de órdenes de magnitud que pueden calificarse de espectaculares, en su capacidad viscosizante y, en general, en el comportamiento reológico de sus dispersiones. Dado que, en principio, estos aspectos son los más directamente relacionados con su posible uso como excipiente farmacéutico y, en especial, con los mecanismos a través de los que el polisacárido podría controlar los procesos de liberación de principio activo, cabe adelantar diferencias, también muy marcadas, en la utilidad de las tres variedades de KGM para esta finalidad.

Los resultados obtenidos con la aplicación de diversas técnicas instrumentales permitieron situar el origen de tales diferencias en algunas características importantes de las moléculas de KGM que componen cada una de estas variedades y en la naturaleza y el contenido de las impurezas que les acompañan. En este sentido, las diferencias observadas en el peso molecular (menor para la variedad americana entre los productos clarificados) y, especialmente, en el grado de acetilación (muy reducido para el glucomanano de origen americano y elevado para el europeo), aportan una interpretación adecuada del comportamiento reológico de las dispersiones de cada una de las variedades de KGM.

Por otra parte, las diferencias encontradas en el tamaño, la forma y las características superficiales de las partículas de los KGM, condicionarán, en buena medida, la facilidad en el procesado de estos productos en las operaciones habituales de elaboración de formas de dosificación sólidas. En este sentido, el KGM de origen americano, constituido por partículas de menor tamaño y forma más irregular que las de las otras dos variedades, presenta unas propiedades de flujo claramente deficientes que dificultarán el mezclado y la dosificación volumétrica de este producto.

Finalmente, la información obtenida en la caracterización de la conducta de compresión de los KGMs es concluyente: su deficiente comprimibilidad impide que, como tales, formen compactos de resistencia mecánica mínimamente aceptable. Así, la necesidad de mejorar sus características de deformación por mezclado o granulación con otras sustancias auxiliares es clara y podría limitar las proporciones máximas del polisacárido presentes en formas de dosificación obtenidas por compactación.

En resumen, la caracterización de las tres variedades de KGM seleccionadas ha permitido poner de manifiesto la existencia de importantes diferencias en características como peso molecular, grado de acetilación y naturaleza y contenido de impurezas, que resultan determinantes del comportamiento reológico de sus dispersiones. Por ello, el establecimiento de especificaciones de viscosidad nominal y de contenido mínimo de KGM resultaría de gran utilidad. Además, las notables diferencias detectadas en el tamaño y la morfología de las partículas de los KGM, por su incidencia sobre sus propiedades de flujo,

aconsejan su cuidadosa consideración a la hora de seleccionar la variedad más adecuada para su incorporación a formas de dosificación sólidas.

Aunque tradicionalmente el KGM se consideró como una fibra no digerible, los estudios de Nakajima y colaboradores (Nakajima y Matsuura, 1997; Nakajima et al., 2002) pusieron de manifiesto que este polisacárido experimenta una degradación prácticamente completa- con formación de numerosas unidades disacarídicas y en menor proporción monosacarídicas- por enzimas β -endo mananasas producidas por bacterias del género *Clostridium* presentes en la flora colónica. Partiendo de estos hechos, y con el fin de delimitar una potencial aplicación del KGM como excipiente útil para la liberación colónica de fármacos, su caracterización se completó con un estudio de degradabilidad enzimática.

Con esta finalidad se siguió la evolución de las propiedades reológicas de las dispersiones de las tres variedades de KGM, tras la adición al medio de cantidades crecientes de una β -endomananasa de *Aspergillus niger*. Los resultados obtenidos permiten confirmar la rotura de los enlaces glucosídicos β (1-4) con formación de unidades moleculares de pequeño tamaño, para las tres variedades de KGM. Además, desde un punto de vista cinético, y de acuerdo con los resultados obtenidos previamente por Li y colaboradores (2004), la acción enzimática es bifásica al seguir a una etapa inicial corta e intensa otra prolongada y de pequeña intensidad. Estos resultados, además, ratifican la utilidad de la enzima elegida para simular la degradación colónica del KGM.

Como se indicó en la sección de objetivos, el estudio de las combinaciones de KGM con goma xantano ha sido objeto de una especial atención, buscando una posible interacción sinérgica entre ambos

polisacáridos que de lugar a la formación de geles resistentes, termorreversibles y biodegradables, a concentraciones a los que ninguno de los componentes de forma aislada lo haría (Morris 1995).

Para el estudio de la interacción KGM-XG, se acudió al empleo de la reometría de esfuerzo controlado con la que se analizaron dispersiones con una concentración de polisacáridos totales a la que ni el glucomanano de konjac de ninguna de las variedades estudiadas, ni la goma xantano dan lugar a geles verdaderos desde un punto de vista reológico. Uno de los principales objetivos de este estudio fue la identificación de la proporción óptima KGM/XG; es decir, aquella que origina los geles más resistentes. En este sentido, cabe destacar que el enriquecimiento en XG de las mezclas con KGM de origen japonés o europeo, provoca importantes modificaciones en los espectros mecánicos, con notables incrementos en los valores de módulo elástico (G') y una marcada reducción en su dependencia de la frecuencia. Con ambas variedades de KGM se forman geles resistentes, con un máximo G' para las dispersiones elaboradas con la proporción 1:1 de ambos polisacáridos, proporción coincidente con la identificada como óptima por otros autores (Tako, 1993; Goycoolea et al., 1995b; Paradossi et al., 2002). Sin embargo, con la variedad americana no se observa un valor máximo de G' , que evidenciaría la existencia de una sinergia, sino un simple efecto aditivo.

Por otra parte, una elevación de temperatura de 25°C a 37°C produce marcadas alteraciones en las características reológicas de los sistemas estudiados, que se traducen en reducciones en los valores de viscosidad y de módulos elástico y viscoso para todos los productos evaluados. No obstante, estas alteraciones adquieren una especial relevancia en el caso

del KGM americano, ya que, a temperatura corporal, las dispersiones elaboradas con este producto no pueden considerarse verdaderos geles (Almdal et al., 1993).

Desde un punto de vista estructural, las mezclas KGM/XG dan lugar, incluso a concentraciones muy reducidas, a estructuras tridimensionales que pueden describirse como mallas formadas por cadenas poliméricas, reticuladas físicamente, cuyos espacios interiores se rellenan con cantidades importantes de agua. Si se acepta que el número de puntos de unión se refleja en los valores de módulo elástico, las redes tridimensionales tendrían una abertura de malla creciente en el orden siguiente: variedad japonesa, europea y americana. Estas diferencias estructurales deben tener una clara repercusión en su comportamiento como excipientes cuando estos materiales se empleen en la elaboración de formas de dosificación.

La revisión de la bibliografía indica que la degradabilidad de sistemas elaborados con mezclas de KGM/XG no ha sido objeto de estudio en trabajos anteriores. Las variaciones en las propiedades reológicas encontradas para estos sistemas tras la adición de la enzima indican que estas estructuras tridimensionales son susceptibles de degradación por la β -endo mananasa de *Aspergillus niger* empleada como modelo de la actividad desarrollada por la flora colónica. La rotura de la cadena principal del KGM se produce, incluso, a concentraciones de enzima 150 veces inferiores a las consideradas como fisiológicas (Burke et al., 2005), a pesar de la limitada accesibilidad limitada debida a la presencia de las cadenas de xantano. Los resultados indican, además, la posibilidad de utilizar esta enzima para simular las condiciones colónicas.

La estructura física de las dispersiones y geles de polisacáridos, y por ende de sus propiedades reológicas, juega un papel determinante en la liberación del principio activo cuando se utilizan como componentes de formas de dosificación. Los sistemas viscosos o los hidrogeles generados, por hidratación de los polisacáridos o de sus mezclas, en contacto con los fluidos biológicos, constituyen el medio a través de cual ha de producirse la difusión del fármaco (Vendruscolo et al., 2005).

Con el fin de llevar a cabo una amplia evaluación de las características de difusión molecular en el seno de las dispersiones y geles de KGM y KGM/XG, se seleccionaron dos fármacos de peso molecular reducido y diferente carga neta (teofilina y diltiazem) y un grupo de dextranos de diferente peso molecular.

El empleo de células de Franz-Chien verticales, permitió determinar los coeficientes de difusión de los dos fármacos tras el ajuste de los datos experimentales a la cinética de Higuchi, para la que se obtuvieron los mejores resultados.

Como podía anticiparse, la teofilina, molécula de menor tamaño y neutra, difunde más rápidamente, que el diltiazem, de mayor tamaño y carga positiva, en todos los sistemas. En este sentido, las interacciones iónicas entre fármacos y polímeros de carga opuesta, en este caso el XG de carácter aniónico, se han señalado como causa de ralentización en el proceso de cesión de algunos fármacos (Seki y col, 2003; Bonferoni y col, 2000; Sousa y col., 2005, Cornejo-Bravo y col., 2005).

Por otra parte, cabe destacar que la difusión de ambos fármacos resulta mucho más lenta en los sistemas que contienen XG como único componente. Ello supone que la incorporación de este polisacárido a los

sistemas en los que está presente cualquiera de las variedades de KGM, reduce significativamente la velocidad de difusión de teofilina y de diltiazem. Además, el hecho de que se mantengan las diferencias observadas entre las tres variedades objeto de estudio, pone de manifiesto que, en el caso de los KGM japonés o europeo, la formación de geles introduce una dificultad añadida a la difusión de fármacos, como consecuencia de la formación de una red tridimensional más densa y rígida y, en última instancia de un mayor efecto tamiz.

Para el estudio de la difusión de macromoléculas (dextranos) en el seno de los sistemas formados por KGM, XG, o la combinación de ambos polisacáridos, se acudió al empleo de la microscopía confocal unida a la técnica de recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueado (FRAP) que permite determinar el coeficiente de difusión y la fracción de macromoléculas móviles en el interior de los sistemas. Esta técnica resulta especialmente atractiva por lo novedoso de su aplicación en el campo farmacéutico.

A pesar de la disparidad de las técnicas utilizadas para el estudio de los procesos de difusión, cabe afirmar que la velocidad de difusión de las macromoléculas es claramente más lenta que la observada para los fármacos de reducido peso molecular.

En lo que respecta a las diferencias observadas entre las tres variedades de KGM, cabe señalar que la variedad con menor capacidad viscosizante ofrece una menor resistencia al paso de los dextranos marcados con fluoresceína utilizados como sonda. Además, si se analiza la dependencia de los valores del coeficiente de difusión (D) respecto del peso molecular de los dextranos (M_w), se obtiene una relación exponencial

del tipo $D \sim M_w^a$ con valores del exponente (a) muy diferentes para las distintas variedades de KGM. Este hecho sugiere que el paso de moléculas se ve influenciado no solo por la viscosidad que el material polimérico confiere al medio, sino también por un impedimento estérico ejercido por las cadenas de KGM, que resulta tanto más eficaz cuanto mayor es el tamaño molecular de la macromolécula que difunde. Este hecho se refleja especialmente en los valores de fracción móvil obtenidos para las moléculas del dextrano de mayor peso molecular, que quedan retenidas en una proporción importante.

Otro aspecto a destacar, que en cierto modo resulta sorprendente, son las pequeñas diferencias encontradas entre los coeficientes de difusión de los dextransos en los sistemas que contienen únicamente KGM y aquellos formados por mezclas KGM/XG. Así, el efecto sinérgico observado en cuanto a propiedades reológicas de las dispersiones formadas por la combinación de los dos polisacáridos, no se refleja en la velocidad de difusión de los dextransos, sino únicamente en la fracción móvil. Esto sugiere que la goma xantano contribuye únicamente a incrementar el impedimento estérico, provocando que, en el caso de los dextransos de mayor peso molecular, queden atrapados en la red polimérica que forma la goma xantano con el glucomanano de origen japonés. Es decir, cuanto mayor es el tamaño de la macromolécula que difunde, la viscosidad del medio tiene una menor repercusión y el impedimento estérico adquiere mayor importancia, hasta el punto de impedir la movilidad de una parte importante de las moléculas de dextrano.

De los párrafos anteriores se desprende que, al menos para dos de las variedades de KGM evaluadas (las de origen japonés y europeo), la

combinación KGM/XG puede resultar ventajosa respecto al empleo de cada uno de los polisacáridos de forma aislada. Así, para moléculas de pequeño tamaño, la combinación KGM/XG permite la formación de hidrogeles que mantienen su integridad durante periodos de tiempo prolongados, evitándose la erosión característica de los sistemas formados por XG. En el caso de moléculas de elevado peso molecular, la integridad de la estructura polimérica causa una retención eficaz de las macromoléculas hasta que tenga lugar su destrucción, por ejemplo, por una degradación enzimática.

La última parte del trabajo experimental se dedicó a la evaluación de las mezclas de KGM/XG como excipiente base de formas de dosificación sólidas de liberación modificadas; en concreto, sistemas de liberación controlada y sistemas de liberación selectiva activados por enzimas colónicas adecuados para incorporar un fármaco modelo de elevada hidrosolubilidad (diltiazem).

En esta etapa del estudio se utilizaron únicamente las variedades de KGM japonesa y americana, por ser las que, en su caracterización, mostraron propiedades más dispares.

Para cada variedad, se elaboraron una serie de siete formulaciones en comprimidos matriz conteniendo diltiazem, KGM, XG y sacarosa (S), cuya composición se estableció de acuerdo con un diseño de mezclas para tres componentes (KGM, XG, S). Las deficientes propiedades de compresión del KGM hicieron necesario acudir a la granulación vía húmeda y a la incorporación de un aglutinante (también hidrosoluble) como la sacarosa.

El análisis de las propiedades mecánicas de los comprimidos matriz mostró que la resistencia a la rotura se incrementa por la presencia de XG y de S en las formulaciones, en tanto que el KGM afecta negativamente al valor de este parámetro.

En lo que respecta a los perfiles de hinchamiento de las matrices, se observaron comportamientos muy diferentes de las dos variedades de glucomanano. Así, las formulaciones elaboradas con el KGM japonés captan agua en mayor cantidad y de modo más rápido que sus equivalentes elaboradas con la variedad americana. Este hecho debe atribuirse al diferente tamaño de partícula de los KGM, de modo que las partículas de la variedad japonesa -de mayor tamaño- al captar agua favorecen la ruptura de los comprimidos, actuando como verdaderos agentes disgregantes. Por ello, las formulaciones con mayor contenido en KGM japonés experimentan una rápida disgregación, por lo que la liberación del fármaco no se produce a través de un sistema matricial.

En las formulaciones elaboradas con el KGM de origen americano -de menor tamaño de partícula- la captación de agua da lugar a un hinchamiento progresivo de las matrices manteniendo su integridad un tiempo no inferior a las 24 horas, con la excepción de la que contiene la mayor proporción de sacarosa que experimenta un proceso de disolución.

Todas las formulaciones que no se disgregaron durante la liberación del principio activo, exhibieron perfiles de cesión de orden cero. Los valores de las constantes de velocidad de disolución de diltiazem de las matrices elaboradas con el KGM de origen americano resultaron superiores a las de sus homólogas de la variedad japonesa. Estas diferencias tienen su origen en la mayor resistencia de los geles y en los

valores más reducidos de coeficiente de difusión obtenidos con la combinación del xantano con el glucomanano japonés.

Otro aspecto destacable es el relativo a la incidencia de la proporción de KGM:XG sobre el proceso de liberación de principio activo, que resultó ser de magnitud mucho menor que la que cabría adelantar teniendo en cuenta las propiedades de los geles. Este hecho es indicativo de que, además de las características intrínsecas de los geles, la velocidad de liberación de principio activo está condicionada por otras propiedades de las matrices como su porosidad y su velocidad de hinchamiento (Talukdar y Kinget, 1995).

Finalmente, para el estudio de los efectos de la degradación enzimática del KGM sobre el proceso de liberación de principio activo a partir de los comprimidos matriz, se seleccionaron dos formulaciones, de idéntica composición, elaboradas respectivamente con las variedades japonesa y americana de KGM.

Para la formulación elaborada con la variedad japonesa, la presencia de concentraciones crecientes de enzima se traduce en un progresivo incremento en la velocidad de disolución de diltiazem, completándose el proceso de liberación en 24 horas cuando la cantidad de enzima presente es similar a la fisiológica. El comportamiento de la formulación que contiene KGM de origen americano es similar, si bien el proceso de liberación tiene una duración superior, hecho que debe relacionarse con su menor velocidad de hinchamiento que dificulta el acceso de las enzimas a las moléculas de KGM y lo convierte en el factor limitante del proceso de liberación. La modulación de la fuerza de compresión aplicada para la obtención de estas matrices y, a través de ella, de su porosidad y velocidad

de hinchamiento debería permitir una adecuada aceleración del proceso de liberación de principio activo. Por tanto, las formulaciones ensayadas cuentan con perspectivas muy interesantes para su empleo como formas de liberación colónica, en especial, si se administran con un recubrimiento de tipo entérico.

1.14 Bibliografía.

Almdal,K., Dyre,J., Hvidt,S., Kramer,O., 1993. Towards a phenomenological definition of the term gel. *Polymer Gels and Networks*, 1, 5-17.

Bonferoni,M.C., Rossi,S., Ferrari,F., Bettinetti,G.P., Caramella,C., 2000. Characterization of a diltiazem-lambda carrageenan complex. *Int. J. Pharm.*, 200, 207-216.

Burke,M.D., Park,J.O., Srinivasarao,M., Khan,S.A., 2005. A novel enzymatic technique for limiting drug mobility in a hydrogel matrix. *J. Controlled Release*, 104, 141-153.

Cornejo-Bravo,J.M., Flores-Guillen,M.E., Lugo-Medina,E., Licea-Claverie,A., 2005. Drug release from complexes with a series of poly(carboxyalkyl methacrylates), a new class of weak polyelectrolytes. *Int. J. Pharm.*, 305, 52-60.

Goycoolea,F.M., Richardson,R.K., Morris,E.R., Gidley,M.J., 1995. Stoichiometry and Conformation of Xanthan in Synergistic Gelation with Locust Bean Gum Or Konjac Glucomannan - Evidence for Heterotypic Binding. *Macromolecules*, 28, 8308-8320.

Li,G.J., Qi,L., Li,A.P., Ding,R., Zong,M.H., 2004. Study on the kinetics for enzymatic degradation of a natural polysaccharide, Konjac glucomannan. *Macromolecular Symposia*, 216, 165-178.

- Morris, E.R.**, 1995. Polysaccharide synergism - More questions than answers? In: Harding, S.E., Hill, S.E., Mitchell, J.R. (Eds.), Nottingham University Press, Nottingham, 247-288.
- Nakajima, N., Ishihara, K., Matsuura, Y.**, 2002. Dietary-fiber-degrading enzymes from a human intestinal Clostridium and their application to oligosaccharide production from nonstarchy polysaccharides using immobilized cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59, 182-189.
- Nakajima, N., Matsuura, Y.**, 1997. Purification and characterization of konjac glucomannan degrading enzyme from anaerobic human intestinal bacterium, Clostridium butyricum Clostridium beijerinckii group. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 61, 1739-1742.
- Paradossi, G., Chiessi, E., Barbiroli, A., Fessas, D.**, 2002. Xanthan and glucomannan mixtures: Synergistic interactions and gelation. *Biomacromolecules*, 3, 498-504.
- Seki, T., Okamoto, M., Hosoya, O., Aiba, D., Morimoto, K., Juni, K.**, 2003. Effect of chondroitin sulfate on the diffusion coefficients of drugs in aqueous solutions. *Stp Pharma Sciences*, 13, 215-218.
- Sousa, R.G., Prior-Cabanillas, A., Quijada-Garrido, I., Barrales-Rienda, J.M.**, 2005. Dependence of copolymer composition, swelling history, and drug concentration on the loading of diltiazem hydrochloride (DIL.HCl) into poly [(N-isopropylacrylamide)-co-(methacrylic acid)] hydrogels and its release behaviour from hydrogel slabs. *J. Controlled Release*, 102, 595-606.
- Tako, M.**, 1993. Binding sites for mannose-specific interaction between xanthan and galactomannan, and glucomannan. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1, 125-131.

Talukdar, M.M., Kinget, R., 1995. Swelling and Drug-Release Behavior of Xanthan Gum Matrix Tablets. *Int. J. Pharm.*, 120, 63-72.

Vendruscolo, C.W., Andrezza, I.F., Ganter, J.L.M.S., Ferrero, C., Bresolin, T.M.B., 2005. Xanthan and galactomannan (from M-scabrella) matrix tablets for oral controlled delivery of theophylline. *Int. J. Pharm.*, 296, 1-11.

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

Los resultados de los estudios dirigidos a evaluar la utilidad del glucomanano de konjac (KGM), solo o en combinación con la goma xantano (XG), como excipiente de formas de dosificación de liberación modificada han permitido concluir que:

1.- Las tres variedades de glucomanano de konjac de distinto origen geográfico (japonés, europeo y americano) seleccionadas para este estudio, presentan diferencias muy marcadas en el comportamiento reológico de sus dispersiones, que se atribuyen a variaciones en el peso molecular y el grado de acetilación y a la naturaleza y el contenido de las impurezas que les acompañan. Además, las diferencias existentes en el tamaño medio y en la morfología de sus partículas, justifican que sus propiedades de flujo resultan también muy diferentes. Las deficientes propiedades de compresión de los KGM sugieren la necesidad de incorporar excipientes adecuados si se pretende utilizarlos en formas de dosificación sólidas.

2.- La endo β -mananasa de *Aspergillus niger* empleada, incluso a concentración muy inferior a la considerada como fisiológica, provoca la ruptura de la cadena principal de glucomanano de konjac, y consecuentemente, variaciones importantes en las propiedades reológicas

de sus dispersiones. La degradabilidad del KGM se mantiene en los sistemas elaborados con mezclas de KGM y goma xantano a pesar de que la accesibilidad de la enzima se ve dificultada por la presencia del XG en el medio. Estas características sugieren la posibilidad de emplear este producto para la elaboración de formas sólidas de administración colónica y justifican la utilización de esta endo-mananasa para simular los procesos degradativos característicos del colon.

3.- La interacción sinérgica entre el glucomanano de konjac y la goma xantano, con efectos marcados sobre las propiedades reológicas de las dispersiones de sus mezclas, se observó en dos de las variedades estudiadas, la japonesa y la europea, para las que se obtienen geles resistentes con elevados módulos elásticos para sistemas elaborados con una proporción total de polisacáridos de tan sólo el 0,5%. El efecto sinérgico máximo se obtiene cuando ambos polisacáridos se encuentran en la proporción 1/1. La variedad americana, por el contrario, no muestra efecto sinérgico, sino un efecto aditivo en las propiedades reológicas de sus dispersiones con XG.

4.- Las mezclas KGM/XG dan lugar, incluso a concentraciones muy reducidas, a mallas formadas por cadenas poliméricas, reticuladas físicamente, cuyos espacios interiores se rellenan con cantidades importantes de agua con una clara repercusión sobre los procesos de difusión de moléculas en su seno. Así, para fármacos de reducido peso molecular, como el diltiazem o la teofilina, se observan procesos de difusión lentos, fundamentalmente condicionados por la presencia del XG. Por el contrario, en el caso de macromoléculas el proceso de difusión está determinado principalmente por el efecto tamiz que produce la estructura

tridimensional del sistema gelificado que, incluso, retiene las moléculas de mayor tamaño.

5.- Las características de biodegradabilidad del KGM y los efectos de la sinergia entre el KGM y el XG sobre los procesos de difusión son los aspectos que singularizan la utilidad de estos productos como excipientes formas sólidas de liberación modulada. Así, mediante compresión previa granulación vía húmeda, es posible elaborar comprimidos matriz capaces de mantener su integridad física y controlar la cesión de principios activos de elevada hidrosolubilidad durante periodos de tiempo prolongados. Además, las características de biodegradabilidad de los sistemas combinados KGM/XG garantizan la liberación del principio activo en la zona colónica.

APÉNDICE

KGM-Japonés					
Velocidad de cizalla (s ⁻¹)	Viscosidad (Pa·s)	Velocidad de cizalla (s ⁻¹)	Viscosidad (Pa·s)	Velocidad de cizalla (s ⁻¹)	Viscosidad (Pa·s)
0,00206	9,688	0,05487	9,150	3,288	3,836
0,00234	9,599	0,06164	9,139	4,051	3,493
0,00260	9,680	0,06958	9,085	5,143	3,087
0,00293	9,640	0,07862	9,022	6,581	2,707
0,00328	9,661	0,0889	8,951	8,666	2,306
0,00368	9,658	0,1003	8,900	11,61	1,932
0,00412	9,680	0,1135	8,824	16,20	1,553
0,00462	9,675	0,1282	8,768	23,04	1,225
0,00519	9,668	0,1465	8,612	34,77	0,9107
0,00582	9,674	0,1663	8,511	55,17	0,6439
0,00656	9,640	0,1885	8,424	93,91	0,4244
0,00735	9,647	0,2144	8,309	156,6	0,2854
0,00828	9,613	0,2456	8,139	265,1	0,1891
0,00931	9,589	0,2816	7,965	443,8	0,1266
0,01047	9,566	0,3220	7,815	704,5	0,08941
0,01181	9,520	0,3698	7,635	1048,0	0,06738
0,01334	9,455	0,4265	7,428		
0,01491	9,488	0,4927	7,215		
0,01682	9,443	0,5718	6,975		
0,01896	9,399	0,6646	6,733		
0,02132	9,373	0,7776	6,457		
0,02379	9,428	0,9059	6,219		
0,02684	9,374	1,071	5,902		
0,03029	9,321	1,262	5,618		
0,03424	9,253	1,508	5,276		
0,03838	9,262	1,805	4,945		
0,04321	9,231	2,184	4,587		
0,04855	9,216	2,656	4,232		

Tabla A. 1.- Viscosidad en función de la velocidad de cizalla de una disolución de KGM japonés al 0,5% a 37°C. Datos representados en figura 4.1

KGM Europeo			
Velocidad de cizalla (s⁻¹)	Viscosidad (Pa·s)	Velocidad de cizalla (s⁻¹)	Viscosidad (Pa·s)
2,322	0,09552	76,37	0,07289
2,554	0,09745	88,32	0,07070
2,893	0,09654	102,0	0,06871
3,291	0,09518	119,2	0,06594
3,675	0,09564	139,3	0,06330
4,156	0,09490	163,3	0,06057
4,659	0,09502	192,3	0,05768
5,202	0,09547	226,4	0,05495
5,884	0,09470	268,0	0,05208
6,641	0,09414	318,6	0,04914
7,461	0,09402	381,1	0,04607
8,438	0,09328	457,2	0,04307
9,525	0,09271	553,0	0,03992
10,69	0,09268	667,4	0,03709
12,11	0,09182	816,1	0,03401
13,67	0,09121	998,4	0,03117
15,42	0,09071	1227,0	0,02843
17,50	0,08974		
19,89	0,08855		
22,54	0,08768		
25,59	0,08666		
29,19	0,08523		
33,22	0,08401		
37,92	0,08259		
43,42	0,08091		
49,75	0,07923		
57,27	0,07723		
66,08	0,07509		

Tabla A.2.- Viscosidad en función de la velocidad de cizalla de una disolución de KGM europeo al 0,5% a 37°C. Datos representados en figura 4.1

KGM Americano			
Velocidad de cizalla (s^{-1})	Viscosidad (Pa·s)	Velocidad de cizalla (s^{-1})	Viscosidad (Pa·s)
2,355	0,00810	68,20	0,00698
2,766	0,00779	77,21	0,00692
3,091	0,00774	86,73	0,00691
3,471	0,00769	97,16	0,00692
3,896	0,00773	109,7	0,00687
4,413	0,00762	123,3	0,00687
5,058	0,00747	138,2	0,00687
5,650	0,00758	154,7	0,00689
6,331	0,00750	175,6	0,00681
7,159	0,00749	194,8	0,00688
8,126	0,00741	220,4	0,00683
9,187	0,00733	246,9	0,00684
10,40	0,00727	278,5	0,00680
11,59	0,00731	312,8	0,00679
13,27	0,00715	348,9	0,00683
14,94	0,00714	394,0	0,00679
16,63	0,00719	440,1	0,00682
19,05	0,00706	495,1	0,00680
21,46	0,00700	557,7	0,00677
24,15	0,00700	626,7	0,00676
27,09	0,00700	702,6	0,00677
30,13	0,00707	785,3	0,00680
34,15	0,00699	884,8	0,00677
38,36	0,00698	994,3	0,00676
43,23	0,00695	1105,0	0,00682
48,26	0,00699		
54,23	0,00697		
60,95	0,00696		

Tabla A.3.- Viscosidad en función de la velocidad de cizalla de una disolución de KGM europeo al 0,5 a 37°C. Datos representados en figura 4.1

Frecuencia (rad·s ⁻¹)	KGM japonés		KGM europeo		KGM americano	
	G' (Pa)	G'' (Pa)	G' (Pa)	G'' (Pa)	G' (Pa)	G'' (Pa)
0,10	0,134	0,877	0,0001	0,012	0,0003	0,001
0,13	0,187	1,074	0,0001	0,015	0,0004	0,001
0,16	0,258	1,313	0,0002	0,018	0,0004	0,001
0,20	0,358	1,598	0,0001	0,023	0,0004	0,002
0,25	0,488	1,933	0,0001	0,029	0,0004	0,002
0,32	0,661	2,321	0,0000	0,037	0,0004	0,003
0,40	0,889	2,781	0,0000	0,046	0,0004	0,003
0,50	1,178	3,298	0,0002	0,058	0,0002	0,004
0,63	1,539	3,878	0,0002	0,073	0,0000	0,006
0,79	1,998	4,544	0,0004	0,092	0,0000	0,007
1,00	2,563	5,283	0,0003	0,116	0,0000	0,010
1,26	3,245	6,087	0,0005	0,145	0,0000	0,012
1,59	4,062	6,958	0,0006	0,182	0,0000	0,013
2,00	5,020	7,882	0,0007	0,228	0,0000	0,015
2,51	6,136	8,862	0,0013	0,284	0,0000	0,019
3,16	7,405	9,860	0,0025	0,353	0,0000	0,023
3,98	8,865	10,917	0,0043	0,438	0,0000	0,028
5,01	10,494	11,983	0,0085	0,543	0,0000	0,035
6,31	12,310	13,063	0,0166	0,670	0,0000	0,043
7,96	14,333	14,157	0,0327	0,826	0,0000	0,057
9,99	16,477	15,203	0,0575	1,011	0,0000	0,073
12,57	18,807	16,233	0,1064	1,234	0,0000	0,091
15,85	21,327	17,250	0,1678	1,509	0,0000	0,118
19,98	24,003	18,227	0,2518	1,841	0,0000	0,156
25,13	26,767	19,130	0,3658	2,232	0,0000	0,207
31,69	29,683	20,010	0,5202	2,697	0,0000	0,279
39,72	32,590	20,823	0,7176	3,230	0,0000	0,386
50,07	35,613	21,597	0,9675	3,835	0,0000	0,528
62,46	38,543	22,220	1,2390	4,542	0,0000	0,719
77,99	41,487	22,847	1,5463	5,361	0,0000	1,032
100,10	45,057	23,383	2,0530	6,313	0,0921	1,238

Tabla A.4.- Valores de módulo elástico (G') y viscoso (G'') a 37°C de disoluciones al 0,5% de KGM japonés, europeo y americano. Datos representados en figura 4.2

Frecuencia (rad·s ⁻¹)	KGM japonés		KGM europeo		KGM americano	
	G' (Pa)	G'' (Pa)	G' (Pa)	G'' (Pa)	G' (Pa)	G'' (Pa)
0,10	259,700	9,287	225,000	7,991	0,397	0,322
0,13	256,900	8,758	225,800	7,531	0,438	0,356
0,16	258,367	8,432	226,767	7,164	0,482	0,393
0,20	259,767	8,133	227,600	6,816	0,532	0,432
0,25	261,033	7,882	228,467	6,503	0,589	0,474
0,32	262,200	7,666	229,333	6,257	0,652	0,520
0,40	263,333	7,468	230,100	6,030	0,722	0,568
0,50	264,467	7,297	230,867	5,779	0,798	0,619
0,63	265,500	7,149	231,667	5,594	0,884	0,673
0,79	266,600	7,039	232,433	5,410	0,976	0,729
1,00	267,600	6,944	233,133	5,271	1,077	0,789
1,26	268,600	6,872	233,867	5,134	1,185	0,850
1,59	269,633	6,818	234,567	5,012	1,302	0,916
2,00	270,633	6,768	235,233	4,895	1,427	0,984
2,51	271,600	6,752	235,933	4,841	1,561	1,057
3,16	272,567	6,781	236,567	4,743	1,702	1,131
3,98	273,467	6,800	237,233	4,717	1,850	1,213
5,01	274,467	6,841	237,867	4,692	2,007	1,302
6,31	275,467	6,931	238,467	4,681	2,168	1,399
7,96	276,467	7,000	239,100	4,698	2,335	1,507
9,99	277,400	7,106	239,700	4,732	2,493	1,626
12,57	278,400	7,263	240,300	4,791	2,637	1,751
15,85	279,433	7,434	240,967	4,881	2,782	1,874
19,98	280,433	7,643	241,533	4,990	2,953	2,007
25,13	281,500	7,878	242,067	5,133	3,136	2,167
31,69	282,633	8,143	242,733	5,306	3,313	2,362
39,72	283,700	8,442	243,367	5,512	3,487	2,585
50,07	284,833	8,820	244,033	5,769	3,671	2,846
62,46	285,967	9,212	244,567	6,039	3,847	3,121
77,99	287,100	9,636	245,100	6,253	3,915	3,474
100,10	288,267	10,135	245,400	6,714	3,893	4,005

Tabla A.5.- Valores de módulo elástico (G') y viscoso (G'') de disoluciones al 0,5% de XG y KGM japonés, europeo o americano a 37 °C%. Datos representados en figura 4.2

Tiempo (s)	FLUORESCENCIA				
	1	2	3	4	5
2,5	0,7658	0,7654	0,7636	0,7671	0,7688
5	0,8326	0,8320	0,8312	0,8321	0,8348
7,5	0,8698	0,8697	0,8686	0,8690	0,8712
10	0,8921	0,8927	0,8921	0,8930	0,8948
12,5	0,9099	0,9112	0,9085	0,9079	0,9091
15	0,9203	0,9235	0,9214	0,9214	0,9232
17,5	0,9298	0,9330	0,9320	0,9296	0,9328
20	0,9351	0,9367	0,9399	0,9352	0,9401
22,5	0,9439	0,9452	0,9438	0,9442	0,9470
25	0,9498	0,9504	0,9494	0,9480	0,9489
27,5	0,9532	0,9549	0,9536	0,9531	0,9527
30	0,9592	0,9568	0,9566	0,9558	0,9584
32,5	0,9592	0,9596	0,9589	0,9583	0,9616
35	0,9633	0,9634	0,9637	0,9628	0,9626
37,5	0,9645	0,9663	0,9647	0,9635	0,9660
40	0,9674	0,9667	0,9676	0,9649	0,9672
42,5	0,9678	0,9702	0,9692	0,9674	0,9709
45	0,9703	0,9695	0,9707	0,9678	0,9730
47,5	0,9718	0,9739	0,9721	0,9716	0,9736
50	0,9725	0,9746	0,9712	0,9704	0,9765
52,5	0,9747	0,9754	0,9735	0,9740	0,9744
55	0,9764	0,9767	0,9751	0,9728	0,9744
57,5	0,9760	0,9759	0,9745	0,9746	0,9788
60	0,9785	0,9788	0,9779	0,9777	0,9804
62,5	0,9795	0,9800	0,9789	0,9791	0,9800
65	0,9785	0,9816	0,9790	0,9770	0,9784
67,5	0,9782	0,9815	0,9804	0,9765	0,9826
70	0,9803	0,9803	0,9820	0,9792	0,9815

Tabla A.6.- Recuperación de fluorescencia (normalizada) de dextrano $M_w = 70000$ disuelto en una solución de KGM japonés al 0,5%. Datos utilizados para la elaboración de las figuras 4.5 a 4.7

Tiempo (s)	FLUORESCENCIA			Tiempo (s)	FLUORESCENCIA	
	1	2	3		4	5
4	0,8472	0,8382	0,8358	3,5	0,8214	0,8270
8	0,8919	0,8823	0,8806	7	0,8714	0,8753
12	0,9141	0,9089	0,9065	10,5	0,8949	0,8974
16	0,9292	0,9254	0,9246	14	0,9132	0,9143
20	0,9379	0,9339	0,9338	17,5	0,9238	0,926
24	0,9448	0,9446	0,9406	21	0,9300	0,9315
28	0,9493	0,9475	0,9461	24,5	0,9370	0,9397
32	0,9549	0,9495	0,9527	28	0,9447	0,9479
36	0,9566	0,9540	0,9553	31,5	0,9504	0,9514
40	0,9647	0,9615	0,9579	35	0,9514	0,9537
44	0,9659	0,9624	0,9599	38,5	0,9534	0,9553
48	0,9680	0,9646	0,9668	42	0,9587	0,9573
52	0,9689	0,9672	0,9672	45,5	0,9574	0,9609
56	0,9741	0,9688	0,9696	49	0,9626	0,9622
60	0,9731	0,9721	0,9717	52,5	0,9652	0,9667
64	0,9728	0,9744	0,9712	56	0,9662	0,9706
68	0,9750	0,9768	0,9732	59,5	0,9670	0,9696
72	0,9750	0,9758	0,9755	63	0,9684	0,9722
76	0,9756	0,9745	0,9767	66,5	0,973	0,9714
80	0,9787	0,9766	0,9761	70	0,9707	0,9722
84	0,9791	0,9769	0,9783	73,5	0,9712	0,9722
88	0,9795	0,9808	0,9755	77	0,9742	0,9783
92	0,9804	0,9827	0,9776	80,5	0,9740	0,9763
96	0,9803	0,9789	0,9820	84	0,9754	0,9767
100	0,9812	0,9814	0,9805	87,5	0,9754	0,9788
104	0,9816	0,9806	0,9804	91	0,9775	0,9815
108	0,9823	0,9838	0,9803	94,5	0,9768	0,9773
112	0,9813	0,9828	0,9840	98	0,9787	0,9826

Tabla A.7.- Recuperación de fluorescencia (normalizada) de dextrano $M_w = 150000$ disuelto en una solución de KGM japonés al 0,5%. Datos utilizados para la elaboración de las figuras 4.5 a 4.7

Tiempo (s)	FLUORESCENCIA				
	1	2	3	4	5
10	0,6583	0,6614	0,6640	0,6637	0,6641
20	0,7364	0,7364	0,7431	0,7401	0,7416
30	0,7823	0,7810	0,7864	0,7827	0,7846
40	0,8131	0,8145	0,8167	0,8150	0,8171
50	0,8343	0,8354	0,8365	0,8369	0,8362
60	0,8504	0,8527	0,8540	0,8520	0,8529
70	0,8655	0,8657	0,8679	0,8665	0,8668
80	0,8765	0,8764	0,8785	0,8757	0,8768
90	0,8850	0,8868	0,8856	0,8855	0,8863
100	0,8921	0,8950	0,8953	0,8941	0,8935
110	0,8998	0,8983	0,9027	0,9004	0,8970
120	0,9062	0,9049	0,9077	0,9068	0,9062
130	0,9097	0,9109	0,9115	0,9123	0,9108
140	0,9132	0,9170	0,9173	0,9155	0,9136
150	0,9187	0,9222	0,9217	0,9196	0,9172
160	0,9215	0,9254	0,9248	0,9240	0,9219
170	0,9259	0,9287	0,9285	0,9279	0,9252
180	0,9303	0,9299	0,9330	0,9319	0,9287
190	0,9350	0,9349	0,9341	0,9331	0,9323
200	0,9339	0,9368	0,9351	0,9343	0,9318
210	0,9366	0,9392	0,9385	0,9381	0,9332
220	0,9392	0,9414	0,9409	0,9416	0,9369
230	0,9434	0,9447	0,9433	0,9415	0,9401
240	0,9429	0,9444	0,9422	0,9454	0,9424
250	0,9450	0,9456	0,9461	0,9461	0,9428
260	0,9444	0,9494	0,9489	0,9496	0,9454
270	0,9461	0,9486	0,9492	0,9489	0,9469
280	0,9487	0,9509	0,9514	0,9514	0,9496

Tabla A.8.- Recuperación de fluorescencia (normalizada) de dextrano $M_w = 500000$ disuelto en una solución de KGM japonés al 0,5%. Datos utilizados para la elaboración de las figuras 4.5 a 4.7

Tiempo (s)	FLUORESCENCIA		
	1	2	3
30	0,6739	0,6756	0,6760
60	0,7226	0,7239	0,7231
90	0,7499	0,7540	0,7484
120	0,7669	0,7712	0,7634
150	0,7782	0,7840	0,7802
180	0,7897	0,7926	0,7911
210	0,7979	0,8064	0,7965
240	0,8077	0,8111	0,8061
270	0,8145	0,8161	0,8115
300	0,8189	0,8233	0,8209
330	0,8241	0,8277	0,8241
360	0,8298	0,8359	0,8262
390	0,8333	0,8384	0,8317
420	0,8362	0,8430	0,8342
450	0,8403	0,8456	0,8365
480	0,8470	0,8491	0,8423
510	0,8481	0,8546	0,8439
540	0,8525	0,8548	0,8470
570	0,8531	0,8576	0,8500
600	0,8570	0,8625	0,8532
630	0,8586	0,8629	0,8532
660	0,8605	0,8657	0,8552
690	0,8641	0,8682	0,8580
720	0,8671	0,8695	0,8608
750	0,8678	0,8731	0,8619
780	0,8704	0,8736	0,8653
810	0,8728	0,8743	0,8667
840	0,8750	0,8769	0,8682

Tabla A.9.- Recuperación de fluorescencia (normalizada) de dextrano $M_w = 2000000$ disuelto en una solución de KGM japonés al 0,5%. Datos representados en la figura 4.4

Tiempo (s)	FLUORESCENCIA				
	1	2	3	4	5
2,5	0,7658	0,7654	0,7636	0,7671	0,7688
5	0,8326	0,8320	0,8312	0,8321	0,8348
7,5	0,8698	0,8697	0,8686	0,8690	0,8712
10	0,8921	0,8927	0,8921	0,8930	0,8948
12,5	0,9099	0,9112	0,9085	0,9079	0,9091
15	0,9203	0,9235	0,9214	0,9214	0,9232
17,5	0,9298	0,9330	0,9320	0,9296	0,9328
20	0,9351	0,9367	0,9399	0,9352	0,9401
22,5	0,9439	0,9452	0,9438	0,9442	0,9470
25	0,9498	0,9504	0,9494	0,9480	0,9489
27,5	0,9532	0,9549	0,9536	0,9531	0,9527
30	0,9592	0,9568	0,9566	0,9558	0,9584
32,5	0,9592	0,9596	0,9589	0,9583	0,9616
35	0,9633	0,9634	0,9637	0,9628	0,9626
37,5	0,9645	0,9663	0,9647	0,9635	0,9660
40	0,9674	0,9667	0,9676	0,9649	0,9672
42,5	0,9678	0,9702	0,9692	0,9674	0,9709
45	0,9703	0,9695	0,9707	0,9678	0,9730
47,5	0,9718	0,9739	0,9721	0,9716	0,9736
50	0,9725	0,9746	0,9712	0,9704	0,9765
52,5	0,9747	0,9754	0,9735	0,9740	0,9744
55	0,9764	0,9767	0,9751	0,9728	0,9744
57,5	0,9760	0,9759	0,9745	0,9746	0,9788
60	0,9785	0,9788	0,9779	0,9777	0,9804
62,5	0,9795	0,9800	0,9789	0,9791	0,9800
65	0,9785	0,9816	0,9790	0,9770	0,9784
67,5	0,9782	0,9815	0,9804	0,9765	0,9826
70	0,9803	0,9803	0,9820	0,9792	0,9815

Tabla A.10.- Recuperación de fluorescencia (normalizada) de dextrano $M_w = 70000$ disuelto en una solución de KGM europeo al 0,5%. Datos utilizados para la elaboración de las figuras 4.5 a 4.7

Tiempo (s)	FLUORESCENCIA			Tiempo (s)	FLUORESCENCIA	
	1	2	3		4	5
4	0,8472	0,8382	0,8358	3,5	0,8214	0,8270
8	0,8919	0,8823	0,8806	7	0,8714	0,8753
12	0,9141	0,9089	0,9065	10,5	0,8949	0,8974
16	0,9292	0,9254	0,9246	14	0,9132	0,9143
20	0,9379	0,9339	0,9338	17,5	0,9238	0,9260
24	0,9448	0,9446	0,9406	21	0,9300	0,9315
28	0,9493	0,9475	0,9461	24,5	0,9370	0,9397
32	0,9549	0,9495	0,9527	28	0,9447	0,9479
36	0,9566	0,9540	0,9553	31,5	0,9504	0,9514
40	0,9647	0,9615	0,9579	35	0,9514	0,9537
44	0,9659	0,9624	0,9599	38,5	0,9534	0,9553
48	0,9680	0,9646	0,9668	42	0,9587	0,9573
52	0,9689	0,9672	0,9672	45,5	0,9574	0,9609
56	0,9741	0,9688	0,9696	49	0,9626	0,9622
60	0,9731	0,9721	0,9717	52,5	0,9652	0,9667
64	0,9728	0,9744	0,9712	56	0,9662	0,9706
68	0,9750	0,9768	0,9732	59,5	0,9670	0,9696
72	0,9750	0,9758	0,9755	63	0,9684	0,9722
76	0,9756	0,9745	0,9767	66,5	0,9730	0,9714
80	0,9787	0,9766	0,9761	70	0,9707	0,9722
84	0,9791	0,9769	0,9783	73,5	0,9712	0,9722
88	0,9795	0,9808	0,9755	77	0,9742	0,9783
92	0,9804	0,9827	0,9776	80,5	0,9740	0,9763
96	0,9803	0,9789	0,9820	84	0,9754	0,9767
100	0,9812	0,9814	0,9805	87,5	0,9754	0,9788
104	0,9816	0,9806	0,9804	91	0,9775	0,9815
108	0,9823	0,9838	0,9803	94,5	0,9768	0,9773
112	0,9813	0,9828	0,9840	98	0,9787	0,9826

Tabla A.11.- Recuperación de fluorescencia (normalizada) de dextrano $M_w = 150000$ disuelto en una solución de KGM europeo al 0,5%. Datos utilizados para la elaboración de las figuras 4.5 a 4.7

Tiempo (s)	FLUORESCENCIA				
	1	2	3	4	5
10	0,6583	0,6614	0,6640	0,6637	0,6641
20	0,7364	0,7364	0,7431	0,7401	0,7416
30	0,7823	0,7810	0,7864	0,7827	0,7846
40	0,8131	0,8145	0,8167	0,8150	0,8171
50	0,8343	0,8354	0,8365	0,8369	0,8362
60	0,8504	0,8527	0,8540	0,8520	0,8529
70	0,8655	0,8657	0,8679	0,8665	0,8668
80	0,8765	0,8764	0,8785	0,8757	0,8768
90	0,8850	0,8868	0,8856	0,8855	0,8863
100	0,8921	0,895	0,8953	0,8941	0,8935
110	0,8998	0,8983	0,9027	0,9004	0,8970
120	0,9062	0,9049	0,9077	0,9068	0,9062
130	0,9097	0,9109	0,9115	0,9123	0,9108
140	0,9132	0,9170	0,9173	0,9155	0,9136
150	0,9187	0,9222	0,9217	0,9196	0,9172
160	0,9215	0,9254	0,9248	0,9240	0,9219
170	0,9259	0,9287	0,9285	0,9279	0,9252
180	0,9303	0,9299	0,9330	0,9319	0,9287
190	0,9350	0,9349	0,9341	0,9331	0,9323
200	0,9339	0,9368	0,9351	0,9343	0,9318
210	0,9366	0,9392	0,9385	0,9381	0,9332
220	0,9392	0,9414	0,9409	0,9416	0,9369
230	0,9434	0,9447	0,9433	0,9415	0,9401
240	0,9429	0,9444	0,9422	0,9454	0,9424
250	0,9450	0,9456	0,9461	0,9461	0,9428
260	0,9444	0,9494	0,9489	0,9496	0,9454
270	0,9461	0,9486	0,9492	0,9489	0,9469
280	0,9487	0,9509	0,9514	0,9514	0,9496

Tabla A.12.- Recuperación de fluorescencia (normalizada) de dextrano $M_w = 500000$ disuelto en una solución de KGM europeo al 0,5%. Datos utilizados para la elaboración de las figuras 4.5 a 4.7

Tiempo (s)	FLUORESCENCIA		
	1	2	3
30	0,6739	0,6756	0,6760
60	0,7226	0,7239	0,7231
90	0,7499	0,7540	0,7484
120	0,7669	0,7712	0,7634
150	0,7782	0,7840	0,7802
180	0,7897	0,7926	0,7911
210	0,7979	0,8064	0,7965
240	0,8077	0,8111	0,8061
270	0,8145	0,8161	0,8115
300	0,8189	0,8233	0,8209
330	0,8241	0,8277	0,8241
360	0,8298	0,8359	0,8262
390	0,8333	0,8384	0,8317
420	0,8362	0,8430	0,8342
450	0,8403	0,8456	0,8365
480	0,8470	0,8491	0,8423
510	0,8481	0,8546	0,8439
540	0,8525	0,8548	0,8470
570	0,8531	0,8576	0,8500
600	0,8570	0,8625	0,8532
630	0,8586	0,8629	0,8532
660	0,8605	0,8657	0,8552
690	0,8641	0,8682	0,8580
720	0,8671	0,8695	0,8608
750	0,8678	0,8731	0,8619
780	0,8704	0,8736	0,8653
810	0,8728	0,8743	0,8667
840	0,8750	0,8769	0,8682

Tabla A.13.- Recuperación de fluorescencia (normalizada) de dextrano $M_w = 2000000$ disuelto en una solución de KGM europeo al 0,5%. Datos representados en la figura 4.4

Tiempo (s)	FLUORESCENCIA				
	1	2	3	4	5
2,5	0,7998	0,8033	0,8002	0,7961	0,7956
5	0,8698	0,8708	0,8687	0,8585	0,8559
7,5	0,9044	0,9039	0,9034	0,8910	0,8892
10	0,9243	0,9242	0,9223	0,9091	0,9124
12,5	0,9390	0,9367	0,9346	0,9249	0,9241
15	0,9479	0,9450	0,9448	0,9348	0,9348
17,5	0,9553	0,9516	0,9520	0,9446	0,9437
20	0,9604	0,9560	0,9564	0,9490	0,9486
22,5	0,9657	0,9614	0,9617	0,9540	0,9539
25	0,9697	0,9657	0,9652	0,9580	0,9589
27,5	0,9738	0,9683	0,9681	0,9619	0,9616
30	0,9742	0,9714	0,9698	0,9646	0,9636
32,5	0,9772	0,9734	0,972	0,9670	0,9663
35	0,9791	0,9747	0,9741	0,9699	0,9689
37,5	0,9804	0,9771	0,9772	0,9722	0,9721
40	0,9816	0,9781	0,9775	0,9727	0,9736
42,5	0,9844	0,9800	0,9785	0,9746	0,9747
45	0,9851	0,9807	0,9801	0,976	0,9764
47,5	0,9872	0,9825	0,9812	0,9763	0,9773
50	0,9858	0,9805	0,9824	0,9776	0,9800
52,5	0,9863	0,9848	0,9826	0,9790	0,9799
55	0,9845	0,9842	0,9842	0,9802	0,9802
57,5	0,9889	0,9856	0,9849	0,9806	0,9820
60	0,9888	0,9858	0,9849	0,9816	0,9829
62,5	0,9893	0,9858	0,9860	0,9831	0,9826
65	0,9896	0,9868	0,9879	0,9831	0,9833
67,5	0,9896	0,9851	0,9851	0,9833	0,9836
70	0,9894	0,9863	0,9871	0,9847	0,9855

Tabla A.14.- Recuperación de fluorescencia (normalizada) de dextrano $M_w = 70000$ disuelto en una solución de KGM americano al 0,5%. Datos utilizados para la elaboración de las figuras 4.5 a 4.7

Tiempo (s)	FLUORESCENCIA				
	1	2	3	4	5
2,5	0,8113	0,8056	0,8150	0,8216	0,8200
5	0,8692	0,8643	0,8733	0,8697	0,8721
7,5	0,8977	0,8955	0,9011	0,8998	0,8992
10	0,9184	0,9149	0,9194	0,9157	0,9154
12,5	0,9300	0,9286	0,9306	0,9282	0,9266
15	0,9412	0,9368	0,9417	0,9372	0,9367
17,5	0,9469	0,9452	0,9475	0,9445	0,9431
20	0,9520	0,9503	0,9539	0,9506	0,9499
22,5	0,9564	0,9540	0,9572	0,9557	0,9543
25	0,9617	0,9602	0,9619	0,9590	0,9586
27,5	0,9636	0,9627	0,9639	0,9619	0,9613
30	0,9671	0,9640	0,9660	0,9659	0,9647
32,5	0,9705	0,9669	0,9700	0,9666	0,9652
35	0,9721	0,9685	0,9710	0,9703	0,9668
37,5	0,9729	0,9701	0,9729	0,9715	0,9692
40	0,9734	0,9725	0,9730	0,9727	0,9712
42,5	0,9758	0,9729	0,9751	0,9737	0,9733
45	0,9779	0,9738	0,9760	0,9747	0,9727
47,5	0,9782	0,9769	0,9771	0,9773	0,9759
50	0,9788	0,9782	0,9783	0,9791	0,9763
52,5	0,9811	0,9778	0,9795	0,9793	0,9778
55	0,9806	0,9800	0,9817	0,9806	0,9777
57,5	0,9802	0,9803	0,9817	0,9814	0,9796
60	0,9827	0,9814	0,9819	0,9813	0,9808
62,5	0,9836	0,9824	0,9827	0,9816	0,9805
65	0,9838	0,9853	0,9836	0,9832	0,9804
67,5	0,9850	0,9829	0,9841	0,9843	0,9816
70	0,9838	0,9839	0,9846	0,9840	0,9835

Tabla A.15.- Recuperación de fluorescencia (normalizada) de dextrano $M_w = 150000$ disuelto en una solución de KGM americano al 0,5%. Datos utilizados para la elaboración de las figuras 4.5 a 4.7

Tiempo (s)	FLUORESCENCIA				
	1	2	3	4	5
4	0,6708	0,6697	0,6676	0,6726	0,6749
8	0,7528	0,7521	0,7489	0,7563	0,7551
12	0,8021	0,7998	0,7970	0,8033	0,8058
16	0,8332	0,8316	0,8297	0,8357	0,8359
20	0,8564	0,8556	0,8528	0,8582	0,8579
24	0,8743	0,8720	0,8691	0,8743	0,8756
28	0,8878	0,8857	0,8842	0,8879	0,8885
32	0,8979	0,8981	0,8958	0,8979	0,8986
36	0,9071	0,9060	0,9021	0,9083	0,9086
40	0,9135	0,9132	0,9099	0,9163	0,9156
44	0,9201	0,9191	0,9173	0,9214	0,9219
48	0,9255	0,9253	0,9216	0,9274	0,9272
52	0,9319	0,9274	0,9269	0,9314	0,9311
56	0,9361	0,9343	0,9312	0,9355	0,9367
60	0,9386	0,9382	0,9356	0,9394	0,9397
64	0,9420	0,9411	0,9384	0,9428	0,9433
68	0,9455	0,9436	0,9419	0,9454	0,9453
72	0,9468	0,9464	0,9450	0,9479	0,9464
76	0,9498	0,9493	0,9458	0,9509	0,9498
80	0,9535	0,9509	0,9491	0,951	0,9515
84	0,9537	0,9521	0,9507	0,9558	0,954
88	0,9547	0,9543	0,9527	0,9564	0,9566
92	0,9562	0,9561	0,9531	0,9588	0,9562
96	0,9590	0,9585	0,9550	0,9593	0,9589
100	0,9609	0,9610	0,9584	0,9631	0,9602
104	0,9632	0,9617	0,9579	0,9633	0,9610
108	0,9631	0,9618	0,9605	0,9653	0,9638
112	0,9644	0,9642	0,9613	0,9653	0,9634

Tabla A.16.- Recuperación de fluorescencia (normalizada) de dextrano $M_w = 500000$ disuelto en una solución de KGM americano al 0,5%. Datos utilizados para la elaboración de las figuras 4.5 a 4.7

Tiempo (s)	FLUORESCENCIA				
	1	2	3	4	5
8	0,6797	0,6910	0,7028	0,7006	0,6953
16	0,7513	0,7669	0,7750	0,7733	0,7693
24	0,7922	0,8091	0,8146	0,8128	0,8117
32	0,8226	0,8378	0,8435	0,8407	0,8390
40	0,8423	0,8570	0,8644	0,8606	0,8602
48	0,8585	0,8719	0,8780	0,8772	0,8763
56	0,8722	0,8860	0,8908	0,8879	0,8855
64	0,8824	0,8934	0,9004	0,8982	0,8970
72	0,8934	0,9035	0,9097	0,9068	0,9052
80	0,8999	0,9116	0,9154	0,9143	0,9137
88	0,9076	0,9174	0,9215	0,9191	0,9184
96	0,9120	0,9234	0,9276	0,9243	0,9240
104	0,9157	0,9268	0,9298	0,9265	0,9298
112	0,9225	0,9312	0,9347	0,9345	0,9331
120	0,9251	0,9351	0,9384	0,9383	0,9362
128	0,9301	0,9375	0,9427	0,9425	0,939
136	0,9321	0,9431	0,9444	0,9438	0,9421
144	0,9377	0,9466	0,9477	0,9474	0,9446
152	0,9390	0,9458	0,9491	0,9491	0,9484
160	0,9424	0,9491	0,9517	0,9520	0,9490
168	0,9437	0,9504	0,9539	0,9535	0,9513
176	0,9459	0,9526	0,9573	0,9535	0,9527
184	0,9471	0,9538	0,9552	0,9562	0,9535
192	0,9494	0,9558	0,9575	0,9569	0,9592
200	0,9518	0,9571	0,9602	0,9576	0,9594
208	0,9531	0,9576	0,9614	0,9620	0,9590
216	0,9562	0,9600	0,9642	0,9599	0,9607
224	0,9567	0,9609	0,9636	0,9618	0,9607

Tabla A.17.- Recuperación de fluorescencia (normalizada) de dextrano $M_w = 2000000$ disuelto en una solución de KGM americano al 0,5%. Datos representados en la figura 4.4

Tiempo (s)	FLUORESCENCIA				
	1	2	3	4	5
2,5	0,7926	0,7919	0,7922	0,7878	0,7845
5	0,8556	0,8549	0,8565	0,8511	0,8507
7,5	0,8883	0,8873	0,8897	0,8858	0,8846
10	0,9101	0,9093	0,9092	0,9081	0,9065
12,5	0,9235	0,9227	0,9242	0,9204	0,9217
15	0,9340	0,9328	0,9328	0,9317	0,9320
17,5	0,9419	0,9413	0,9417	0,9399	0,9391
20	0,9492	0,9473	0,9499	0,9471	0,9476
22,5	0,9539	0,9520	0,9532	0,9532	0,9527
25	0,9577	0,9566	0,9575	0,9564	0,9564
27,5	0,9624	0,9591	0,9607	0,9600	0,9601
30	0,9657	0,9624	0,9643	0,9639	0,9627
32,5	0,9677	0,9642	0,9668	0,9661	0,9668
35	0,9679	0,9661	0,9689	0,9675	0,9681
37,5	0,9722	0,9697	0,9690	0,9700	0,9701
40	0,9714	0,9699	0,9709	0,9711	0,9733
42,5	0,9762	0,9719	0,9740	0,9736	0,9729
45	0,9758	0,9732	0,9760	0,9749	0,9750
47,5	0,9790	0,9742	0,9760	0,9771	0,9767
50	0,9778	0,9756	0,9758	0,9773	0,9779
52,5	0,9797	0,9752	0,9779	0,9773	0,9781
55	0,9811	0,9768	0,9798	0,9786	0,9791
57,5	0,9794	0,9781	0,9796	0,9786	0,9810
60	0,9823	0,9778	0,9817	0,9810	0,9803
62,5	0,9812	0,9798	0,9814	0,9820	0,9826
65	0,9822	0,9817	0,9812	0,9814	0,9835
67,5	0,9839	0,9812	0,9837	0,9827	0,9821
70	0,9853	0,9818	0,9837	0,9822	0,9836

Tabla A.18.- Recuperación de fluorescencia (normalizada) de dextrano $M_w = 70000$ disuelto en una solución de Xantano al 0,5%. Datos utilizados para la elaboración de las figuras 4.5 a 4.7

Tiempo (s)	FLUORESCENCIA				
	1	2	3	4	5
2,5	0,7906	0,7866	0,7865	0,7888	0,7936
5	0,8534	0,8509	0,8508	0,8513	0,8564
7,5	0,8865	0,8831	0,8842	0,8845	0,8866
10	0,9067	0,9039	0,9029	0,9044	0,9074
12,5	0,9185	0,9162	0,9179	0,9183	0,9199
15	0,9289	0,9280	0,9293	0,9285	0,9316
17,5	0,9371	0,9348	0,9364	0,9368	0,9383
20	0,9439	0,9424	0,9435	0,9434	0,9447
22,5	0,9498	0,9455	0,9482	0,9470	0,9491
25	0,9525	0,9501	0,9525	0,9515	0,9525
27,5	0,9555	0,9552	0,9564	0,9551	0,9567
30	0,9595	0,9572	0,9595	0,9587	0,9586
32,5	0,9641	0,9602	0,9624	0,9612	0,9627
35	0,9653	0,9624	0,9649	0,9649	0,9642
37,5	0,9673	0,9643	0,9661	0,9656	0,9664
40	0,9672	0,9663	0,9689	0,9665	0,9679
42,5	0,9700	0,9682	0,9718	0,9713	0,9696
45	0,9711	0,9693	0,9703	0,9705	0,9721
47,5	0,9737	0,9700	0,9730	0,9705	0,9728
50	0,9745	0,9702	0,9743	0,9728	0,9739
52,5	0,9739	0,9720	0,9755	0,9742	0,9742
55	0,9767	0,9752	0,9748	0,9752	0,9755
57,5	0,9769	0,9752	0,9772	0,9767	0,9756
60	0,9780	0,9755	0,9782	0,9766	0,9777
62,5	0,9797	0,9764	0,9776	0,9768	0,9783
65	0,9789	0,9759	0,9792	0,9782	0,9795
67,5	0,9800	0,9788	0,9797	0,9784	0,9797
70	0,9803	0,9778	0,9808	0,9798	0,9810

Tabla A.19.- Recuperación de fluorescencia (normalizada) de dextrano $M_w = 150000$ disuelto en una solución de Xantano al 0,5%. Datos utilizados para la elaboración de las figuras 4.5 a 4.7

Tiempo (s)	FLUORESCENCIA			Tiempo (s)	FLUORESCENCIA	
	1	2	3		4	5
6	0,6725	0,6682	0,6655	4	0,6289	0,6286
12	0,7553	0,7538	0,7509	8	0,7263	0,7245
18	0,8042	0,8030	0,8009	12	0,7807	0,7767
24	0,8362	0,8342	0,8329	16	0,8150	0,8135
30	0,8579	0,8562	0,8556	20	0,8403	0,8381
36	0,8746	0,8738	0,8713	24	0,8587	0,8566
42	0,8873	0,8864	0,8861	28	0,8731	0,8726
48	0,8989	0,8986	0,8954	32	0,8854	0,8851
54	0,9072	0,9058	0,9051	36	0,8947	0,8930
60	0,9134	0,9141	0,9128	40	0,903	0,9010
66	0,9204	0,9211	0,9193	44	0,9097	0,9090
72	0,9255	0,9242	0,9235	48	0,9164	0,9141
78	0,9298	0,9296	0,9282	52	0,9210	0,9199
84	0,9345	0,9341	0,9323	56	0,9251	0,9234
90	0,9376	0,9378	0,9371	60	0,9283	0,9278
96	0,9411	0,9420	0,9392	64	0,9327	0,9308
102	0,9444	0,9437	0,9427	68	0,9357	0,9347
108	0,9471	0,9467	0,9439	72	0,9379	0,9356
114	0,9487	0,9487	0,9459	76	0,9399	0,9408
120	0,9506	0,9518	0,9500	80	0,9444	0,9439
126	0,9531	0,9538	0,9511	84	0,9475	0,9459
132	0,9547	0,9549	0,9535	88	0,9478	0,9470
138	0,9569	0,9558	0,9558	92	0,9485	0,9492
144	0,9588	0,9597	0,9553	96	0,9509	0,9506
150	0,9588	0,9598	0,9584	100	0,9540	0,9520
156	0,9595	0,9630	0,9595	104	0,9544	0,9530
162	0,9614	0,9625	0,9588	108	0,9551	0,9550
168	0,9625	0,9632	0,9618	112	0,9573	0,9543

Tabla A.20.- Recuperación de fluorescencia (normalizada) de dextrano $M_w = 500000$ disuelto en una solución de Xantano al 0,5%. Datos utilizados para la elaboración de las figuras 4.5 a 4.7

Tiempo (s)	FLUORESCENCIA			
	1	2	3	4
30	0,7459	0,7409	0,7450	0,7388
60	0,8103	0,8069	0,8096	0,8037
90	0,8461	0,8432	0,8464	0,8373
120	0,8683	0,8653	0,8675	0,8622
150	0,8851	0,8816	0,8829	0,8770
180	0,8985	0,8944	0,8968	0,8900
210	0,9067	0,9032	0,9036	0,9015
240	0,9140	0,9116	0,9140	0,9080
270	0,9212	0,9175	0,9186	0,9145
300	0,9268	0,9222	0,9250	0,9189
330	0,9316	0,9282	0,9296	0,9256
360	0,9358	0,9326	0,9359	0,9304
390	0,9409	0,9371	0,9365	0,9334
420	0,9429	0,9388	0,9414	0,9369
450	0,9460	0,9428	0,9442	0,9390
480	0,9467	0,9453	0,9472	0,9419
510	0,9490	0,9468	0,9497	0,9438
540	0,9524	0,9503	0,9516	0,9450
570	0,9525	0,9514	0,9513	0,9486
600	0,9563	0,9528	0,9562	0,9506
630	0,9576	0,9544	0,9572	0,953
660	0,9603	0,9552	0,9577	0,9544
690	0,9608	0,9582	0,9601	0,9542
720	0,9606	0,9589	0,9598	0,9556
750	0,9636	0,9627	0,9625	0,9593
780	0,9643	0,9611	0,9646	0,9606
810	0,9640	0,9633	0,9643	0,9602
840	0,9641	0,9645	0,9650	0,9614

Tabla A.21.- Recuperación de fluorescencia (normalizada) de dextrano $M_w = 2000000$ disuelto en una solución de Xantano al 0,5%. Datos utilizados para la elaboración de las figuras 4.5 a 4.7

Tiempo (s)	FLUORESCENCIA				
	1	2	3	4	5
2,5	0,7977	0,7872	0,7838	0,7861	0,7873
5	0,8583	0,8518	0,8487	0,8515	0,8516
7,5	0,8919	0,8853	0,8835	0,8859	0,8855
10	0,9114	0,9060	0,9067	0,9080	0,9085
12,5	0,9260	0,9192	0,9221	0,9202	0,9220
15	0,9359	0,9307	0,9319	0,9333	0,9326
17,5	0,9450	0,9387	0,9391	0,9415	0,9424
20	0,9487	0,9467	0,9460	0,9459	0,9481
22,5	0,9536	0,9495	0,9506	0,9533	0,9526
25	0,9590	0,9541	0,9554	0,9574	0,9549
27,5	0,9635	0,9572	0,9588	0,9588	0,9603
30	0,9653	0,9601	0,9610	0,9626	0,9656
32,5	0,9674	0,9633	0,9636	0,9666	0,9665
35	0,9710	0,9666	0,9668	0,9682	0,9700
37,5	0,9714	0,9683	0,9693	0,9704	0,9710
40	0,9726	0,9701	0,9700	0,9725	0,9747
42,5	0,9749	0,9710	0,9717	0,9735	0,9738
45	0,9764	0,9725	0,9740	0,9747	0,9759
47,5	0,9769	0,9755	0,9749	0,9761	0,9770
50	0,9799	0,9746	0,9780	0,9758	0,9787
52,5	0,9806	0,9774	0,9771	0,9779	0,9801
55	0,9799	0,9782	0,9777	0,9794	0,9809
57,5	0,9803	0,9782	0,9800	0,9822	0,9822
60	0,9820	0,9784	0,9810	0,9807	0,9834
62,5	0,9825	0,9801	0,9803	0,9809	0,9844
65	0,9852	0,9810	0,9813	0,9807	0,9835
67,5	0,9852	0,9824	0,9811	0,9829	0,9838
70	0,9833	0,9802	0,9830	0,9834	0,9860

Tabla A.22.- Recuperación de fluorescencia (normalizada) de dextrano $M_w = 70000$ disuelto en sistemas KGM japonés/XG al 0,5%. Datos utilizados para la elaboración de las figuras 4.5 a 4.7

Tiempo (s)	FLUORESCENCIA				
	1	2	3	4	5
3,5	0,8149	0,8134	0,8156	0,8131	0,8126
7	0,8670	0,8687	0,8689	0,8660	0,8646
10,5	0,8972	0,8958	0,8957	0,8932	0,8920
14	0,9129	0,9139	0,9120	0,9114	0,9112
17,5	0,9244	0,9233	0,9246	0,9262	0,9229
21	0,9330	0,9340	0,9341	0,9327	0,9312
24,5	0,9409	0,9399	0,9402	0,9400	0,9383
28	0,9490	0,9442	0,9457	0,9450	0,9442
31,5	0,9518	0,9505	0,9509	0,9494	0,9494
35	0,9548	0,9541	0,9547	0,9528	0,9516
38,5	0,9584	0,9568	0,9579	0,9579	0,9559
42	0,9610	0,9593	0,9615	0,9600	0,9598
45,5	0,9637	0,9617	0,9631	0,9629	0,9608
49	0,9659	0,9644	0,9646	0,9650	0,9633
52,5	0,9663	0,9654	0,9671	0,9672	0,9652
56	0,9696	0,9679	0,9689	0,9667	0,9664
59,5	0,9708	0,9688	0,9701	0,9688	0,9679
63	0,9718	0,9729	0,9713	0,9711	0,9705
66,5	0,9725	0,9711	0,9729	0,9715	0,9713
70	0,9749	0,9723	0,9734	0,9734	0,9710
73,5	0,9750	0,9737	0,9755	0,9741	0,9724
77	0,9764	0,9753	0,9768	0,9764	0,9750
80,5	0,9756	0,9765	0,9759	0,9762	0,9744
84	0,9780	0,9782	0,9774	0,9763	0,9756
87,5	0,9794	0,9777	0,9778	0,9787	0,9756
91	0,9796	0,9789	0,9790	0,9779	0,9786
94,5	0,9781	0,9768	0,9793	0,9800	0,9787
98	0,9803	0,9788	0,9799	0,9813	0,9791

Tabla A.23.- Recuperación de fluorescencia (normalizada) de dextrano $M_w = 150000$ disuelto en sistemas KGM japonés/XG al 0,5%. Datos utilizados para la elaboración de las figuras 4.5 a 4.7

Tiempo (s)	FLUORESCENCIA				
	1	2	3	4	5
8	0,6928	0,6945	0,7107	0,6873	0,6932
16	0,7617	0,7643	0,7801	0,759	0,7626
24	0,8011	0,8035	0,8213	0,8004	0,8031
32	0,8297	0,8295	0,8468	0,8256	0,8301
40	0,8486	0,8503	0,8672	0,8482	0,8489
48	0,8629	0,8653	0,8823	0,8628	0,8654
56	0,8739	0,8752	0,8942	0,8742	0,8782
64	0,8859	0,8874	0,9032	0,8841	0,886
72	0,8929	0,8941	0,9133	0,8908	0,8938
80	0,9005	0,9001	0,9198	0,9003	0,9012
88	0,9061	0,9072	0,9269	0,9049	0,9065
96	0,9111	0,9114	0,9317	0,9108	0,9111
104	0,9154	0,9161	0,9363	0,9163	0,9163
112	0,9186	0,9202	0,9398	0,9193	0,9206
120	0,9218	0,924	0,9441	0,921	0,9252
128	0,9262	0,9267	0,9481	0,9271	0,9271
136	0,9286	0,9297	0,9507	0,928	0,9299
144	0,9313	0,933	0,9562	0,931	0,9331
152	0,9346	0,9358	0,9562	0,9344	0,9357
160	0,9359	0,9377	0,9607	0,9369	0,9384
168	0,9384	0,9392	0,9622	0,9394	0,9405
176	0,9406	0,9408	0,9635	0,9413	0,9418
184	0,9421	0,9428	0,9663	0,9422	0,9435
192	0,9441	0,9452	0,9675	0,9433	0,9455
200	0,946	0,9462	0,9693	0,9446	0,9472
208	0,947	0,9472	0,971	0,9459	0,9483
216	0,9495	0,9501	0,973	0,9474	0,9495
224	0,9502	0,9514	0,9751	0,9503	0,9527

Tabla A.24.- Recuperación de fluorescencia (normalizada) de dextrano $M_w = 500000$ disuelto en sistemas KGM japonés/XG al 0,5%. Datos utilizados para la elaboración de las figuras 4.5 a 4.7

Tiempo (s)	FLUORESCENCIA		
	1	2	3
2,5	0,7658	0,7654	0,7636
5	0,8326	0,8320	0,8312
7,5	0,8698	0,8697	0,8686
10	0,8921	0,8927	0,8921
12,5	0,9099	0,9112	0,9085
15	0,9203	0,9235	0,9214
17,5	0,9298	0,933	0,932
20	0,9351	0,9367	0,9399
22,5	0,9439	0,9452	0,9438
25	0,9498	0,9504	0,9494
27,5	0,9532	0,9549	0,9536
30	0,9592	0,9568	0,9566
32,5	0,9592	0,9596	0,9589
35	0,9633	0,9634	0,9637
37,5	0,9645	0,9663	0,9647
40	0,9674	0,9667	0,9676
42,5	0,9678	0,9702	0,9692
45	0,9703	0,9695	0,9707
47,5	0,9718	0,9739	0,9721
50	0,9725	0,9746	0,9712
52,5	0,9747	0,9754	0,9735
55	0,9764	0,9767	0,9751
57,5	0,976	0,9759	0,9745
60	0,9785	0,9788	0,9779
62,5	0,9795	0,9800	0,9789
65	0,9785	0,9816	0,9790
67,5	0,9782	0,9815	0,9804
70	0,9803	0,9803	0,9820

Tabla A.25.- Recuperación de fluorescencia (normalizada) de dextrano $M_w = 2000000$ disuelto en sistemas KGM japonés/XG al 0,5%. Datos representados en la figura 4.4

Tiempo (s)	FLUORESCENCIA				
	1	2	3	4	5
2,5	0,8023	0,8023	0,8019	0,8069	0,8027
5	0,8668	0,8663	0,8644	0,8674	0,8647
7,5	0,8985	0,8973	0,8963	0,9008	0,8971
10	0,9184	0,9173	0,9157	0,9206	0,9170
12,5	0,9308	0,9291	0,9311	0,931	0,9287
15	0,9400	0,9415	0,9397	0,9407	0,9398
17,5	0,9469	0,9469	0,9457	0,9483	0,9480
20	0,9527	0,9523	0,9528	0,9546	0,9527
22,5	0,9584	0,9584	0,9557	0,9602	0,9578
25	0,9606	0,9635	0,9603	0,9637	0,9618
27,5	0,9656	0,9648	0,9637	0,9658	0,9663
30	0,9678	0,9686	0,9683	0,9703	0,9671
32,5	0,9706	0,9702	0,9682	0,9704	0,9675
35	0,973	0,9725	0,9705	0,9728	0,9721
37,5	0,9753	0,9737	0,9724	0,974	0,9755
40	0,9739	0,9754	0,9744	0,9766	0,9772
42,5	0,9765	0,9768	0,9752	0,9790	0,9784
45	0,9792	0,978	0,9782	0,9785	0,9788
47,5	0,979	0,9793	0,9783	0,9799	0,9814
50	0,9814	0,9809	0,9817	0,9822	0,9797
52,5	0,9816	0,9824	0,9809	0,9827	0,9801
55	0,9808	0,983	0,9838	0,9824	0,9820
57,5	0,9834	0,9831	0,9838	0,9830	0,9838
60	0,9828	0,9834	0,9821	0,9834	0,9849
62,5	0,9843	0,9828	0,9826	0,9871	0,9855
65	0,9840	0,9848	0,9848	0,9849	0,9848
67,5	0,9861	0,9850	0,9845	0,9865	0,9849
70	0,9862	0,9857	0,9859	0,9862	0,9861

Tabla A.26.- Recuperación de fluorescencia (normalizada) de dextrano $M_w = 70000$ disuelto en sistemas KGM europeo/XG al 0,5%. Datos utilizados para la elaboración de las figuras 4.5 a 4.7

Tiempo (s)	FLUORESCENCIA				
	1	2	3	4	5
2,5	0,7964	0,8048	0,8089	0,8051	0,8050
5	0,8540	0,8588	0,8591	0,8577	0,8588
7,5	0,8837	0,889	0,8894	0,8852	0,8873
10	0,9021	0,9069	0,9068	0,9052	0,9052
12,5	0,9160	0,9193	0,9193	0,9183	0,9178
15	0,9260	0,9294	0,9278	0,9271	0,9260
17,5	0,9336	0,9370	0,9356	0,9342	0,9339
20	0,9397	0,9421	0,9423	0,942	0,9413
22,5	0,9445	0,9473	0,9447	0,9456	0,9464
25	0,9485	0,9505	0,9500	0,9496	0,9505
27,5	0,9524	0,9555	0,9550	0,9518	0,9527
30	0,9543	0,9581	0,9581	0,9560	0,9548
32,5	0,9566	0,9605	0,9612	0,9587	0,9585
35	0,9595	0,9628	0,9623	0,9619	0,9609
37,5	0,9633	0,9647	0,9648	0,9628	0,9644
40	0,9636	0,9674	0,966	0,9654	0,9654
42,5	0,9670	0,9690	0,9677	0,9667	0,9691
45	0,9678	0,9695	0,9694	0,9673	0,9683
47,5	0,9694	0,9717	0,9711	0,9709	0,9712
50	0,9698	0,9728	0,9710	0,9692	0,9717
52,5	0,9712	0,9742	0,9707	0,9720	0,9741
55	0,9727	0,9734	0,9745	0,9724	0,9740
57,5	0,9730	0,9768	0,9742	0,9740	0,9734
60	0,9740	0,9765	0,9761	0,9756	0,9758
62,5	0,9739	0,9772	0,9751	0,9768	0,9779
65	0,9756	0,9789	0,9766	0,9768	0,9767
67,5	0,9760	0,9788	0,9782	0,9784	0,9772
70	0,9773	0,9795	0,9793	0,9764	0,9792

Tabla A.27.- Recuperación de fluorescencia (normalizada) de dextrano $M_w = 150000$ disuelto en sistemas KGM europeo/XG al 0,5%. Datos utilizados para la elaboración de las figuras 4.5 a 4.7

Tiempo (s)	FLUORESCENCIA				
	1	2	3	4	5
5	0,6518	0,6507	0,6610	0,6620	0,6582
10	0,7235	0,7213	0,7291	0,7315	0,7288
15	0,7693	0,7649	0,7720	0,7728	0,7709
20	0,7985	0,7961	0,8019	0,8028	0,8013
25	0,8209	0,8176	0,8248	0,8248	0,8226
30	0,8381	0,8358	0,8410	0,8422	0,8410
35	0,8529	0,8494	0,8553	0,8558	0,8559
40	0,8648	0,8609	0,8664	0,8669	0,8655
45	0,8735	0,8711	0,8732	0,8762	0,8744
50	0,8811	0,8803	0,8823	0,8842	0,8845
55	0,8873	0,8872	0,8905	0,8903	0,8893
60	0,8940	0,8932	0,8966	0,8961	0,8969
65	0,9007	0,8979	0,9024	0,9025	0,8997
70	0,9062	0,9031	0,9078	0,9075	0,9056
75	0,9104	0,9077	0,9111	0,9119	0,9110
80	0,9141	0,9096	0,9144	0,9154	0,9137
85	0,9159	0,9141	0,9168	0,9183	0,9173
90	0,9196	0,9194	0,9201	0,9219	0,9216
95	0,9227	0,9216	0,9244	0,9254	0,9238
100	0,9255	0,9245	0,9259	0,9269	0,9273
105	0,9279	0,9265	0,9308	0,9298	0,9292
110	0,9306	0,9290	0,9295	0,9314	0,9320
115	0,9346	0,9328	0,9322	0,9358	0,9336
120	0,9352	0,9351	0,9339	0,9380	0,9357
125	0,9383	0,9354	0,9383	0,9388	0,9362
130	0,9389	0,9362	0,9388	0,9412	0,9409
135	0,9416	0,9393	0,9404	0,9419	0,9417
140	0,9422	0,9425	0,9399	0,9436	0,9433

Tabla A.28.- Recuperación de fluorescencia (normalizada) de dextrano $M_w = 500000$ disuelto en sistemas KGM europeo/XG al 0,5%. Datos utilizados para la elaboración de las figuras 4.5 a 4.7

Tiempo (s)	FLUORESCENCIA				
	1	2	3	4	5
30	0,7186	0,7208	0,7238	0,7205	0,7184
60	0,7642	0,7659	0,7677	0,7653	0,7627
90	0,7888	0,7897	0,7911	0,7896	0,7864
120	0,8054	0,8049	0,8068	0,805	0,8032
150	0,816	0,8158	0,8192	0,8164	0,8139
180	0,8251	0,8248	0,8278	0,8267	0,8234
210	0,833	0,8343	0,8361	0,8323	0,8300
240	0,8384	0,8393	0,8409	0,8395	0,8384
270	0,8432	0,8454	0,8470	0,8450	0,8425
300	0,8488	0,8497	0,8508	0,8478	0,8476
330	0,8523	0,8556	0,8550	0,8542	0,8513
360	0,8551	0,8567	0,8592	0,8558	0,8548
390	0,8597	0,8606	0,8619	0,8612	0,8597
420	0,8643	0,8638	0,8644	0,8637	0,8630
450	0,8672	0,8661	0,8674	0,8667	0,8636
480	0,8682	0,8690	0,8694	0,8693	0,8675
510	0,8706	0,8725	0,8728	0,8722	0,8691
540	0,8738	0,8739	0,8729	0,8737	0,8719
570	0,8743	0,8768	0,8772	0,8769	0,8746
600	0,8767	0,8780	0,8795	0,8785	0,8750
630	0,8770	0,8789	0,8798	0,8778	0,8772
660	0,8808	0,8834	0,8824	0,8817	0,8789
690	0,8818	0,8826	0,8836	0,8829	0,8807
720	0,8828	0,8829	0,8850	0,8849	0,8824
750	0,8837	0,8840	0,8874	0,8865	0,8813
780	0,8862	0,8861	0,8867	0,8871	0,8851
810	0,8844	0,8873	0,8876	0,8885	0,8842
840	0,8868	0,8882	0,8893	0,8893	0,8879

Tabla A.29.- Recuperación de fluorescencia (normalizada) de dextrano $M_w = 2000000$ disuelto en sistemas KGM europeo/XG al 0,5%. Datos representados en la figura 4.4

Tiempo (s)	FLUORESCENCIA				
	1	2	3	4	5
2,5	0,8095	0,8115	0,8135	0,8150	0,8107
5	0,8682	0,8699	0,8696	0,8726	0,8703
7,5	0,8988	0,9007	0,9008	0,8996	0,9003
10	0,9175	0,9193	0,9185	0,9214	0,9191
12,5	0,9309	0,9312	0,9303	0,9331	0,9325
15	0,9400	0,9418	0,9412	0,9404	0,9401
17,5	0,9471	0,9486	0,9488	0,9489	0,9471
20	0,9539	0,9537	0,9556	0,9543	0,9534
22,5	0,9586	0,9604	0,9586	0,9587	0,9599
25	0,9606	0,9635	0,9624	0,9618	0,9617
27,5	0,9641	0,9661	0,9652	0,9661	0,9641
30	0,9671	0,9677	0,9688	0,9672	0,9677
32,5	0,9707	0,9710	0,9706	0,9686	0,9707
35	0,9701	0,9726	0,972	0,9718	0,9714
37,5	0,9725	0,9750	0,9747	0,9728	0,9724
40	0,9758	0,9768	0,9765	0,9754	0,9751
42,5	0,9768	0,9779	0,9767	0,9772	0,9768
45	0,9793	0,9778	0,9780	0,9781	0,9783
47,5	0,9800	0,9780	0,9788	0,9786	0,9793
50	0,9808	0,9796	0,9808	0,9809	0,9805
52,5	0,9812	0,9814	0,9826	0,9814	0,9804
55	0,9821	0,9814	0,9828	0,9811	0,9821
57,5	0,9837	0,9831	0,9826	0,9824	0,9818
60	0,9832	0,9845	0,9839	0,9836	0,9831
62,5	0,9831	0,9842	0,9828	0,9845	0,9832
65	0,9832	0,9850	0,9842	0,9837	0,9847
67,5	0,9854	0,9875	0,9852	0,9831	0,9849
70	0,9857	0,9863	0,9848	0,9856	0,9866

Tabla A.30.- Recuperación de fluorescencia (normalizada) de dextrano $M_w = 70000$ disuelto en sistemas KGM americano/XG al 0,5%. Datos utilizados para la elaboración de las figuras 4.5 a 4.7

Tiempo (s)	FLUORESCENCIA				
	1	2	3	4	5
2,5	0,8271	0,8294	0,8291	0,8240	0,8263
5	0,8788	0,8827	0,8818	0,8790	0,8795
7,5	0,9065	0,9094	0,9084	0,9052	0,9067
10	0,9228	0,9246	0,9248	0,9208	0,9250
12,5	0,9347	0,9348	0,9356	0,9344	0,9355
15	0,9427	0,9439	0,9442	0,9424	0,9428
17,5	0,9500	0,9503	0,9508	0,9475	0,9488
20	0,9535	0,9543	0,9548	0,9532	0,9540
22,5	0,9588	0,9601	0,9588	0,9592	0,9595
25	0,9621	0,9621	0,9622	0,9599	0,9632
27,5	0,9637	0,9659	0,9651	0,9648	0,9649
30	0,9672	0,9689	0,9673	0,9681	0,9680
32,5	0,9683	0,9699	0,9713	0,9680	0,9691
35	0,9715	0,9719	0,9715	0,9715	0,9712
37,5	0,9742	0,9731	0,9734	0,9723	0,9732
40	0,9735	0,9764	0,9772	0,9735	0,9736
42,5	0,9744	0,9758	0,9751	0,9756	0,9770
45	0,976	0,9775	0,9783	0,9766	0,9776
47,5	0,9782	0,9781	0,9792	0,9785	0,9784
50	0,9779	0,9785	0,9789	0,9782	0,9801
52,5	0,9816	0,9789	0,9810	0,9786	0,9805
55	0,9792	0,9818	0,9814	0,9828	0,9806
57,5	0,9819	0,9828	0,9835	0,9832	0,9832
60	0,9830	0,9811	0,9818	0,9816	0,9823
62,5	0,9813	0,9836	0,9835	0,9829	0,9843
65	0,9836	0,9839	0,9851	0,9812	0,9838
67,5	0,9849	0,9824	0,9844	0,9841	0,9865
70	0,9853	0,9843	0,9855	0,9848	0,9859

Tabla A.31.- Recuperación de fluorescencia (normalizada) de dextrano $M_w = 150000$ disuelto en sistemas KGM americano/XG al 0,5%. Datos utilizados para la elaboración de las figuras 4.5 a 4.7

Tiempo (s)	FLUORESCENCIA			Tiempo (s)	FLUORESCENCIA	
	1	2	3		4	5
3	0,6298	0,6261	0,6264	4	0,6726	0,6638
6	0,7175	0,7151	0,7165	8	0,7563	0,7552
9	0,7694	0,7683	0,7707	12	0,8033	0,8053
12	0,8055	0,8041	0,8054	16	0,8357	0,8363
15	0,8311	0,8293	0,8318	20	0,8582	0,8581
18	0,8492	0,8472	0,8500	24	0,8743	0,876
21	0,8655	0,8635	0,8645	28	0,8879	0,8896
24	0,8761	0,8764	0,8768	32	0,8979	0,8993
27	0,8858	0,8852	0,8862	36	0,9083	0,9079
30	0,8932	0,8948	0,8965	40	0,9163	0,9160
33	0,9017	0,9014	0,9028	44	0,9214	0,9216
36	0,9076	0,9083	0,9089	48	0,9274	0,9271
39	0,9148	0,9141	0,9132	52	0,9314	0,9328
42	0,9182	0,9181	0,9196	56	0,9355	0,9347
45	0,9236	0,9238	0,9248	60	0,9394	0,9381
48	0,9272	0,9268	0,9268	64	0,9428	0,9417
51	0,9307	0,9302	0,9321	68	0,9454	0,9442
54	0,9332	0,9338	0,9342	72	0,9479	0,9469
57	0,9356	0,9355	0,9369	76	0,9509	0,9499
60	0,9389	0,9375	0,9396	80	0,9510	0,9519
63	0,9404	0,9416	0,9414	84	0,9558	0,9535
66	0,9442	0,9429	0,9447	88	0,9564	0,9555
69	0,9457	0,9448	0,9472	92	0,9588	0,9566
72	0,9474	0,9478	0,9480	96	0,9593	0,9579
75	0,9498	0,9469	0,9502	100	0,9631	0,9609
78	0,9503	0,9505	0,9514	104	0,9633	0,9604
81	0,9527	0,9529	0,9539	108	0,9653	0,9612
84	0,954	0,9528	0,9541	112	0,9653	0,9634

Tabla A.32.- Recuperación de fluorescencia (normalizada) de dextrano $M_w= 500000$ disuelto en sistemas de KGM americano/XG al 0,5%. Datos utilizados para la elaboración de las figuras 4.5 a 4.7

Tiempo (s)	FLUO- RESC.	Tiempo (s)	FLUORESCENCIA				
			1	2	3	4	5
15	0,718	20	0,7565	0,752	0,7596	0,7501	
30	0,7877	40	0,8231	0,8198	0,8227	0,8162	
45	0,8243	60	0,8569	0,8553	0,8590	0,8522	
60	0,8491	80	0,8779	0,8775	0,8797	0,8743	
75	0,8677	100	0,8951	0,8952	0,8964	0,8918	
90	0,8800	120	0,9084	0,9064	0,9075	0,9040	
105	0,8921	140	0,918	0,9149	0,9183	0,9131	
120	0,9009	160	0,9252	0,9268	0,9238	0,9201	
135	0,9095	180	0,9289	0,9308	0,9305	0,9274	
150	0,9159	200	0,9357	0,9337	0,9363	0,9312	
165	0,9186	220	0,9393	0,9388	0,9390	0,9359	
180	0,9249	240	0,9437	0,9420	0,9438	0,9401	
195	0,9303	260	0,9482	0,9466	0,9479	0,9443	
210	0,9333	280	0,9519	0,9513	0,9512	0,9488	
225	0,9359	300	0,9535	0,9526	0,9528	0,9487	
240	0,9392	320	0,9553	0,9552	0,955	0,9526	
255	0,9440	340	0,9578	0,9578	0,9587	0,9547	
270	0,9446	360	0,9609	0,9576	0,9596	0,9552	
285	0,9464	380	0,9620	0,9615	0,9621	0,9585	
300	0,9471	400	0,9635	0,9633	0,9637	0,9591	
315	0,9497	420	0,9634	0,9638	0,9647	0,9624	
330	0,9506	440	0,9674	0,9639	0,9659	0,9642	
345	0,9545	460	0,9663	0,9677	0,9669	0,9643	
360	0,9541	480	0,9688	0,9673	0,9678	0,9650	
375	0,9558	500	0,9702	0,9689	0,9694	0,9674	
390	0,9569	520	0,9713	0,9714	0,9697	0,9666	
405	0,9600	540	0,9700	0,9716	0,9704	0,9677	
420	0,9595	560	0,9734	0,9737	0,9716	0,9701	

Tabla A.33.- Recuperación de fluorescencia (normalizada) de dextrano $M_w= 2000000$ disuelto en sistemas KGM americano/XG al 0,5%. Datos representados en la figura 4.4

KGM Japonés			
Velocidad de cizalla (s ⁻¹)	Viscosidad (Pa·s)	Velocidad de cizalla (s ⁻¹)	Viscosidad (Pa·s)
0,00954	5,864	9,451	1,871
0,01197	5,881	15,8	1,409
0,01506	5,884	28,97	0,9672
0,01901	5,871	60,08	0,5869
0,02395	5,864	152,1	0,2916
0,03019	5,857	428,4	0,1302
0,0381	5,84	1136	0,06164
0,04816	5,818		
0,06089	5,794		
0,0771	5,761		
0,09837	5,686		
0,1248	5,642		
0,1603	5,528		
0,2048	5,449		
0,2628	5,345		
0,3401	5,199		
0,4468	4,983		
0,5899	4,751		
0,7947	4,439		
1,052	4,222		
1,423	3,931		
1,963	3,586		
2,765	3,205		
3,996	2,792		
6,034	2,328		

Tabla A.34.- Viscosidad en función de la velocidad de cizalla de una disolución de KGM japonés al 0,5% a 25°C. Datos representados en figura 5.1

KGM Europeo			
Velocidad de cizalla (s^{-1})	Viscosidad (Pa·s)	Velocidad de cizalla (s^{-1})	Viscosidad (Pa·s)
1,183	0,04702	31,62	0,0441
1,329	0,04689	35,73	0,04378
1,397	0,05009	40,37	0,04348
1,696	0,0462	45,82	0,04298
1,809	0,0487	52,07	0,04243
2,128	0,04638	59,07	0,04196
2,298	0,04828	66,92	0,04155
2,708	0,04593	76,69	0,04068
2,986	0,0467	87,11	0,04018
3,296	0,04749	99,45	0,03948
3,699	0,0475	113,9	0,03867
4,176	0,0472	130,9	0,03776
4,728	0,04674	150	0,03697
5,421	0,04574	172,1	0,03612
5,953	0,04679	197,8	0,03526
6,817	0,04581	230,4	0,03396
7,637	0,04584	265,9	0,03301
8,585	0,04577	310,8	0,03168
9,665	0,04566	362,2	0,03049
10,83	0,04567	422,6	0,0293
12,18	0,04556	495,8	0,02801
13,74	0,04535	584,9	0,02662
15,4	0,04538	691,4	0,02525
17,31	0,04532	815,9	0,02399
19,51	0,04511		
22,1	0,04469		
24,86	0,04456		
28,01	0,04437		

Tabla A.35.- Viscosidad en función de la velocidad de cizalla de una disolución de KGM europeo al 0,5% a 25°C. Datos representados en figura 5.1

KGM Japonés			
Velocidad de cizalla (s ⁻¹)	Viscosidad (Pa·s)	Velocidad de cizalla (s ⁻¹)	Viscosidad (Pa·s)
10,86	0,00546	204,6	0,00513
12,26	0,0054	228,8	0,00515
13,8	0,00542	257,5	0,00513
15,54	0,00537	291	0,00509
17,45	0,00537	324,5	0,00512
19,63	0,00537	364,2	0,00514
22,13	0,00533	411,4	0,00509
24,84	0,00533	460,5	0,0051
27,86	0,00533	516,2	0,00511
31,64	0,00526	575,6	0,00514
35,47	0,00527	647,6	0,00512
39,86	0,00526	725	0,00514
44,78	0,00525	802,7	0,00521
50,59	0,00522		
56,59	0,00523		
63,39	0,00524		
71,27	0,00523		
80,6	0,00519		
90,56	0,00518		
101,5	0,00518		
114,3	0,00517		
128,3	0,00516		
144,1	0,00516		
161,9	0,00515		
181,8	0,00515		

Tabla A.36.- Viscosidad en función de la velocidad de cizalla de una disolución de KGM americano al 0,5% a 25°C. Datos representados en figura 5.1

Fre- cuencia (rad·s ⁻¹)	KGM japonés		KGM europeo	KGM americano	XG	
	G' (Pa)	G'' (Pa)	G'' (Pa)	G'' (Pa)	G' (Pa)	G'' (Pa)
0,100	0,06254	0,6131	0,00505	6,05E-04	0,205	0,409
0,126	0,08566	0,7686	0,00654	7,73E-04	0,256	0,47
0,159	0,1242	0,9566	0,00848	9,98E-04	0,315	0,539
0,200	0,1772	1,154	0,01043	0,00121	0,393	0,608
0,251	0,2495	1,412	0,01318	0,00146	0,477	0,681
0,316	0,3537	1,74	0,01639	0,00188	0,563	0,769
0,398	0,4894	2,113	0,02038	0,00236	0,68	0,862
0,501	0,6806	2,531	0,02719	0,00257	0,784	0,948
0,631	0,9239	3,082	0,03231	0,0031	0,919	1,026
0,794	1,207	3,591	0,04151	0,00324	1,093	1,131
1,000	1,618	4,305	0,05175	0,00743	1,243	1,249
1,259	2,048	4,877	0,06655	0,00694	1,399	1,331
1,585	2,633	5,685	0,0832	0,00895	1,594	1,429
1,996	3,362	6,594	0,1045	0,01176	1,805	1,537
2,513	4,233	7,559	0,1303	0,01475	2,031	1,647
3,160	5,288	8,601	0,1643	0,01788	2,278	1,762
3,981	6,479	9,663	0,205	0,02194	2,525	1,875
5,011	7,844	10,78	0,2582	0,0274	2,781	1,983
6,308	9,382	11,9	0,327	0,03489	3,037	2,087
7,963	11,16	13,1	0,3989	0,04431	3,302	2,195
9,991	13,11	14,3	0,4872	0,05733	3,574	2,314
12,570	15,33	15,58	0,6112	0,07243	3,844	2,443
15,850	17,85	16,97	0,7535	0,09641	4,096	2,593
19,980	20,54	18,33	0,9194	0,1267	4,291	2,754
25,130	23,25	19,54	1,145	0,169	4,415	2,913
31,690	26,13	20,82	1,401	0,2341	4,768	3,018
39,720	28,88	21,89	1,727	0,328	5,24	3,165
50,070	31,95	22,48	2,142	0,4613	5,309	3,411
62,460	35,4	23,1	2,632	0,635	5,39	3,673
77,990	38,52	24,08	3,098	0,8146	7,663	3,923
100,100	41,91	24,94	3,942	1,306	8,587	4,187

Tabla A.37.- Valores de módulo elástico (G') y viscoso (G'') a 37°C de disoluciones al 0,5% de KGM japonés, europeo y americano y XG. Datos representados en figura 5.4

Frecuencia (rad·s ⁻¹)	KGM japonés/XG 3:1		KGM japonés/XG 1:1		KGM japonés/XG 1:3	
	G' (Pa)	G'' (Pa)	G' (Pa)	G'' (Pa)	G' (Pa)	G'' (Pa)
0,100	96,153	4,857	175,275	10,052	75,970	3,868
0,126	99,330	4,813	178,000	9,094	76,343	3,752
0,159	101,810	4,757	181,000	8,586	76,713	3,611
0,200	103,567	4,710	183,450	8,106	77,138	3,566
0,251	105,000	4,735	185,200	8,069	77,513	3,548
0,316	106,300	4,779	186,925	7,655	77,930	3,586
0,398	107,500	4,735	188,225	7,368	78,363	3,582
0,501	108,500	4,702	189,475	7,109	78,788	3,625
0,631	109,367	4,637	190,725	6,916	79,270	3,679
0,794	110,333	4,703	191,775	6,784	79,723	3,776
1,000	111,167	4,692	192,825	6,492	80,225	3,872
1,259	111,900	4,679	193,825	6,354	80,743	3,975
1,585	112,733	4,716	194,825	6,279	81,275	4,101
1,996	113,467	4,759	195,775	6,151	81,815	4,239
2,513	114,233	4,804	196,675	6,077	82,413	4,400
3,160	114,933	4,861	197,575	6,145	82,998	4,554
3,981	115,700	4,942	198,475	6,094	83,630	4,738
5,011	116,500	5,023	199,375	6,065	84,300	4,932
6,308	117,267	5,141	200,225	6,072	84,975	5,143
7,963	118,033	5,252	201,125	6,109	85,690	5,375
9,991	118,800	5,387	202,000	6,136	86,410	5,614
12,570	119,600	5,562	202,825	6,230	87,193	5,882
15,850	120,400	5,736	203,650	6,329	87,988	6,172
19,980	121,333	5,973	204,600	6,457	88,910	6,488
25,130	122,200	6,210	205,475	6,619	89,785	6,824
31,690	123,133	6,495	206,375	6,811	90,758	7,199
39,720	124,000	6,810	207,275	7,035	91,750	7,598
50,070	124,833	7,186	208,200	7,312	92,880	8,057
62,460	125,700	7,619	209,000	7,596	94,050	8,583
77,990	126,367	8,199	209,800	7,873	95,048	9,152
100,100	126,700	8,817	210,400	8,458	96,728	9,839

Tabla A.38.- Valores de módulo elástico (G') y viscoso (G'') a 37°C de sistemas KGM-japonés/XG al 0,5% .Datos representados en figura 5.5A

Fre- cuencia (rad·s ⁻¹)	KGM europeo/XG 3:1		KGM europeo/XG 1:1		KGM europeo/XG 1:3	
	G' (Pa)	G'' (Pa)	G' (Pa)	G'' (Pa)	G' (Pa)	G'' (Pa)
0,100	54,928	2,943	124,850	7,940	24,440	1,799
0,126	57,463	3,054	127,325	7,386	24,635	1,682
0,159	58,863	3,056	129,125	6,995	24,803	1,653
0,200	59,940	3,098	130,450	6,663	24,933	1,623
0,251	60,930	3,097	131,700	6,348	25,075	1,618
0,316	61,765	3,172	132,750	6,137	25,230	1,611
0,398	62,465	3,204	133,725	5,911	25,388	1,620
0,501	63,178	3,243	134,550	5,613	25,553	1,650
0,631	63,780	3,286	135,400	5,434	25,710	1,677
0,794	64,405	3,304	136,150	5,283	25,885	1,730
1,000	65,053	3,357	136,875	5,073	26,065	1,791
1,259	65,623	3,430	137,575	4,978	26,248	1,860
1,585	66,200	3,486	138,175	4,810	26,453	1,946
1,996	66,743	3,539	138,850	4,714	26,665	2,049
2,513	67,333	3,621	139,475	4,584	26,885	2,160
3,160	67,875	3,713	140,100	4,517	27,113	2,310
3,981	68,453	3,802	140,675	4,444	27,380	2,462
5,011	69,028	3,898	141,275	4,404	27,660	2,637
6,308	69,618	4,008	141,825	4,367	27,955	2,831
7,963	70,218	4,126	142,325	4,348	28,273	3,052
9,991	70,818	4,262	142,875	4,351	28,603	3,293
12,570	71,448	4,403	143,425	4,362	28,960	3,566
15,850	72,073	4,567	143,950	4,416	29,355	3,874
19,980	72,763	4,753	144,450	4,482	29,763	4,217
25,130	73,448	4,960	144,975	4,574	30,185	4,597
31,690	74,125	5,193	145,450	4,685	30,620	5,046
39,720	74,805	5,458	145,775	4,810	30,920	5,586
50,070	75,523	5,781	146,100	4,968	31,195	6,010
62,460	76,018	6,231	146,200	5,187	31,598	6,528
77,990	76,400	6,539	145,975	5,497	31,990	7,146
100,100	77,160	7,090	144,850	5,916	32,360	7,775

Tabla A.39.- Valores de módulo elástico (G') y viscoso (G'') a 37°C de sistemas KGM-europeo/XG al 0,5% .Datos representados en figura 5.5B

Frecuencia (rad·s ⁻¹)	KGM americano/XG 3:1		KGM americano/XG 1:1		KGM americano/XG 1:3	
	G' (Pa)	G'' (Pa)	G' (Pa)	G'' (Pa)	G' (Pa)	G'' (Pa)
0,100	0,073	0,206	0,040	0,092	0,039	0,055
0,126	0,096	0,242	0,047	0,111	0,045	0,063
0,159	0,121	0,286	0,058	0,133	0,055	0,072
0,200	0,153	0,332	0,072	0,158	0,062	0,082
0,251	0,195	0,388	0,089	0,184	0,072	0,094
0,316	0,245	0,446	0,108	0,214	0,081	0,107
0,398	0,299	0,508	0,135	0,252	0,092	0,122
0,501	0,369	0,579	0,162	0,288	0,108	0,141
0,631	0,440	0,653	0,194	0,331	0,123	0,162
0,794	0,534	0,734	0,235	0,381	0,140	0,183
1,000	0,630	0,822	0,282	0,435	0,159	0,210
1,259	0,745	0,909	0,335	0,495	0,183	0,238
1,585	0,877	0,999	0,397	0,558	0,209	0,268
1,996	0,999	1,095	0,465	0,623	0,240	0,310
2,513	1,161	1,195	0,537	0,695	0,275	0,350
3,160	1,326	1,302	0,623	0,772	0,309	0,400
3,981	1,492	1,400	0,719	0,865	0,344	0,449
5,011	1,681	1,514	0,815	0,956	0,377	0,508
6,308	1,876	1,635	0,912	1,051	0,405	0,566
7,963	2,083	1,775	1,010	1,144	0,433	0,625
9,991	2,267	1,892	1,092	1,261	0,454	0,691
12,570	2,439	2,041	1,186	1,359	0,485	0,760
15,850	2,596	2,169	1,292	1,466	0,515	0,838
19,980	2,748	2,300	1,383	1,592	0,553	0,931
25,130	2,943	2,431	1,479	1,735	0,607	1,036
31,690	3,047	2,608	1,734	1,879	0,739	1,162
39,720	3,122	2,803	1,847	2,070	0,670	1,319
50,070	3,492	3,009	2,224	2,288	0,485	1,523
62,460	3,456	3,284	1,942	2,586	1,184	1,764
77,990	3,560	3,586	1,583	2,950	0,068	2,121
100,100	3,382	3,925	2,391	3,351	--	2,666

Tabla A.40.- Valores de módulo elástico (G') y viscoso (G'') a 37°C de sistemas KGM-americano/XG al 0,5%. Datos representados en figura 5.5C

Tiempo (min)	CANTIDAD LIBERADA (mg)		
	1	2	3
6	0,0226	0,0353	0,0355
12	0,0501	0,0657	0,0587
18	0,0706	0,0914	0,0857
24	0,0910	0,1165	0,1089
30	0,1146	0,1448	0,1283
36	0,1352	0,1674	0,1461
45	0,1636	0,1962	0,1703
60	0,2004	0,2379	0,2011
90	0,2439	0,3014	0,2316
120	0,2752	0,3504	0,2426

Tabla A.41.- Cantidad de diltiazem difundido a partir de una disolución acuosa de diltiazem al 0,05%. Datos utilizados en la elaboración de la tabla 5.2

Tiempo (min)	CANTIDAD LIBERADA (mg)		
	1	2	3
6	0,0158	0,0131	0,0092
12	0,0242	0,0219	0,0187
18	0,0329	0,0294	0,0264
24	0,0394	0,0355	0,0301
30	0,0465	0,0385	0,0339
36	0,0527	0,0439	0,0403
45	0,0604	0,0511	0,0463
60	0,0753	0,0627	0,0547
90	0,0980	0,0788	0,0715
120	0,1132	0,0946	0,0853
180	0,1496	0,1206	0,1086
240	0,1734	0,1572	0,1266
300	0,2054	0,1685	0,1525
360	0,2236	0,1889	0,1658
420	0,2509	0,2155	0,1868
480	0,2649	0,2291	0,2018

Tabla A.42.- Cantidad de diltiazem difundido a partir de una disolución KGM japonés al 0,5% conteniendo un 0,05% de diltiazem. Datos utilizados en la elaboración de la tabla 5.2

Tiempo (min)	CANTIDAD LIBERADA (mg)		
	1	2	3
6	0,0154	0,0174	0,0136
12	0,0260	0,0241	0,0213
18	0,0342	0,0325	0,0307
24	0,0445	0,0383	0,0392
30	0,0513	0,0450	0,0459
36	0,0608	0,0519	0,0517
45	0,0710	0,0630	0,0616
60	0,0872	0,0776	0,0750
90	0,1205	0,1080	0,1078
120	0,1466	0,1344	0,1387
180	0,1996	0,1925	0,1897
240	0,2271	0,2384	0,2294
300	0,2706	0,2845	0,2651
360	0,3001	0,3229	0,2858
420	0,3128	0,3478	0,2837
480	0,3059	0,3866	0,2817

Tabla A.43 Cantidad de diltiazem difundido a partir de una disolución de KGM europeo al 0,5% conteniendo un 0,05% de diltiazem.. Datos promedio representados en figura 5.7

Tiempo (min)	CANTIDAD LIBERADA (mg)		
	1	2	3
6	0,0227	0,0226	0,0261
12	0,0399	0,0448	0,0383
18	0,0544	0,0551	0,0533
24	0,0605	0,0672	0,0544
30	0,0705	0,0741	0,0725
36	0,0818	0,0846	0,0804
45	0,0907	0,0932	0,0945
60	0,1077	0,1074	0,1070
90	0,1342	0,1380	0,1335
120	0,1610	0,1683	0,1636
180	0,1930	0,2199	0,1903
240	0,2434	0,2731	0,2267
300	-	-	0,2585
360	0,3138	0,3139	0,2969
420	0,3402	0,3378	0,3230
480	0,3671	0,3640	0,3474

Tabla A.44 Cantidad de diltiazem difundido a partir de una disolución KGM americano al 0,5% conteniendo un 0,05% de diltiazem. Datos utilizados en la elaboración de la tabla 5.2

Tiempo (min)	CANTIDAD LIBERADA (mg)		
	1	2	3
6	0,0150	0,0078	0,0072
12	0,0149	0,0124	0,0118
18	0,0188	0,0158	0,0154
24	0,0221	0,0179	0,0187
30	0,0243	0,0201	0,0205
36	0,0273	0,0224	0,0223
45	0,0320	0,0259	0,0274
60	0,0378	0,0330	0,0346
90	0,0494	0,0423	0,0423
120	0,0593	0,0515	0,0535
180	0,0737	0,0656	0,0671
240	0,0888	0,0807	0,0808
300	0,1035	0,0933	0,0956
360	0,1183	0,1060	0,1081
420	0,1331	0,1209	0,1216
480	0,1476	0,1329	0,1339

Tabla A.45.- Cantidad de diltiazem difundido a partir de una disolución de XG al 0,5% conteniendo un 0,05% de diltiazem. Datos utilizados en la elaboración de la tabla 5.2

Tiempo (min)	CANTIDAD LIBERADA (mg)		
	1	2	3
6	0,0109	0,0105	0,0094
12	-	0,0183	0,0129
18	0,0200	0,0201	0,0161
24	0,0238	0,0239	0,0203
30	0,0257	0,0268	0,0261
36	0,0298	0,0301	0,0254
45	0,0332	0,0380	0,0288
60	0,0398	0,0412	0,0370
90	0,0506	0,0563	0,0516
120	0,0614	0,0677	0,0547
180	0,0750	0,0809	0,0735
240	0,0887	0,0954	0,0853
300	0,1014	0,1091	0,0922
360	0,1127	0,1200	0,1059
420	0,1228	0,1328	0,1147
480	0,1312	0,1456	0,1251

Tabla A.46.- Cantidad de diltiazem difundido a partir de sistemas KGM japonés/XG al 0,5% conteniendo un 0,05% de diltiazem. Datos utilizados en la elaboración de la tabla 5.2

Tiempo (min)	CANTIDAD LIBERADA (mg)		
	1	2	3
6	0,0087	0,0081	0,0081
12	0,0113	0,0129	0,0139
18	0,0161	0,0168	0,0176
24	0,0193	0,0213	0,0216
30	0,0225	0,0249	0,0250
36	0,0253	0,0274	0,0288
45	0,0305	0,0345	0,0338
60	0,0376	0,0407	0,0412
90	0,0482	0,0523	0,0515
120	0,0580	0,0642	0,0637
180	0,0782	0,0807	0,0789
240	0,0935	0,0991	0,0923
300	0,1059	0,1096	0,1041
360	0,1163	0,1239	0,1161
420	0,1272	0,1356	0,1269
480	0,1361	0,1449	0,1362

Tabla A.47.- Cantidad de diltiazem cedido a partir de sistemas KGM europeo/XG al 0,5% conteniendo un 0,05% de diltiazem. Datos promedio representados en figura 5.7.

Tiempo (min)	CANTIDAD LIBERADA (mg)		
	1	2	3
6	0,0109	0,0105	0,0094
12	-	0,0183	0,0129
18	0,0200	0,0201	0,0161
24	0,0238	0,0239	0,0203
30	0,0257	0,0268	0,0261
36	0,0298	0,0301	0,0254
45	0,0332	0,0380	0,0288
60	0,0398	0,0412	0,0370
90	0,0506	0,0563	0,0516
120	0,0614	0,0677	0,0547
180	0,0750	0,0809	0,0735
240	0,0887	0,0954	0,0853
300	0,1014	0,1091	0,0922
360	0,1127	0,1200	0,1059
420	0,1228	0,1328	0,1147
480	0,1312	0,1456	0,1251

Tabla A.48.- Cantidad de diltiazem cedido a partir de sistemas KGM americano/XG al 0,5% conteniendo un 0,05% de diltiazem.. Datos utilizados en la elaboración de la tabla 5.2

Tiempo (min)	CANTIDAD LIBERADA (mg)		
	1	2	3
6	0,0172	0,0130	0,0078
12	0,0316	0,0248	0,0194
18	0,0457	0,0333	0,0257
24	0,0586	0,0408	0,0328
30	0,0696	0,0499	0,0433
36	0,0861	0,0572	0,0496
45	0,1024	0,0680	0,0579
60	0,1163	0,0818	0,0700
90	0,1348	0,1070	0,0896
120	0,1480	0,1262	0,1011

Tabla A.49.- Cantidad de teofilina difundida a partir de una disolución acuosa de teofilina al 0,02%. Datos utilizados en la elaboración de la tabla 5.2.

Tiempo (min)	CANTIDAD LIBERADA (mg)		
	1	2	3
6	0,0068	0,0017	0,0068
12	0,0095	0,0052	0,0105
18	0,0125	0,0092	0,0137
24	0,0151	0,0140	0,0170
30	0,0178	0,0170	0,0198
36	0,0197	0,0191	0,0218
45	0,0231	0,0218	0,0250
60	0,0253	0,0258	0,0299
90	0,0348	0,0334	0,0393
120	0,0419	0,0402	0,0476
180	0,0531	0,0516	0,0625
240	0,0631	0,0616	0,0760
300	0,0692	0,0705	0,0860
360	0,0728	0,0772	0,0972
420	0,0757	0,0840	0,1082
480	-	0,0891	0,1169

Tabla A.50.- Cantidad de teofilina cedida a partir de una disolución KGM japonés al 0,5% conteniendo un 0,02% de teofilina. Datos utilizados en la elaboración de la tabla 5.2

Tiempo (min)	CANTIDAD LIBERADA (mg)		
	1	2	3
6	0,0154	0,0100	0,0114
12	0,0210	0,0143	0,0178
18	0,0207	0,0186	0,0234
24	0,0249	0,0225	0,0282
30	0,0283	0,0264	0,0345
36	0,0315	0,0301	0,0382
45	0,0358	0,0364	0,0423
60	0,0430	0,0452	0,0523
90	0,0575	0,0665	0,0706
120	0,0724	0,0802	0,0866
180	0,1000	0,1111	0,1113
240	0,1254	0,1375	0,1308
300	0,1493	0,1610	0,1528
360	0,1711	0,1785	0,1666
420	0,1884	0,1976	0,1813
480	0,2072	0,2131	0,1950

Tabla A.51 Cantidad de teofilina cedida a partir de una disolución de KGM europeo al 0,5% conteniendo un 0,02% de teofilina. Datos utilizados en la elaboración de la tabla 5.2

Tiempo (min)	CANTIDAD LIBERADA (mg)		
	1	2	3
6	0,0141	0,0129	0,0087
12	0,0176	0,0211	0,0179
18	0,0235	0,0262	0,0236
24	0,0269	0,0306	0,0278
30	0,0303	0,0340	0,0317
36	0,0334	0,0371	0,0355
45	0,0378	0,0415	0,0408
60	0,0436	0,0485	0,0482
90	0,0539	0,0592	0,0609
120	0,0644	0,0695	0,0723
180	0,0819	0,0853	0,0932
240	0,0997	0,1009	0,1115
300	0,1164	0,1164	0,1266
360	0,1310	0,1303	0,1411
420	0,1440	0,1426	0,1550
480	0,1565	0,1546	0,1673

Tabla A.52.- Cantidad de teofilina cedida a partir de una disolución de KGM americano al 0,5% conteniendo un 0,02% de teofilina. Datos utilizados en la elaboración de la tabla 5.2

Tiempo (min)	CANTIDAD LIBERADA (mg)		
	1	2	3
6	0,0072	0,0052	0,0025
12	0,0071	0,0078	0,0054
18	0,0102	0,0105	0,0075
24	0,0124	0,0124	0,0110
30	0,0149	0,0144	0,0127
36	0,0168	0,0164	0,0150
45	0,0195	0,0189	0,0167
60	0,0236	0,0225	0,0211
90	0,0302	0,0293	0,0295
120	0,0356	0,0347	0,0361
180	0,0468	0,0460	0,0468
240	0,0562	0,0565	0,0564
300	0,0684	0,0679	0,0665
360	0,0752	0,0761	0,0757
420	0,0819	0,0794	0,0815
480	0,0889	0,0804	0,0826

Tabla A.53.- Cantidad de teofilina cedida a partir de una disolución de Xantano al 0,5% conteniendo un 0,02% de teofilina. Datos utilizados en la elaboración de la tabla 5.2

Tiempo (min)	CANTIDAD LIBERADA (mg)		
	1	2	3
6	0,0045	0,0036	0,0032
12	0,0078	0,0068	0,0062
18	0,0097	0,0090	0,0087
24	0,0119	0,0110	0,0106
30	0,0143	0,0133	0,0125
36	0,0162	0,0156	0,0143
45	0,0191	0,0179	0,0170
60	0,0227	0,0217	0,0208
90	0,0285	0,0280	0,0272
120	0,0350	0,0343	0,0324
180	0,0440	0,0450	-
240	0,0523	0,0541	0,0533
300	0,0621	0,0634	0,0608
360	0,0699	0,0710	0,0674
420	0,0764	0,0769	0,0739
480	0,0819	0,0824	0,0777

Tabla A.54.- Cantidad de teofilina cedida a partir de sistemas KGM japonés/XG al 0,5% conteniendo un 0,02% de teofilina. Datos utilizados en la elaboración de la tabla 5.2

Tiempo (min)	CANTIDAD LIBERADA (mg)		
	1	2	3
6	0,0042	0,0052	0,0022
12	-	0,0083	0,0070
18	0,0113	0,0120	0,0108
24	0,0140	0,0150	0,0137
30	0,0166	0,0170	0,0157
36	0,0186	0,0190	0,0180
45	0,0214	0,0219	0,0205
60	0,0255	0,0256	0,0247
90	0,0326	0,0331	0,0319
120	0,0388	0,0391	0,0378
180	0,0479	0,0501	0,0481
240	0,0582	0,0594	0,0570
300	0,0659	0,0681	0,0655
360	0,0735	0,0763	0,0732
420	0,0817	0,0816	0,0804
480	0,0885	0,0877	0,0848

Tabla A.55.- Cantidad de teofilina cedida a partir de sistemas KGM europeo/XG al 0,5% conteniendo un 0,02% de teofilina. Datos utilizados en la elaboración de la tabla 5.2

Tiempo (min)	CANTIDAD LIBERADA (mg)		
	1	2	3
6	0,0096	0,0079	0,0077
12	0,0129	0,0118	0,0115
18	0,0171	0,0143	0,0148
24	0,0213	0,0169	0,0187
30	0,0253	0,0209	0,0205
36	0,0290	0,0214	0,0229
45	0,0341	0,0260	0,0257
60	0,0412	0,0293	0,0311
90	0,0562	0,0369	0,0385
120	0,0692	0,0454	0,0456
180	0,0914	0,0577	0,0585
240	0,1117	0,0735	0,0729
300	0,1293	0,0817	0,0802
360	0,1429	0,0945	0,0909
420	0,1579	0,1030	0,1005
480	0,1659	0,1092	0,1088

Tabla A.56.- Cantidad de teofilina cedida a partir de sistemas KGM americano/XG al 0,5% conteniendo un 0,02% de teofilina. Datos utilizados en la elaboración de la tabla 5.2

Tiempo (min)	Viscosidad (Pa·s) KGM Japonés			
	Sin enzima	$5.53 \cdot 10^{-4}$ U/mL	$5.53 \cdot 10^{-3}$ U/mL	0.270 U/mL
0	0,7453	0,7453	0,7453	0,7453
5,4	0,7446	0,684	0,172	0,00214
7	0,7414	0,6681	0,1242	0,00199
9	0,7384	0,6496	0,0866	0,00204
11	0,7346	0,6309	0,0638	0,00193
13	0,7297	0,6128	0,0491	0,00171
15	0,7245	0,5947	0,0389	0,00174
25	0,6971	0,5105	0,0172	0,00172
35	0,6698	0,4394	0,0109	0,00159
45	0,6435	0,3794	0,00799	0,00168
55	0,6166	0,3295	0,00619	0,00154
65	0,5913	0,2881	0,00518	0,00161
75	0,5666	0,2524	0,00471	0,00158
85	0,543	0,2222	0,00412	0,00148
95	0,5183	0,1967	0,00364	0,00153
105	0,4971	0,1745	0,00364	0,00158
115	0,4763	0,1562	0,00343	0,00156
125	0,4586	0,1408	0,00296	0,0015
135	0,438	0,127	0,00289	0,00158
145	0,418	0,1145	0,00298	0,00157
155	0,4014	0,1037	0,00269	0,00149
165	0,3836	0,0944	0,00253	0,00156
175	0,3663	0,0863	0,00273	0,00157
185	0,3501	0,0794	0,00257	0,00151
195	0,3331	0,0725	0,00225	0,0015
205	0,3193	0,067	0,00237	0,00159
215	0,3051	0,0618	0,00219	0,00155

Tabla A.57. Evolución en función del tiempo de la viscosidad de una solución de KGM japonés al 0,5% sin enzimas y en presencia de las concentraciones que se indican de β -mannanasa. Datos utilizados para la elaboración de las figura 6.2A

Tiempo (min)	Viscosidad (Pa·s) KGM Americano			
	Sin enzima	$5.53 \cdot 10^{-4}$ U/mL	$5.53 \cdot 10^{-3}$ U/mL	0.270 U/mL
0	0,2547	0,2547	0,2547	0,2547
5,4	0,2157	0,2124	0,1893	0,1312
7	0,1964	0,1948	0,1742	0,1311
9	0,1923	0,1904	0,168	0,1307
11	0,1905	0,1886	0,1644	0,1304
13	0,1894	0,1872	0,1619	0,1263
15	0,1884	0,1859	0,1597	0,1245
25	0,1859	0,1823	0,152	0,1237
35	0,1845	0,1801	0,148	0,1228
45	0,1835	0,178	0,1452	0,1226
55	0,1823	0,176	0,1429	0,1214
65	0,181	0,1745	0,1411	0,1212
75	0,1803	0,1729	0,14	0,1209
85	0,1799	0,1717	0,1387	0,1211
95	0,1791	0,1708	0,1377	0,1211
105	0,1788	0,1698	0,1371	0,1208
115	0,1785	0,1691	0,1364	0,1207
125	0,1781	0,1677	0,1356	0,1208
135	0,1777	0,1668	0,1346	0,1209
145	0,1773	0,1663	0,1342	0,1205
155	0,177	0,1654	0,1339	0,1208
165	0,1767	0,1648	0,1333	0,1208
175	0,1764	0,1645	0,1331	0,1206
185	0,1763	0,1637	0,1327	0,1204
195	0,1759	0,1632	0,1323	0,1206
205	0,1758	0,1626	0,1318	0,1205
215	0,1756	0,1621	0,1318	0,1204

Tabla A.58. Evolución en función del tiempo de la viscosidad del sistema KGM americano/XG al 0,5% sin enzimas y en presencia de las concentraciones que se indican de β -mannanasa. Datos utilizados para la elaboración de las figura 6.2B

Tiempo (min)	G' (Pa) KGM Japonés/XG			
	Sin enzima	$5.53 \cdot 10^{-4}$ U/mL	$5.53 \cdot 10^{-3}$ U/mL	0.270 U/mL
0,05	26,075	14,040	1,071	0,2145
0,06295	26,210	14,105	1,164	0,2329
0,07925	26,340	14,165	1,237	0,2520
0,09976	26,485	14,220	1,313	0,2685
0,1256	26,670	14,285	1,399	0,2913
0,1581	26,865	14,400	1,478	0,3140
0,199	27,055	14,500	1,569	0,3390
0,2506	27,270	14,620	1,658	0,3679
0,3154	27,495	14,755	1,751	0,4007
0,3972	27,725	14,895	1,850	0,4400
0,5	27,955	15,050	1,960	0,4850
0,6295	28,215	15,220	2,077	0,5335
0,7923	28,470	15,385	2,199	0,5872
0,9978	28,730	15,550	2,327	0,6486
1,256	29,020	15,735	2,458	0,7176
1,582	29,325	15,930	2,596	0,7910
1,991	29,670	16,120	2,739	0,8753
2,505	30,005	16,330	2,885	0,9650
3,154	30,360	16,530	3,036	1,0634
3,972	30,740	16,750	3,192	1,1680
4,995	31,150	17,000	3,354	1,2755
6,283	31,595	17,250	3,512	1,3855
7,923	32,075	17,505	3,676	1,4910
9,991	32,590	17,795	3,830	1,5785
12,57	33,115	18,085	3,957	1,6555
15,85	33,705	18,395	4,026	1,7320
19,86	34,305	18,710	4,090	1,8390
25,03	34,975	19,030	4,213	1,9555
31,54	35,625	19,255	4,334	2,0665
39,72	36,225	19,425	4,447	2,1575
50,07	36,640	19,725	4,546	2,1620

Tabla A.59. Valores de G' en función de la frecuencia para el sistema KGM japonés/XG al 0,5% sin enzimas y 210 minutos tras la adición de las concentraciones que se indican de β -mannanasa. Datos utilizados para la elaboración de la figura 6.3A

Tiempo (min)	G'' (Pa) KGM Japonés/XG			
	Sin enzima	5.53·10 ⁻⁴ U/mL	5.53·10 ⁻³ U/mL	0.270 U/mL
0,05	1,825	1,255	0,5579	0,1379
0,06295	1,791	1,232	0,5726	0,1485
0,07925	1,773	1,223	0,6032	0,1648
0,09976	1,767	1,215	0,6304	0,1845
0,1256	1,766	1,216	0,6435	0,2036
0,1581	1,781	1,219	0,6804	0,2265
0,199	1,794	1,226	0,7061	0,2512
0,2506	1,829	1,239	0,7344	0,2791
0,3154	1,861	1,257	0,7652	0,3116
0,3972	1,913	1,283	0,7981	0,3459
0,5	1,979	1,310	0,8321	0,3844
0,6295	2,049	1,345	0,8680	0,4257
0,7923	2,135	1,383	0,9034	0,4699
0,9978	2,233	1,431	0,9404	0,5196
1,256	2,348	1,485	0,9804	0,5704
1,582	2,475	1,547	1,0205	0,6234
1,991	2,627	1,619	1,0630	0,6824
2,505	2,790	1,706	1,1100	0,7423
3,154	2,965	1,802	1,1560	0,8051
3,972	3,172	1,909	1,2065	0,8704
4,995	3,408	2,033	1,2625	0,9386
6,283	3,666	2,176	1,3230	1,0119
7,923	3,961	2,339	1,3915	1,0905
9,991	4,283	2,524	1,4695	1,1670
12,57	4,632	2,737	1,5580	1,2310
15,85	5,023	2,979	1,6475	1,2880
19,86	5,443	3,250	1,7090	1,3475
25,03	5,919	3,577	1,7775	1,4250
31,54	6,444	3,989	1,8800	1,5100
39,72	7,043	4,309	2,0080	1,6150
50,07	7,638	4,720	2,1555	1,7385

Tabla A.60. Valores de G'' en función de la frecuencia para el sistema KGM japonés/XG al 0,5% sin enzimas y 210 minutos tras la adición de las concentraciones que se indican de β -mannanasa. Datos utilizados para la elaboración de la figura 6.3A

Tiempo (min)	tan δ KGM Japonés/XG			
	Sin enzima	$5.53 \cdot 10^{-4}$ U/mL	$5.53 \cdot 10^{-3}$ U/mL	0.270 U/mL
0,05	0,0700	0,0897	0,5224	0,6462
0,06295	0,0684	0,0877	0,4917	0,6426
0,07925	0,0674	0,0868	0,4874	0,6557
0,09976	0,0667	0,0858	0,4799	0,6916
0,1256	0,0663	0,0855	0,4599	0,7033
0,1581	0,0663	0,0851	0,4601	0,7256
0,199	0,0663	0,0850	0,4499	0,7453
0,2506	0,0671	0,0851	0,4428	0,7630
0,3154	0,0677	0,0856	0,4371	0,7817
0,3972	0,0690	0,0864	0,4313	0,7901
0,5	0,0708	0,0873	0,4245	0,7964
0,6295	0,0726	0,0887	0,4178	0,8015
0,7923	0,0750	0,0902	0,4109	0,8038
0,9978	0,0777	0,0923	0,4042	0,8047
1,256	0,0809	0,0946	0,3988	0,7978
1,582	0,0844	0,0974	0,3931	0,7907
1,991	0,0885	0,1007	0,3881	0,7819
2,505	0,0930	0,1047	0,3848	0,7710
3,154	0,0976	0,1092	0,3808	0,7583
3,972	0,1032	0,1142	0,3779	0,7468
4,995	0,1094	0,1198	0,3764	0,7371
6,283	0,1160	0,1263	0,3767	0,7315
7,923	0,1235	0,1337	0,3785	0,7328
9,991	0,1314	0,1419	0,3837	0,7404
12,57	0,1399	0,1514	0,3938	0,7445
15,85	0,1490	0,1620	0,4092	0,7437
19,86	0,1586	0,1738	0,4178	0,7327
25,03	0,1693	0,1881	0,4219	0,7285
31,54	0,1809	0,2073	0,4337	0,7308
39,72	0,1944	0,2220	0,4514	0,7501
50,07	0,2085	0,2396	0,4741	0,8108

Tabla A.61. Valores de tan δ en función de la frecuencia para el sistema KGM japonés/XG al 0,5% sin enzimas y 210 minutos tras la adición de las concentraciones que se indican de β -mannanasa. Datos utilizados para la elaboración de la figura 6.3A

Tiempo (min)	G' (Pa) KGM Americano/XG			
	Sin enzima	$5.53 \cdot 10^{-4}$ U/mL	$5.53 \cdot 10^{-3}$ U/mL	0.270 U/mL
0,05	0,4759	0,2825	0,1129	0,0733
0,06295	0,5076	0,3070	0,1280	0,0841
0,07925	0,5408	0,3371	0,1458	0,0962
0,09976	0,5787	0,3712	0,1656	0,1136
0,1256	0,6192	0,4124	0,1862	0,1290
0,1581	0,6651	0,4569	0,2112	0,1505
0,199	0,7145	0,5037	0,2371	0,1726
0,2506	0,7698	0,5552	0,2709	0,1989
0,3154	0,8312	0,6117	0,3075	0,2283
0,3972	0,8990	0,6721	0,3501	0,2679
0,5	0,9734	0,7393	0,3990	0,3031
0,6295	1,0510	0,8145	0,4518	0,3516
0,7923	1,1410	0,8970	0,5116	0,4058
0,9978	1,2355	0,9857	0,5769	0,4640
1,256	1,3365	1,0820	0,6511	0,5356
1,582	1,4480	1,1885	0,7325	0,6084
1,991	1,5670	1,3020	0,8245	0,6941
2,505	1,6955	1,4245	0,9236	0,7866
3,154	1,8255	1,5365	1,0289	0,8887
3,972	1,9655	1,6720	1,1400	0,9954
4,995	2,1140	1,8120	1,2565	1,1065
6,283	2,2630	1,9555	1,3740	1,2205
7,923	2,4140	2,1005	1,4875	1,3280
9,991	2,5555	2,2320	1,5855	1,4200
12,57	2,6665	2,3380	1,6700	1,5135
15,85	2,7650	2,4435	1,7645	1,6125
19,86	2,8895	2,5780	1,8795	1,7245
25,03	3,0545	2,7395	2,0125	1,8845
31,54	3,2195	2,9000	2,1320	1,9460
39,72	3,3680	3,0465	2,2160	1,9775
50,07	3,5280	3,1140	2,2075	2,0510

Tabla A.62. Valores de G' en función de la frecuencia para el sistema KGM americano/XG al 0,5% sin enzimas y 210 minutos tras la adición de las concentraciones que se indican de β -mannanasa. Datos utilizados para la elaboración de la figura 6.3B

Tiempo (min)	G'' (Pa) KGM Americano/XG			
	Sin enzima	$5.53 \cdot 10^{-4}$ U/mL	$5.53 \cdot 10^{-3}$ U/mL	0.270 U/mL
0,05	0,2656	0,2238	0,1235	0,0984
0,06295	0,2857	0,2452	0,1403	0,1139
0,07925	0,3090	0,2700	0,1582	0,1293
0,09976	0,3345	0,2954	0,1791	0,1491
0,1256	0,3639	0,3221	0,2037	0,1699
0,1581	0,3953	0,3513	0,2289	0,1938
0,199	0,4285	0,3837	0,2568	0,2220
0,2506	0,4657	0,4190	0,2887	0,2516
0,3154	0,5055	0,4580	0,3253	0,2857
0,3972	0,5462	0,4993	0,3648	0,3277
0,5	0,5921	0,5442	0,4074	0,3656
0,6295	0,6394	0,5931	0,4530	0,4123
0,7923	0,6904	0,6442	0,5018	0,4628
0,9978	0,7442	0,6962	0,5537	0,5120
1,256	0,7985	0,7526	0,6095	0,5690
1,582	0,8575	0,8104	0,6695	0,6281
1,991	0,9187	0,8712	0,7310	0,6921
2,505	0,9800	0,9345	0,7957	0,7591
3,154	1,0495	1,0075	0,8636	0,8317
3,972	1,1175	1,0785	0,9346	0,9043
4,995	1,1930	1,1525	1,0088	0,9795
6,283	1,2700	1,2305	1,0865	1,0620
7,923	1,3550	1,3160	1,1690	1,1485
9,991	1,4475	1,4065	1,2510	1,2315
12,57	1,5380	1,4900	1,3225	1,2915
15,85	1,6130	1,5595	1,3860	1,3590
19,86	1,6805	1,6260	1,4510	1,4295
25,03	1,7645	1,7100	1,5290	1,5040
31,54	1,8705	1,8095	1,6220	1,6070
39,72	1,9995	1,9325	1,7310	1,7155
50,07	2,1555	2,0865	1,8640	1,8445

Tabla A.63. Valores de G'' en función de la frecuencia para el sistema KGM americano/XG al 0,5% sin enzimas y 210 minutos tras la adición de las concentraciones que se indican de β -mannanasa. Datos utilizados para la elaboración de la figura 6.3B

Tiempo (min)	tan δ KGM Americano/XG			
	Sin enzima	$5.53 \cdot 10^{-4}$ U/mL	$5.53 \cdot 10^{-3}$ U/mL	0.270 U/mL
0,05	0,5577	0,7961	1,0910	1,3510
0,06295	0,5625	0,8044	1,0915	1,3630
0,07925	0,5710	0,8049	1,0820	1,3535
0,09976	0,5776	0,7985	1,0790	1,3160
0,1256	0,5873	0,7837	1,0920	1,3185
0,1581	0,5941	0,7717	1,0835	1,2900
0,199	0,5995	0,7645	1,0825	1,2890
0,2506	0,6046	0,7571	1,0665	1,2660
0,3154	0,6078	0,7509	1,0585	1,2520
0,3972	0,6073	0,7446	1,0440	1,2255
0,5	0,6081	0,7376	1,0240	1,2075
0,6295	0,6082	0,7295	1,0060	1,1740
0,7923	0,6050	0,7191	0,9848	1,1415
0,9978	0,6023	0,7070	0,9644	1,1045
1,256	0,5973	0,6962	0,9405	1,0625
1,582	0,5920	0,6825	0,9187	1,0330
1,991	0,5862	0,6697	0,8906	0,9972
2,505	0,5780	0,6564	0,8650	0,9651
3,154	0,5748	0,6560	0,8417	0,9363
3,972	0,5690	0,6454	0,8218	0,9089
4,995	0,5644	0,6361	0,8050	0,8851
6,283	0,5614	0,6295	0,7931	0,8707
7,923	0,5615	0,6267	0,7885	0,8652
9,991	0,5667	0,6301	0,7917	0,8677
12,57	0,5776	0,6372	0,7941	0,8536
15,85	0,5844	0,6382	0,7875	0,8432
19,86	0,5829	0,6307	0,7737	0,8292
25,03	0,5799	0,6242	0,7619	0,7985
31,54	0,5846	0,6241	0,7628	0,8267
39,72	0,6000	0,6349	0,7824	0,8714
50,07	0,6258	0,6724	0,8437	0,8993

Tabla A.64. Valores de tan δ en función de la frecuencia para el sistema KGM americano/XG al 0,5% sin enzimas y 210 minutos tras la adición de las concentraciones que se indican de β -mannanasa. Datos utilizados para la elaboración de la figura 6.3B

Tiempo (h)	% HINCHAMIENTO					
	J1	J2	J3	J4	J5	J6
0	0	0	0	0	0	0
0,5	105,96	1201,58	91,83	96,00	84,82	1068,66
1	128,07	1285,55	125,24	121,11	100,75	1163,19
1,5	138,07	1317,58	157,64	148,44	121,71	1192,19
2	158,58	1364,66	213,84	188,42	168,14	1213,05
3	191,71	1391,07	298,96	249,23	220,11	1221,89
6	226,47	1414,84	393,23	318,36	294,56	1230,74
8	245,10	1414,01	491,85	383,15	364,60	1208,18
12	294,84	1429,95	665,93	512,12	498,32	1236,62
24	387,85	1318,34	1039,26	744,61	775,19	1165,40

Tabla A.65.- Porcentaje de hinchamiento de las formulaciones elaboradas con el KGM japonés en SIF a pH 7.5 a 37 °C. Datos representados en la figura 6.4A.

Tiempo (h)	% HINCHAMIENTO					
	A1	A2	A3	A4	A5	A6
0	0	0	0	0	0	0
0,5	0,5	79,62	81,13	85,41	83,81	74,72
1	1	99,41	101,53	116,95	107,37	93,13
1,5	1,5	110,84	121,18	141,05	130,94	115,31
2	2,5	139,16	168,45	197,64	175,23	155,13
3	4	172,01	226,53	271,42	235,63	242,63
6	6	226,89	295,85	361,55	318,92	272,05
8	8	247,19	345,11	443,51	366,65	325,66
12	12	305,94	426,48	589,84	476,62	421,40
24	24	417,39	622,92	1032,18	770,33	694,41

Tabla A.66.- Porcentaje de hinchamiento de las formulaciones elaboradas con el KGM americano en SIF a pH 7.5 a 37 °C. Datos representados en la figura 6.4B.

Tiempo (min)	% DISUELTO					
	1	2	3	4	5	6
10	17,24	14,49	10,87	12,64	11,39	14,50
20	25,09	18,71	14,77	15,40	13,89	24,01
30	28,81	19,55	14,89	17,06	15,00	25,70
45	30,81	22,37	15,67	17,80	17,38	26,63
60	29,69	23,75	17,55	19,28	17,51	28,15
90	31,74	26,16	20,26	21,52	19,20	34,18
120	34,13	30,43	20,70	22,70	21,14	33,07
150	35,27	29,89	21,65	23,82	21,61	34,79
180	36,54	30,75	22,16	24,77	22,27	36,16
240	38,32	32,79	24,22	26,88	24,46	38,98
300	39,16	34,17	25,02	27,35	25,80	40,52
360	40,59	35,53	26,58	28,69	27,04	42,10
420	40,24	37,05	27,28	29,27	28,38	44,00
480	41,94	38,57	28,80	30,84	28,89	45,93
600	42,68	40,95	30,96	33,01	31,70	49,89
720	44,81	43,87	32,69	33,63	32,56	53,12
1440	53,40	64,37	43,85	42,55	42,69	

Tabla A.67.- Porcentaje de dosis de diltiazem disuelto a partir de la formulación F1J en fluido intestinal simulado (SIF) a pH 7.5. Datos promedio representados en la figura 6.5A

Tiempo (min)	% DISUELTO					
	1	2	3	4	5	6
10	9,34	8,94	8,83	8,31	8,28	7,41
20	14,48	20,45	16,03	24,03	16,49	10,60
30	28,38	36,67	27,77	48,37	36,75	17,40
45	45,97	66,62	59,16	64,40	71,69	31,62
60	71,57	81,28	82,57	84,35	88,02	43,73
90	80,71	85,59	90,42	92,65	89,97	60,30
120	83,92	86,71	91,48	93,21	88,58	68,95
150	89,34	83,40	95,98	92,30	88,10	73,50
180	87,41	87,55	92,54	94,10	88,20	79,34
240	90,56	88,50	93,61	99,82	89,21	85,02
300	91,87	90,29	93,40	98,40	91,04	87,05
360	93,32	89,59	94,46	100,07	91,24	89,88
420	93,01	90,84	95,46	97,51	92,03	90,26
480	93,88	92,48	95,10	99,84	91,61	92,61
600	94,06	90,04	95,55	98,22	91,20	90,29
720	92,96	93,23	95,09	97,03	90,43	92,68
1440	99,02	97,74	97,14	102,09	94,86	102,48

Tabla A.68.- Porcentaje de dosis de diltiazem disuelto a partir de la formulación F2J a pH 7.5. Datos promedio representados en la figura 6.5A.

Tiempo (min)	% DISUELTO					
	1	2	3	4	5	6
10	4,12	4,88	3,99	4,51	5,39	6,29
20	6,12	6,69	5,30	6,34	5,37	5,18
30	6,77	6,18	7,37	6,80	5,79	6,10
45	5,87	7,12	7,92	6,88	7,34	7,08
60	7,67	8,00	8,39	9,08	7,84	7,97
90	9,06	7,99	7,95	8,52	8,78	8,03
120	9,37	8,86	9,53	9,27	8,71	8,83
150	9,12	10,01	9,23	10,49	9,40	9,25
180	9,41	10,25	9,48	10,79	10,23	10,21
240	10,78	11,26	10,92	11,59	11,26	11,00
300	11,82	12,57	12,77	13,08	12,34	12,35
360	13,48	13,88	14,02	14,26	13,39	13,56
420	14,65	14,89	14,83	14,89	15,00	15,04
480	16,08	16,60	16,98	16,47	15,91	16,15
600	20,83	20,19	25,75	21,55	19,68	22,13
720	22,71	22,87	24,99	23,13	22,69	23,35
1440	33,65	35,69	36,04	34,26	33,69	35,09

Tabla A.69.- Porcentaje de dosis de diltiazem disuelto a partir de la formulación F3J a pH 7.5. Datos promedio representados en la figura 6.5A.

Tiempo (min)	% DISUELTO					
	1	2	3	4	5	6
10	4,27	4,74	4,32	4,02	4,13	4,45
20	4,65	5,87	5,16	5,68	4,07	4,91
30	5,27	5,95	5,33	6,81	6,32	7,63
45	6,60	7,33	6,48	7,72	6,14	7,20
60	6,70	6,74	6,47	7,67	6,17	6,82
90	7,66	8,15	7,69	7,63	6,39	7,83
120	8,95	8,12	8,08	8,95	7,14	8,76
150	9,58	10,00	9,87	9,99	7,80	-
180	10,06	9,77	10,94	10,88	9,30	11,29
240	11,20	11,86	12,02	11,49	9,73	11,67
300	11,94	13,01	13,55	13,32	12,96	-
360	13,69	14,21	14,29	14,20	11,12	14,60
420	14,53	15,29	15,64	15,70	11,51	15,57
480	15,81	16,40	17,02	16,74	12,84	16,76
600	19,05	18,81	19,53	19,37	14,24	19,40
720	23,45	23,37	27,75	25,11	24,10	28,29
1440	41,55	38,94	38,92	35,81	24,62	37,80

Tabla A.70.- Porcentaje de dosis de diltiazem disuelto a partir de la formulación F4J a pH 7.5. Datos promedio representados en la figura 6.5A.

Tiempo (min)	% DISUELTO					
	1	2	3	4	5	6
10	4,53	5,23	4,89	4,11	4,90	3,81
20	4,96	7,22	5,87	5,35	5,68	6,28
30	5,90	10,57	5,97	7,40	8,85	7,86
45	8,31	12,19	6,66	7,71	8,16	7,95
60	8,13	14,59	7,96	8,93	11,78	9,71
90	9,01	15,81	9,63	9,71	11,49	11,14
120	9,79	16,58	11,21	11,01	12,81	11,41
150	12,03	18,28	10,84	11,65	14,73	12,85
180	12,15	17,97	12,33	13,55	15,82	14,93
240	12,81	18,89	13,20	15,28	17,61	16,78
300	13,95	19,80	14,71	17,55	19,46	17,22
360	15,53	21,26	16,46	19,55	21,41	19,70
420	17,81	22,37	17,42	21,90	23,85	21,80
480	18,03	22,62	18,80	23,67	26,68	24,14
600	20,38	24,62	21,60	27,64	32,62	28,02
720	22,92	27,14	24,89	31,72	39,20	34,26
1440	28,72	29,08	30,23	43,38	57,15	48,63

Tabla A.71.- Porcentaje de dosis de diltiazem disuelto a partir de la formulación F5J a pH 7.5. Datos promedio representados en la figura 6.5A.

Tiempo (min)	% DISUELTO					
	1	2	3	4	5	6
10	10.02	10.55	11.15	11.50	17.73	10.14
20	12.36	13.17	14.39	15.14	31.68	14.88
30	19.22	17.03	46.21	22.20	50.55	23.32
45	62.18	63.72	59.34	35.45	70.53	58.02
60	75.93	92.27	90.94	48.01	84.31	75.38
90	103.20	102.96	100.64	88.77	96.18	92.86
120	103.37	101.51	104.02	97.15	99.50	101.95
180	-	101.54	102.39	101.03	99.64	102.42
240	104.54	101.76	104.20	100.87	99.20	103.01
300	106.96	103.11	105.24	101.35	100.64	102.43
360	105.84	102.42	104.23	101.95	99.88	102.15
420	103.61	104.00	104.37	101.37	101.31	101.83
480	104.56	103.49	104.17	101.69	100.80	103.06
600	103.35	102.71	103.00	100.09	100.79	100.55
720	105.52	103.34	104.59	103.77	103.64	103.53
1440	107.90	107.18	106.61	104.77	106.59	106.29

Tabla A.72.- Porcentaje de dosis de diltiazem disuelto a partir de la formulación F6J a pH 7.5. Datos promedio representados en la figura 6.5A.

Tiempo (min)	% DISUELTO					
	1	2	3	4	5	6
10	6,18	5,89	6,10	7,17	6,73	5,94
20	8,01	8,96	7,06	8,11	7,79	7,87
30	8,23	9,64	8,15	8,82	8,24	9,20
45	10,04	10,09	8,52	10,54	9,53	10,75
60	11,12	11,59	10,64	11,67	10,95	11,13
90	12,29	13,02	12,15	13,16	12,81	13,06
120	13,11	14,36	12,48	14,27	13,42	13,87
150	13,66	14,82	13,17	14,90	13,98	14,68
180	14,14	15,61	14,13	15,77	15,03	15,14
240	15,38	16,87	14,77	16,94	16,62	17,06
300	17,21	18,17	15,68	18,24	18,05	18,22
360	18,21	19,59	17,12	19,48	19,75	19,62
420	20,10	21,09	17,90	20,50	21,07	20,97
480	21,57	22,67	19,06	21,76	22,14	22,39
600	23,75	24,77	21,25	24,45	25,11	24,96
720	26,59	28,06	24,94	27,98	28,15	28,36
1440	39,99	47,71	35,04	55,00	41,38	40,88

Tabla A.73.- Porcentaje de dosis de diltiazem disuelto a partir de la formulación F7J a pH 7.5. Datos promedio representados en la figura 6.5A.

Tiempo (min)	% DISUELTO		
	1	2	3
10	5,00	5,87	5,25
20	6,73	6,83	6,51
30	7,89	7,85	7,56
45	10,01	8,42	9,05
60	10,23	8,75	9,76
90	12,50	10,08	11,85
120	14,34	10,99	12,76
150	15,80	12,16	14,67
180	16,85	12,53	15,60
240	19,22	14,51	17,98
300	21,06	16,14	19,61
360	23,08	17,38	21,40
420	25,07	18,44	23,31
480	27,98	19,65	25,37
600	31,85	22,28	29,07
720	36,68	24,94	32,33
1440	64,86	39,35	51,74

Tabla A.74.- Porcentaje de dosis de diltiazem disuelto a partir de la formulación F7J a pH 7.5 con $5,53 \cdot 10^{-4}$ U/mL de β -mannanasa. Datos promedio representados en la figura 6.7A.

Tiempo (min)	% DISUELTO		
	1	2	3
10	5,54	5,51	5,62
20	7,46	7,55	7,48
30	8,68	8,22	8,38
45	10,44	9,66	9,88
60	10,97	11,10	10,84
90	13,36	13,89	12,91
120	15,02	15,36	14,26
150	16,21	16,28	15,32
180	17,62	18,51	16,82
240	20,35	20,59	19,78
300	23,04	24,02	22,36
360	25,96	28,05	24,90
420	28,80	30,11	28,08
480	32,36	33,15	31,28
600	40,24	38,67	36,38
720	47,44	50,98	43,14
1440	77,60	79,98	75,07

Tabla A.75.- Porcentaje de dosis de diltiazem disuelto a partir de la formulación F7J a pH 7.5 con $5,53 \cdot 10^{-3}$ U/mL de β -mannanasa. Datos promedio representados en la figura 6.7A.

Tiempo (min)	% DISUELTO
	1
10	5,09
20	6,71
30	7,86
45	10,36
60	11,38
90	13,93
120	15,50
150	17,64
180	19,45
240	24,44
300	28,69
360	33,17
420	38,49
480	43,82
600	53,25
720	65,42
1440	91,44

Tabla A.76.- Porcentaje de dosis de diltiazem disuelto a partir de la formulación F7J a pH 7.5. con 0.166 U/mL de β -mannanasa. Datos representados en la figura 6.7A.

Tiempo (min)	% DISUELTO					
	1	2	3	4	5	6
10	49,78	45,39	23,15	44,81	30,16	44,61
20	72,16	71,53	38,56	73,13	47,92	67,11
30	76,79	90,26	45,89	88,82	63,93	89,74
45	81,74	100,29	47,30	100,45	70,79	100,32
60	84,79	99,99	48,97	100,59	76,52	99,67
90	84,19	99,04	51,77	101,78	81,12	99,71
120	85,89	99,11	55,87	102,31	82,67	101,12
150	90,85	105,56	65,88	113,40	88,63	101,69
180	93,94	99,82	65,21	104,29	93,38	101,15
240	103,99	102,63	74,91	103,91	94,65	103,92
300	102,05	103,35	78,66	104,99	98,88	106,85
360	102,31	103,25	81,20	105,21	96,06	103,67
420	105,34	103,38	86,10	102,75	95,66	101,75
480	103,12	101,95	85,30	102,46	95,60	103,35
600	103,90	101,47	91,42	104,86	97,27	103,35
720	104,20	101,88	95,74	105,86	99,42	104,79
1440	109,82	103,57	93,31	104,74	96,99	104,01

Tabla A.77.- Porcentaje de dosis de diltiazem disuelto a partir de la formulación F1C en SIF a pH 7.5. . Datos promedio representados en la figura 6.5B.

Tiempo (min)	% DISUELTO					
	1	2	3	4	5	6
10	7,20	5,79	5,87	6,29	6,50	5,79
20	8,34	8,36	8,02	10,52	7,84	7,79
30	9,09	9,34	9,91	11,60	9,61	9,74
45	10,25	9,82	10,85	-	11,00	11,53
60	12,51	13,56	13,14	14,22	12,88	13,07
90	13,02	13,44	13,81	16,00	13,52	13,95
120	14,73	14,06	15,40	17,70	15,25	16,13
150	16,88	15,80	17,30	19,04	16,47	17,93
180	17,84	17,07	18,55	21,13	19,54	19,56
240	20,17	18,95	21,43	22,89	22,29	24,39
300	23,45	21,47	23,14	26,12	22,97	26,51
360	28,87	23,84	26,33	30,19	26,29	28,64
420	27,51	27,16	27,14	31,99	29,02	31,32
480	28,61	26,76	29,01	31,88	28,79	31,78
600	29,76	28,28	30,66	37,37	31,99	35,31
720	31,55	30,16	32,55	39,42	34,44	36,76
1440	50,57	50,12	53,71	58,67	55,89	58,13

Tabla A.78.- Porcentaje de dosis de diltiazem disuelto a partir de la formulación F2C en SIF a pH 7.5. Datos promedio representados en la figura 6.5B.

Tiempo (min)	% DISUELTO					
	1	2	3	4	5	6
10	4,12	4,34	3,85	4,53	4,03	3,96
20	5,37	5,12	5,18	5,16	4,91	5,15
30	5,74	5,80	5,73	5,90	6,07	6,51
45	6,51	6,72	5,99	6,40	6,25	6,06
60	6,95	6,90	6,55	6,86	6,80	6,30
90	8,03	7,85	7,66	8,02	7,79	7,46
120	8,84	9,11	7,99	8,61	8,52	7,92
150	9,69	9,12	9,17	9,44	9,17	9,27
180	10,16	9,27	9,39	9,61	9,36	9,27
240	12,01	11,21	11,18	11,63	11,27	11,49
300	12,78	12,30	11,81	12,47	12,40	12,28
360	14,49	13,42	13,30	14,35	13,79	13,18
420	15,82	15,21	14,24	15,69	15,04	14,89
480	17,43	16,63	15,69	17,26	16,72	16,45
600	20,56	19,92	-	20,80	19,70	19,76
720	24,84	22,80	21,89	23,98	22,62	22,83
1440	41,50	38,82	37,04	41,58	39,08	40,08

Tabla A.79.- Porcentaje de dosis de diltiazem disuelto a partir de la formulación F3C en SIF a pH 7.5. Datos promedio representados en la figura 6.5B.

Tiempo (min)	% DISUELTO					
	1	2	3	4	5	6
10	4,01	5,45	5,10	3,98	4,43	4,54
20	5,43	5,86	5,77	5,17	5,28	5,70
30	6,44	6,58	6,80	6,29	6,10	6,51
45	7,24	7,16	7,73	6,55	7,12	6,96
60	7,59	7,68	8,04	7,37	7,59	7,82
90	8,77	8,34	8,77	8,49	8,38	8,36
120	8,92	9,07	9,67	8,70	9,07	9,01
150	9,62	9,37	10,13	9,57	9,24	9,37
180	10,28	10,31	10,74	10,12	10,12	10,21
240	11,18	11,19	11,80	11,36	11,21	10,93
300	13,32	12,75	13,72	13,15	13,26	12,54
360	14,28	13,76	14,84	13,98	14,40	13,92
420	15,67	15,30	16,70	15,58	15,62	15,11
480	17,13	17,12	18,30	16,94	17,33	16,91
600	-	20,45	21,35	19,87	20,59	19,88
720	23,32	23,22	25,16	23,12	23,58	22,65
1440	42,33	42,94	46,74	41,89	44,30	41,99

Tabla A.80.- Porcentaje de dosis de diltiazem disuelto a partir de la formulación F4C en SIF a pH 7.5. Datos promedio representados en la figura 6.5B.

Tiempo (min)	% DISUELTO					
	1	2	3	4	5	6
10	4,20	4,71	4,28	3,68	3,90	4,27
20	5,69	5,58	5,18	5,04	4,80	5,41
30	6,79	6,11	6,13	5,86	5,41	5,90
45	8,20	7,36	6,79	6,79	6,70	6,59
60	9,99	8,67	7,56	7,12	7,22	7,69
90	11,20	11,73	9,27	8,80	9,08	9,02
120	12,34	13,06	10,41	9,79	10,10	9,79
150	13,20	14,35	11,22	10,11	10,64	11,16
180	14,33	15,73	12,42	11,23	11,40	11,36
240	15,97	18,94	13,80	12,89	13,31	13,07
300	17,97	22,33	15,86	15,42	14,70	15,00
360	19,88	26,17	18,15	16,53	16,43	16,50
420	21,44	29,56	19,29	18,07	17,88	18,58
480	24,10	32,89	21,40	20,09	19,35	19,83
600	27,48	39,66	25,54	23,85	22,84	23,30
720	30,11	45,22	28,54	27,16	26,02	26,32
1440	53,90	82,45	53,83	52,17	48,99	49,37

Tabla A.81.- Porcentaje de dosis de diltiazem disuelto a partir de la formulación F5C en SIF a pH 7.5. Datos promedio representados en la figura 6.5B.

Tiempo (min)	% DISUELTO					
	1	2	3	4	5	6
10	8,92	6,49	6,69	8,57	7,39	7,18
20	7,57	7,05	8,54	8,40	7,00	7,45
30	8,61	8,61	9,44	9,50	8,15	8,94
45	10,27	9,96	10,86	12,00	9,40	10,30
60	12,14	11,65	12,40	13,72	10,61	11,59
90	14,47	14,53	14,40	16,17	12,68	13,98
120	15,54	16,48	17,23	18,13	14,45	16,58
150	17,29	19,32	19,50	19,91	16,39	18,74
180	19,30	22,67	22,75	22,17	17,98	21,13
240	21,36	25,94	25,25	23,89	20,47	23,45
300	22,56	28,61	28,13	25,92	23,07	26,43
360	24,94	31,58	30,87	29,17	24,27	28,45
420	26,87	34,96	32,89	30,28	26,20	30,68
480	28,72	39,76	36,91	33,58	28,60	33,37
600	32,06	49,10	41,33	37,28	31,74	36,76
720	35,69	57,76	53,71	41,49	35,52	42,18
1440	55,79	92,82	94,70	68,70	55,83	75,11

Tabla A.82.- Porcentaje de dosis de diltiazem disuelto a partir de la formulación F6C en SIF a pH 7.5. Datos promedio representados en la figura 6.5B.

Tiempo (min)	% DISUELTO					
	1	2	3	4	5	6
10	4,08	3,59	3,57	3,68	3,76	4,27
20	5,43	4,76	4,76	4,81	5,01	5,41
30	6,01	6,30	6,04	5,72	5,86	6,77
45	7,32	6,69	6,71	7,19	7,88	7,82
60	8,53	7,85	8,09	8,01	8,10	8,98
90	9,25	9,11	9,14	9,43	9,31	10,54
120	10,69	10,09	9,94	10,45	10,50	11,88
150	11,50	11,27	11,23	11,32	11,46	13,33
180	12,57	12,46	12,26	12,29	12,46	14,42
240	14,40	14,41	13,91	14,36	14,73	16,66
300	16,10	16,52	15,97	16,08	16,27	19,21
360	17,82	17,62	17,75	17,77	18,08	21,36
420	19,59	20,14	19,69	19,61	19,91	23,64
480	21,48	22,17	21,88	21,40	21,77	26,20
600	25,17	25,60	25,67	25,43	25,40	30,88
720	28,85	29,61	30,23	29,41	29,32	35,60
1440	52,03	54,19	54,15	53,18	53,66	71,32

Tabla A.83.- Porcentaje de dosis de diltiazem disuelto a partir de la formulación F7C en SIF a pH 7.5. Datos promedio representados en la figura 6.5B.

Tiempo (min)	% DISUELTO		
	1	2	3
10	4,11	4,68	4,79
20	5,57	5,98	5,57
30	7,22	7,02	6,94
45	8,17	8,42	7,93
60	8,70	8,99	9,39
90	11,22	11,48	11,36
120	11,65	12,56	12,23
150	12,85	14,27	14,09
180	13,83	15,99	15,37
240	15,79	18,68	17,63
300	18,07	20,91	19,63
360	19,98	22,88	21,51
420	21,83	24,93	23,38
480	23,98	27,06	25,78
600	28,11	31,45	29,40
720	31,94	35,63	33,86
1440	56,04	60,97	59,10

Tabla A.84.- Porcentaje de dosis de diltiazem disuelto a partir de la formulación F7C a pH 7.5 con $5,53 \cdot 10^{-4}$ U/mL de β -mannanasa. Datos promedio representados en la figura 6.7B.

Tiempo (min)	% DISUELTO		
	1	2	3
10	4,80	5,38	5,99
20	6,51	5,91	6,84
30	7,00	7,19	7,59
45	8,60	8,26	9,29
60	9,55	9,20	10,07
90	12,08	11,23	12,66
120	14,43	12,45	14,40
150	15,86	13,32	15,71
180	16,62	14,87	17,37
240	20,00	16,63	19,94
300	23,32	19,58	22,56
360	24,91	21,56	24,90
420	27,14	24,37	27,44
480	29,23	26,49	30,33
600	33,49	30,64	34,18
720	38,16	36,17	40,47
1440	66,03	64,57	69,16

Tabla A.85.- Porcentaje de dosis de diltiazem disuelto a partir de la formulación F7J a pH 7.5 con $5,53 \cdot 10^{-3}$ U/mL de β -mannanasa. Datos promedio representados en la figura 6.7B.

Tiempo (min)	% DISUELTO
	1
10	4,40
20	5,68
30	6,65
45	7,72
60	8,91
90	10,96
120	11,91
150	13,09
180	14,28
240	15,89
300	18,39
360	21,16
420	22,68
480	24,49
600	29,43
720	35,67
1440	58,11

Tabla A.86.- Porcentaje de dosis de diltiazem disuelto a partir de la formulación F7J a pH 7.5 con 0.166 U/mL de β -mannanasa. Datos representados en la figura 6.7B.

