

## Nano-emulsification of triglyceride oils for parenteral use by mean of a low-energy emulsification method

Johnny Bullón<sup>1\*</sup>, Juraima Molina<sup>1</sup>, Ronald Márquez<sup>1</sup>, Francia Véjar<sup>1</sup>, César Scorzza<sup>1</sup> y Ana Forgiarini<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Formulación, Interfases, Reología y Procesos (FIRP).

<sup>2</sup>Laboratorio de Polímeros y Coloides (POLYCOL).

Escuela de Ingeniería Química, Universidad de Los Andes. Mérida 5101, Venezuela.  
Teléfono: (58)274-2402954. Fax: (58)274-2402957. \*jbullon@ula.ve

### Abstract

The present report deals with the attainment of O/W nano-emulsions for parenteral use with a nonionic surfactant/triglyceride oil/water system. The systems were formulated at different HLB values (hydrophilic-lipophilic balance) for different Span/Tween nonionic surfactant mixtures. Emulsification was carried out by dilution, i.e., by a water addition to an oil/surfactant mixtures continuously stirred. The variations in the water/oil ratio produce different phase depending on the HLB of the system. The nano-emulsion droplet size is related to the nonionic surfactant mixture HLB. Therefore, the results highlight the particular importance of lamellar phases in the emulsification processes.

**Key words:** Nano-emulsions, parenteral emulsions, HLB, triglyceride oils.

## Nano-emulsión de aceites triglicéridos para uso parenteral mediante un método de baja energía

### Resumen

El presente estudio reporta la obtención de nano-emulsiones del tipo aceite-en-agua (O/W) para uso parenteral en sistemas formados por surfactantes no-iónicos/aceite triglicérido/agua. Los sistemas fueron formulados a diferentes HLB (balance hidrofílico-lipofílico del surfactante) para diferentes mezclas de surfactantes no-iónicos. El proceso de emulsión se llevó a cabo mediante dilución con agua de una mezcla de surfactante no-iónico/aceite triglicérido manteniendo agitado el sistema. La variación de la relación agua/aceite en el sistema originó la formación de diferentes fases dependiendo del HLB de la mezcla inicial de surfactantes. Se encontró que el tamaño de gota de las nano-emulsiones está relacionado con el HLB de la mezcla de surfactantes. Asimismo, los resultados obtenidos reflejan la importancia de la formación de una fase de cristal líquido lamelar durante el proceso de emulsión.

**Palabras clave:** Nano-emulsiones, emulsiones parenterales, HLB, aceites triglicéridos.

### Introducción

Las emulsiones son sistemas formados por dos líquidos inmiscibles uno de los cuales se encuentra disperso en forma de gotas en el otro que forma la fase continua [1]. Debido a que las emulsiones son sistemas fuera de equilibrio, se necesita

suministrar energía para producirlas. Los métodos de emulsión pueden clasificarse en dos grandes grupos, los métodos de alta energía (llamados también de dispersión o fuerza bruta) y los de baja energía (de condensación o fisicoquímicos).

Las emulsiones parenterales consisten en mezclas de triglicéridos dispersadas en una fase

acuosa [2]. Son utilizadas como fuentes de calorías y ácidos grasos esenciales para pacientes o neonatos quienes no son capaces de consumir o absorber alimentos oralmente. Estas deben poseer un tamaño de gota menor al diámetro de los capilares sanguíneos (4-6  $\mu\text{m}$ ), e incluso menores a 1  $\mu\text{m}$ , por consiguiente, es necesario estudiar el diámetro promedio de gota y la distribución de tamaños, siendo un parámetro importante el diámetro acumulativo para una proporción del 90% del volumen de la emulsión (D90) [2].

Wretlind [3] en 1961 logra desarrollar una emulsión para administración intravenosa utilizando aceite de soya como fase interna, lecitina de huevo como emulsionante y glicerol dispersados en una fase acuosa, que luego fue llevada a escala comercial. Estos sistemas son emulsionados utilizando aparatos de alto cizallamiento como homogeneizadores y microfluidizadores, los cuales requieren un gasto de energía significativo para generar emulsiones de tamaño pequeño.

En vista de los altos costos que representa la etapa de homogeneización en la formación de emulsiones parenterales, se han tratado de encontrar métodos que permitan obtener una emulsión para administración intravenosa que cumpla con los requerimientos farmacopeicos y además que posea tamaño de gota menores a 5  $\mu\text{m}$ , sin utilizar aparatos de alta energía. Brouillet [4] en 2002 desarrolla un procedimiento para obtener emulsiones parenterales que utiliza un método denominado "emulsión por concentración" para producir la emulsión, seguido de una etapa de microfiltración para eliminar las gotas que superen el límite requerido de tamaño. Para ello se utilizó el saber hacer en emulsiones de alto contenido de fase interna [5-7], obteniéndose emulsiones con tamaño de gota de aproximadamente de 1  $\mu\text{m}$ , valiéndose del alto cizallamiento que se produce con una agitación moderada cuando el contenido de fase interna de una emulsión es alto. Los estudios en este campo fueron llevados a una siguiente etapa con los trabajos realizados por Cuellar y colaboradores [8], quienes analizaron el efecto de las variables de formulación, composición y agitación en el método de emulsión por concentración [7]. Se consiguieron obtener emulsiones parenterales con un contenido de fase interna de 30%, con ta-

maño de gota promedio de 0,88  $\mu\text{m}$  y acumulativo del 90% de las gotas de 1,6  $\mu\text{m}$ . Una conclusión significativa encontrada en este trabajo fue la poca influencia de la intensidad de agitación sobre las propiedades finales del sistema, debido a que el cizallamiento que origina el aumento de área interfacial se produce por el efecto del grado de empaquetamiento de las gotas y de las interacciones que se generan cuando existe movimiento en el sistema, y no por el esfuerzo cortante producido por el aparato de agitación. Estos resultados, junto a los estudios sobre obtención de nano-emulsiones por métodos de baja energía [9-10], dirigieron las investigaciones de fabricación de emulsiones parenterales hacia el campo de los métodos de inversión de fases.

Los métodos de baja energía son aquellos en los cuales la energía requerida para producir la emulsión proviene de las transiciones o cambios de fases que se producen durante la formación de las mismas [11]. El método de temperatura de inversión de fases, método PIT [12], ampliamente usado en la industria, se basa en formar la emulsión utilizando un cambio brusco de temperatura. Sin embargo, su uso está limitado a sistemas formulados con surfactantes no iónicos del tipo etoxilado los cuales cambian su balance hidrofílico-lipofílico con la temperatura: a temperaturas inferiores a la temperatura de inversión de fases se forman emulsiones aceite-en-agua mientras que a temperaturas superiores a la misma forman emulsiones agua-en-aceite. Usando el concepto de diferencia de afinidad del surfactante [13] (SAD por sus siglas en inglés) se pueden manipular otras variables durante el proceso de emulsión tales como concentración de sal, alcohol, pH etc. y producir las transiciones de fases que hacen posible la formación de emulsiones de tamaño submicrométrico (o nano-emulsiones) [10]. Además, debido a que la mayoría de los sistemas formulados para producir emulsiones son sistemas multicomponentes, es posible modificar la composición interfacial durante el proceso de emulsión mediante un cambio de las proporciones agua/aceite debido al fenómeno de partición de las especies de surfactante en el sistema [14]. Este es el principio del método de emulsión inicialmente denominado punto de inversión de la emulsión (EIP) descrito por Marszall [15], usado por Lin [16] y mejorado por Sagitani [17], quien luego le dió el nom-

bre de emulsión por inversión de fases. En el caso de la obtención de nano-emulsiones del tipo aceite-en-agua (O/W), el método consiste en agregar agua a una dispersión formada por aceite y surfactante hasta lograr la formación de la emulsión final. Incrementándose el contenido de agua en el sistema inicial se producen las transiciones o inversión de fases necesarias para formar una emulsión con tamaño submicrométrico donde las gotas de aceite están dispersadas en una fase externa acuosa. Se ha discutido la importancia de la presencia de fases de microemulsión y/o cristales líquidos lamelares para la formación de nano-emulsiones a través de métodos de transición de fases [9-10, 18-19].

La mayoría de los sistemas utilizados para el estudio de nano-emulsiones del tipo O/W contienen hidrocarburos como fase dispersa, encontrándose escasa información sobre la utilización de métodos de baja energía para la obtención de emulsiones finas conteniendo aceites triglicéridos. En particular, no ha sido reportado el uso del método de emulsión por inversión de fase de Sagitani, para obtención de nano-emulsiones en el sistema surfactante no iónico/aceite triglicérido/glicerol/agua. El objetivo principal del presente estudio es utilizar el método de inversión de fase para la formación de nano-emulsiones con aceites triglicéridos para uso parenteral.

## Metodología Experimental

### Materiales

Los surfactantes utilizados fueron del tipo no iónico derivados del sorbitol. En la Tabla 1 se muestran los surfactantes y sus principales características. El surfactante más hidrofílico fue del tipo etoxilado con un promedio de 20 unidades etoxiladas (EON = 20). Se utilizó parafina líquida, proveída por Científica Andina S.A., como referencia para determinar la formulación óptima de la mezcla de surfactantes en el equilibrio.

La fase acuosa usada fue una solución acuosa de glicerol al 2,5% v/v (CER Diagnósticos, Venezuela) con una concentración de 0,06% p/v de cloruro de sodio y la fase orgánica fue aceite triglicérido de soya marca Branca, Venezuela ( $\rho_{25^\circ\text{C}} = 0,92 \text{ g/cm}^3$ ;  $\mu_{25^\circ\text{C}} = 58 \text{ mPa/s}$ ) con EACN = 18 (número equivalente del alcano) [20]. En la Tabla 2 se resume la composición del aceite de soya.

El triglicérido mayoritario en el aceite de soya es el linoleico (C 18:2), seguido del oleico (C 18:1). Los ácidos grasos palmítico y linolénico tienden a estar situados preferentemente en las posiciones 1 y 3, con el linoleico en la posición 2 y el oleico distribuido aproximadamente por igual entre las tres posiciones.

Tabla 1  
Surfactantes utilizados

Surfactante	Nombre comercial*	HLB	Peso molecular
Monooleato de sorbitan polietoxilado	Tween 80	15	1310
Monolaurato de sorbitan	Span 20	8,6	346
Monostearato de sorbitan	Span 60	4,7	430
Monooleato de sorbitan	Span 80	4,3	428

\* de Uniqema/ICI.

Tabla 2  
Composición en ácidos grasos del aceite de soja [21]

Ácidos grasos saturados			Ácidos grasos monoinsaturados	Ácidos grasos poliinsaturados		
C 14:0	C 16:0	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 18:3	otros
0,10-0,15	10,0-10,5	3,5-4,5	21,5-23,5	49,0-54,0	7,0-7,5	0,4-1,4

## Preparación de las emulsiones

El proceso de emulsión se realizó de la siguiente manera. La mezcla de surfactantes fue disuelta en aceite de soya. Luego la fase acuosa fue añadida a la dispersión surfactante-aceite con un caudal constante de 0,5 mL/min, manteniéndose una velocidad de agitación constante (250 rpm) y una temperatura de 60°C. El mezclador usado fue un agitador Ika®, modelo Eurostar. Se estudiaron emulsiones para varias relaciones S/O entre 0,4 y 2; donde S y O son las masas de surfactante y de aceite de soya, respectivamente. La concentración final de surfactante en todas las emulsiones se mantuvo constante en 8% en peso. La concentración final de la fase oleosa (aceite triglicérido) se varió entre 5 y 16% en peso.

La influencia del balance hidrofílico/lipofílico, HLB, de la mezcla de surfactantes se estudió mediante la variación de las cantidades de los surfactantes no iónicos Tween 80/Span (20, 60 u 80) en la mezcla, el cual fue calculado por [1]:

$$HLB_{mezcla} = HLB_A X_A + HLB_B X_B \quad (1)$$

donde  $X_A$  y  $X_B$  son las fracciones en peso de los surfactantes presentes en la mezcla. El HLB en la formulación óptima de la mezcla de surfactantes, que corresponde a  $HLD=0$ , se determinó a través de un barrido de HLB utilizando como referencia aceite de parafina [20]. Las fases de cristales líquidos fueron detectadas mediante su observación a través de luz polarizada [9, 18] y microscopía óptica por medio de un microscopio Nikon E 600.

## Tamaño de gota

El tamaño de gota promedio de las emulsiones fue obtenido por medio de la técnica de difracción de luz láser usando el equipo Coulter® LS 230 Particle Size Analyzer. El rango de medida del equipo es 0,04-2000  $\mu\text{m}$ . Las muestras fueron diluidas en agua doblemente destilada a la concentración apropiada para garantizar la obtención de la distribución de tamaño.

## Resultados y Discusión de Resultados

### Influencia del contenido de aceite triglicérido sobre el tamaño de gota

Con la finalidad de conocer la influencia del contenido de fase interna (aceite triglicérido) en el tamaño de gota de las emulsiones O/W (aceite-en-agua), preparadas por el método de inversión de fases, se escogió el sistema agua/Tween 80-Span 60/aceite de soya. La Figura 1 muestra las líneas de dilución, a relaciones surfactante/aceite (S/O) constantes de 2; 1; 0,67; 0,5 y 0,4 p/p, empleadas para obtener las emulsiones finales con 4, 8, 12, 16 y 20% p/p de aceite de soya respectivamente, y una concentración de surfactante de 8% en peso. En todos los casos se reportan el diámetro Sauter,  $D[3,2]$ , que corresponde al volumen total de fase dispersa dividido por el área interfacial del total de gotas y el diámetro  $D_{90}$ , que representa el diámetro para el 90 por ciento en volumen de la distribución acumulada. Este último se utiliza para asegurar que las gotas más grandes se encuentran por debajo del diámetro requerido para administración intravenosa [2]. El valor del diámetro de gota es el promedio de tres mediciones, encontrándose en todos los casos una desviación estándar menor al 10%.

La Figura 2 muestra la influencia de la concentración del aceite de soya sobre el diámetro de gota  $D[3,2]$ , y  $D_{90}$ , para diferentes valores de HLB de la mezcla surfactante. A medida que aumenta el contenido de aceite en las emulsiones aumenta el tamaño de gota, sin embargo, para valores de HLB de 12 y 13 se encuentra que las emulsiones poseen un tamaño inferior a 600 nm. Asimismo, el diámetro de las gotas más grandes de las emulsiones,  $D_{90}$  (Figura 3), es menor que 1  $\mu\text{m}$  lo cual indica que las emulsiones son de baja polidispersidad. Este resultado está de acuerdo a lo esperado pues para emulsiones con menor proporción de fase interna, manteniendo constante la concentración final de surfactante, tiene en el sistema un inventario de surfactante suficiente para formar más interfase.

Se ha observado que durante la emulsión por inversión de fases el sistema transita por

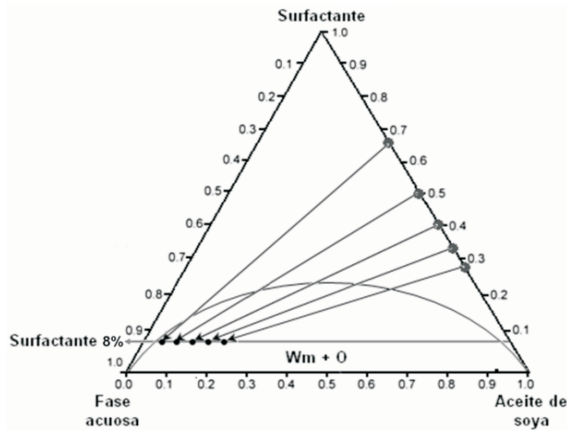


Figura 1. Representación esquemática en un diagrama ternario Winsor I [13] de las líneas de dilución para obtener las emulsiones con diferentes concentraciones de aceite de soja manteniendo constante la concentración final de surfactante.

mesofases cuya viscosidad y presencia de cristales líquidos están relacionadas con la línea S/O (relación surfactante/aceite) considerada: a mayor S/O la viscosidad en las dispersiones iniciales que formarán la emulsión se incrementa y se alcanza un tamaño de gota menor [22]. Debido a que se obtuvieron emulsiones con tamaño de gota pequeño y de baja polidispersidad para una concentración de 12% de fase dispersa y valores de HLB entre 12 y 13, se procede a estudiar la influencia que tienen diferentes mezclas de surfactantes para valores iguales de HLB.

**Influencia de la mezcla de surfactantes no iónicos**

La obtención de emulsiones O/W, con gotas submicrométricas, es más difícil de obtener con los aceites triglicéridos que con los hidrocarbu-

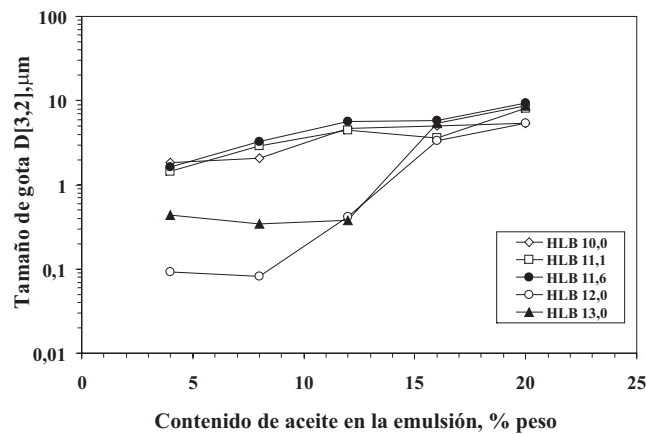


Figura 2. Tamaño de gota D[3,2] vs. contenido de aceite en la emulsión. Sistema: fase acuosa/Tween 80-Span 60/aceite de soja.

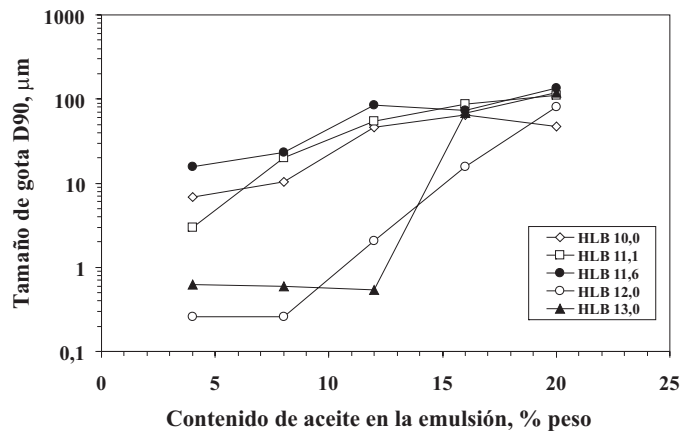


Figura 3. Tamaño de gota D90 vs. contenido de aceite. Sistema: fase acuosa/Tween 80-Span60/aceite de soja.



ros [20]. Los aceites vegetales como la soya, contienen mezclas de ácidos grasos (Tabla 2) y su emulsión por un método de baja energía como el de emulsión por inversión de fases [17], requiere que la solubilidad del aceite en la fase surfactante sea alta. Por esta razón se han escogido los surfactantes derivados del sorbitol y sus mezclas con la finalidad de aumentar la solubilidad del aceite de soya en la fase surfactante. En todas las mezclas, el surfactante hidrofílico es el monooleato de sorbitan polietoxilado (Tween 80).

En la Figura 4 se representa el tamaño de gota,  $D[3,2]$  de las emulsiones obtenidas para las tres combinaciones de surfactantes: Tween 80/Span 80, 60 ó 20. El sistema Tween 80-Span 80 provee emulsiones con tamaños medios de gota inferiores a  $1 \mu\text{m}$  para todos los HLB estudiados, mientras que los otros sistemas muestran tamaños de gota inferiores a  $600 \text{ nm}$  para HLB 12; 12,4 y 13. Sin embargo, tomando en cuenta el tamaño de las gotas más grandes en la distribución, (D90), se tiene que las emulsiones menos polidispersas y que cumplen con el requerimiento de tamaño de gota para emulsiones parenterales, son las producidas en el sistema Tween 80/Span 20. Se presume que este fenómeno está relacionado con el hecho de que las moléculas de Tween y Span en la interfase agua/aceite, estarían localizadas según su solubilidad en las fases acuosa y oleosa [14]. Así, para un mismo HLB, la mezcla que contiene el surfactante más lipofílico de la serie (Span 80) estaría más repartido en la fase aceite que el sistema que contiene

Span 20, éste último sistema aportaría más moléculas de surfactantes en la región interfacial agua/aceite. Ha sido reportado que al mezclar surfactantes con cadenas lipofílicas diferentes, el espacio entre las moléculas de surfactante vecinas aumenta [23].

En los sistemas estudiados se ha observado que durante el proceso de emulsión, la fase de cristal líquido formada en el sistema Tween 80/Span 20 posee una viscosidad intermedia entre las fases viscosas detectadas en los sistemas Tween 80/Span 60 (donde se observó una fase de cristal líquido muy viscosa entre 10 y 30% en peso de fase acuosa agregada) y el sistema Tween 80/Span 80 (que presentó una fase poco viscosa alrededor de un contenido de 15 a 20% de fase acuosa añadida) [24].

Los resultados experimentales obtenidos muestran que la mezcla de surfactantes con cadenas lipofílicas diferentes y conteniendo dobles enlaces proveen la formación de nano-emulsiones utilizando baja energía. Se ha discutido que este fenómeno está relacionado con la disminución de rigidez de la monocapa de surfactante [25].

En el caso de la formación de nano-gotas de aceites triglicéridos en agua mediante un proceso de baja energía, denominado emulsión espontánea, el fenómeno debe estar relacionado no solamente con la flexibilidad de la película interfacial sino con la elección de moléculas surfactantes compatibles con los aceites triglicéridos como lo son los derivados de sorbitol. En el caso del sistema formulado con Span 60 (el cual es un

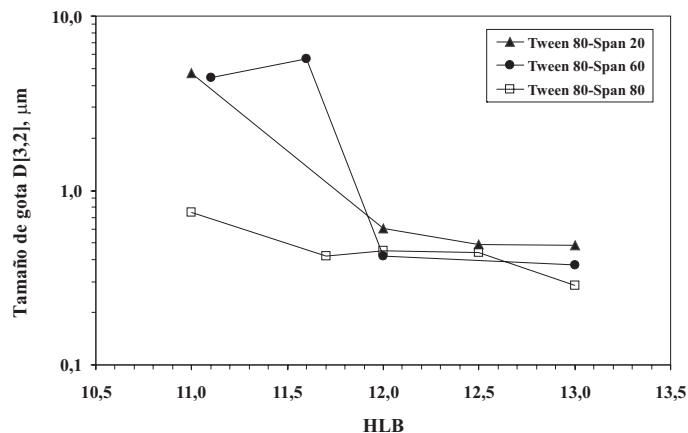


Figura 4. Tamaño de Gota  $D[3,2]$  vs. HLB. Sistemas fase acuosa/Tween 80/Span (80, 60 ó 20) /aceite de soya. Concentración final de fase dispersa = 12%.

estearato de sorbitol, siendo el estearato un derivado de ácido graso saturado), se observa que el cristal líquido formado durante el proceso de emulsión es el más viscoso de todos los sistemas estudiados [24], donde el método de baja energía utilizado no es capaz de formar nano-emulsiones de baja polidispersidad.

De los resultados mostrados en las Figuras 4 y 5 se escoge el sistema Tween 80/Span 20 por ser el que presenta las nano-emulsiones con menor polidispersidad. Con la finalidad de incorporar una fracción mayor de aceite triglicérido en la nano-emulsión para uso parenteral, se realizó un barrido de HLB en sistemas con una morfología Winsor I cerca de la formulación óptima [19] para obtener emulsiones con una fase dispersa de 16% en peso de aceite de soya. La Figura 6

muestra que es posible dispersar una mayor cantidad de aceite de soya para un HLB = 12,5; además puede observarse que el tamaño D[3,2] y D90 son similares, esto indica que el tamaño de todas las gotas está comprendido entre 500 y 700 nm y es posible utilizar esta emulsión como medio parenteral sin necesidad de realizar microfiltración debido a que no existen gotas con tamaños superiores a 1  $\mu\text{m}$ .

En la Figura 7 se muestra el comportamiento del tamaño de gota, D[3,2] y D90, con respecto al tiempo. Se observa que a 25°C y 40°C las emulsiones son estables. Esto se debe a que en emulsiones sub-micrométricas el crecimiento de tamaño de gota se produce por efecto de la presión de Laplace, fenómeno llamado maduración de Ostwald [9], a diferencia de las macroemulsiones

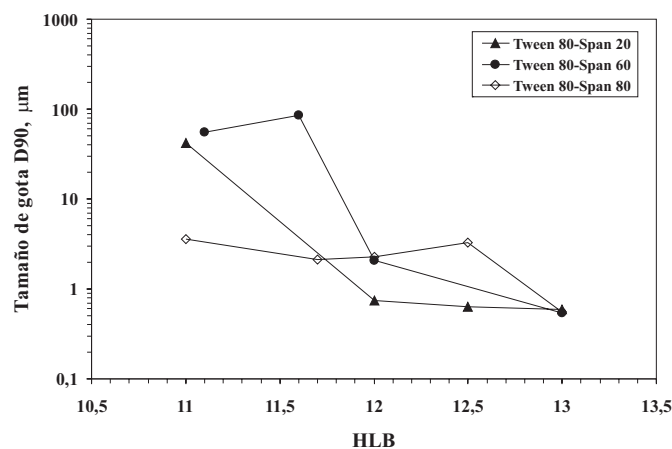


Figura 5. Tamaño de Gota D90 vs. HLB. Sistemas fase acuosa/Tween 80/Span (80, 60 ó 20)/aceite de soya. Concentración final de fase dispersa = 12%.

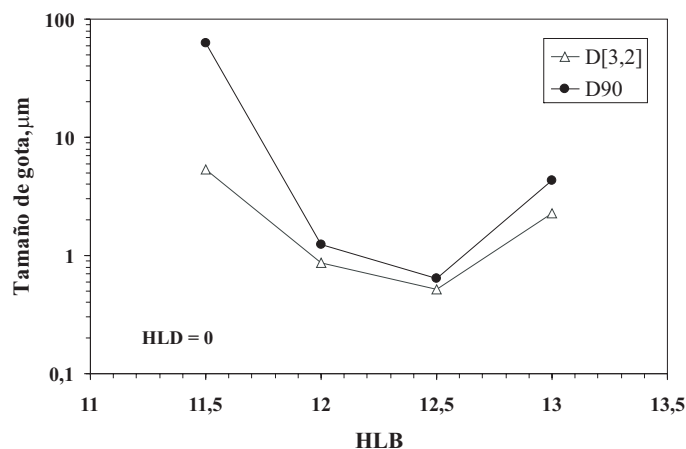


Figura 6. Tamaño de gota D[3,2] y D90 vs. HLB. Sistemas fase acuosa/Tween 80-Span 20/aceite de soya. Concentración final de fase dispersa = 16%. Se muestra el HLB en la formulación óptima (HLD = 0).

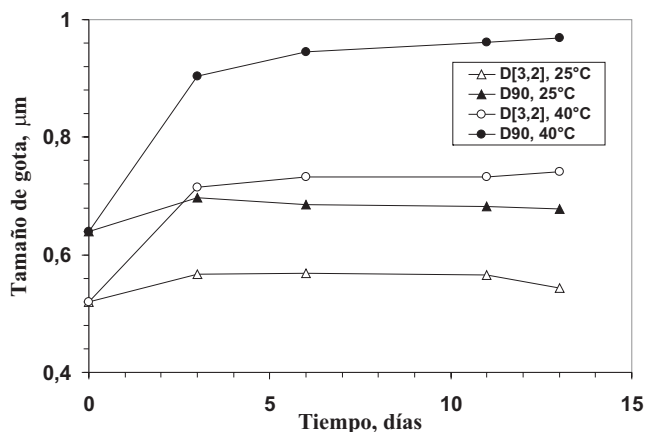


Figura 7. Tamaño de gota D[3,2] y D90 vs. Tiempo a temperaturas de 25°C y 40°C. Sistema fase acuosa/Tween 80-Span 20/aceite de soya, HLB = 12,5. Concentración final de fase dispersa = 16%.

donde la desestabilización se produce por procesos de floculación y coalescencia.

### Conclusiones

Se reporta por primera vez la formación de nano-emulsiones con aceites triglicéridos (aceite de soya) utilizando el método de emulsión por inversión de fase. En este estudio queda en evidencia que es importante no solamente la formulación del sistema (HLB de la mezcla surfactante), sino el tipo de molécula que forma la mezcla de surfactante. La nano-emulsión del aceite de soya se produce con el sistema Tween 80/Span 20 para concentraciones de fase dispersa del aceite triglicérido hasta un 16% lo cual constituye la base de las emulsiones parenterales donde el tamaño de gota requerido debe ser inferior a 1 μm.

### Agradecimiento

Los autores agradecen al FONACIT proyecto F-2005000175 y al CDCHT de la Universidad de Los Andes proyecto I-739-02-08-B por el soporte para la realización de esta investigación.

### Referencias Bibliográficas

1. Becher, P. *Emulsion: Theory and Practice*. Reinhold, New York. 1965.
2. Benita, S. y Levy, M. Y., "Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: Comprehensive physicochemical characterization", *Journal of Pharmaceutical Sciences* 82(11), (1993), 1069-1079.
3. Wretling, A., "The pharmacological basis for the use of fat emulsions in intravenous nutrition", *Act. Chir. Scand*, 325 (1964) 31-42.
4. Brouillet, F., Bullón, J., Cárdenas, A., Sánchez, J., Marti-Mestres, G. y Briceño, M. "Modification of the droplet size and distribution of parenteral emulsions by tangential microfiltration", *Journal of Membrane Science*, 221 (2003) 199-206.
5. K. Lissant, "Hybrid thixotropic rocket and jet fuels comprising oil in water emulsions, US Patent 3,352,109 (1967).
6. K. Lissant, Non-Newtonian cosmetic, nutritive and pharmaceutical compositions as exemplified by thixotropic high internal phase ratio emulsions of cosmetic, nutritive and pharmaceutical agents, US Patent 4,040,857 (1975).
7. M.L. Chirinos, A.S. Taylor, S.E. Taylor, Preparation of HIPR emulsions and transportation thereof, US Patent 4,396,417 (1983).
8. Cuellar, I., Bullón, J., Forgiarini, A., Cárdenas, A. y Briceño, M., "More efficient preparation of parenteral emulsions or how to improve a pharmaceutical recipe by formulation engineering", *Chemical Engineering Science* 60 (2005) 2127-2134.
9. Forgiarini, A. "Estudio de la relación entre comportamiento físico y formación de nano-emulsiones de fase externa acuosa", Tesis de



- doctorado, Departament Enginyeria Química i Metalúrgia, Universitat de Barcelona, (2001), Barcelona, España.
10. Forgiarini, A., Esquena, J., González, C. y Solans, C., "Formation of nano-emulsions by low-energy emulsification methods at constant temperature", *Langmuir* 17 (2001) 2076-2083.
  11. Salager, J. L.; Forgiarini, A.; Márquez, L.; Peña, A.; Pizzino, A.; Rodríguez, M.P.; Rondón-González, M. "Using emulsion inversion in industrial processes". *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 108-109, 20, (2004), 259-272.
  12. Shinoda, H.; Saito, H. "The effect of temperature on the phase equilibria and the types of dispersion of the ternary system composed of water, cyclohexane, and nonionic surfactant". *J. Colloid Interface Sci.* 26, (1968), 70-74.
  13. Salager J. L., Phase Transformation and Emulsion Inversion on the Basis of Catastrophe Theory, en *Encyclopedia of Emulsion Technology*, P. Becher Ed., vol. 3, Chap. 2, M. Dekker, New York, 1988.
  14. Márquez, N., A. Graciaa, J. Lachaise, and J.L. Salager, "Partitioning of Ethoxylated Alkylphenol Surfactants in Microemulsion-Oil-Water Systems: Influence of Physicochemical Formulation Variables", *Langmuir* 18 (16), (2002) 6021-6024.
  15. Marszall, L., "Adsorption of nonionic surfactants at the oil-water interface and emulsion inversion point" *Colloid & Polymer Sci.* 254, (1976) 674-675.
  16. Lin, T.J. "Low-energy emulsification I: Principles and applications" *J Soc. Cosmet. Chem.* 29, (1978) 117-125.
  17. Sagitani H. "Phase-Inversion and D-Phase Emulsification" en *Organized Solutions*, S.E. Friberg and Lindman B. Editores, Marcel Dekker, New York, 1992.
  18. D. Morales, J.M. Gutiérrez, M.J. García-Celma, C. Solans, "A study of the relation between bicontinuous microemulsions and oil/water nanoemulsion formation". *Langmuir* 19 (2003) 7196-7200.
  19. Tolosa L. I., Forgiarini A., Moreno P., Salager J. L. "Combined Effects of Formulation and Stirring on Emulsion Drop Size in the Vicinity of Three-Phase Behavior of Surfactant-Oil Water Systems" *Industrial & Engineering Chemistry Research* 45, (2006) 3810-3814.
  20. Salager, J. L., Anton, R., Andérez, J. M. y Aubry, J. M., "Formulation des microémulsions par la méthode du HLD", *Techniques de l'ingénieur, Traité Génie des procédés*, [J 2 150] (2002) 1-20.
  21. Mataix, J. y Carazo, E., *Nutrición Para Educadores*; Ed. Díaz Santos, S.A. Madrid, 1995.
  22. Márquez, R., Bullón, J., Márquez, L., Cárdenas, A., Briceño, M., y Forgarini, A., 'Rheological changes of parenteral emulsions during phase-inversion emulsification', *Journal of Dispersion Science and Technology* 29 (2/24) (2008), art. en prensa.
  23. Shiao, S.Y., Patist A., Free M.L., Chhanbra V., Huibers P.D.T., Gregory A. Patel S., Shah D.O. "The importance of sub-angstrom distances in mixed surfactant systems for technological processes" *Colloids and Surfaces*, 128 (1997) 197-208.
  24. Molina, Y. "Preparación de emulsiones parenterales mediante un método de baja energía", Tesis de Grado, Escuela de Ingeniería Química, Universidad de los Andes (2005), Mérida, Venezuela.
  25. Dai L., Li W., Hou X. "Effect of the molecular structure of mixed non-ionic surfactants on the temperature of miniemulsion formation". *Colloids and Surfaces*, 125, (1997), 27-32.

Recibido el  
En forma revisada el