

Balance Hidrofílico-Lipofílico (HLB) del Colesterol y sus Aplicaciones en Emulsiones del Tipo Aceite en Agua

Ricardo C. PASQUALI ^{1,2*} & Carlos BREGNI ¹

¹ Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, 6° piso (1113) Buenos Aires, Argentina.

² Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad CAECE, Av. de Mayo 866 (1084) Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN. El colesterol está propuesto como emulsionante en cosméticos y formulaciones farmacéuticas de aplicación tópica, la mayor parte de las cuales son anhidras o emulsiones del tipo agua en aceite. Los estudios previos realizados por nosotros muestran que se pueden obtener emulsiones estables de vaselina líquida en agua con un alto contenido de fase oleosa cuando se utiliza al colesterol junto con emulsionantes que poseen un elevado valor de Balance Hidrofílico-Lipofílico (HLB), tales como el laurilsulfato de sodio y el cloruro de cetiltrimetilamonio. Con el fin de contribuir a la aplicación del colesterol como emulsionante en emulsiones del tipo aceite en agua, se determinó experimentalmente el valor del HLB del colesterol, parámetro indispensable para una óptima formulación de emulsiones.

SUMMARY. "The Hydrophile-Lipophile Balance (HLB) of Cholesterol and its Applications in Emulsions of the Oil in Water type". Cholesterol is proposed as an emulsifier in cosmetic and pharmaceutical formulations of topical application, most of which are anhydrous or emulsions of water in oil. Our previous studies shows that it is possible to obtain stable emulsions of liquid paraffin in water with a high oily phase content when cholesterol is used together with high Hydrophile-Lipophile Balance (HLB) values surfactants, like sodium laurylsulfate and cetyl-trimethylammonium chloride. To contribute to the cholesterol application as emulsifier in oil in water emulsions, we obtain experimentally the HLB value of cholesterol, parameter essential to an optimum emulsion formulation.

INTRODUCCIÓN

El colesterol está clasificado como un lípido anfifílico polar e insoluble en agua ¹. A diferencia de otros lípidos anfifílicos considerados insolubles en agua (la solubilidad del colesterol en agua es del orden del mg/dm³) ², como las lecitinas, el colesterol no absorbe agua. Tanto en las lecitinas como en las fosfatidiletanolaminas, el fosfatidilinositol y la esfingomielina, la absorción de agua conduce a la formación de fases líquido-cristalinas. Como sucede con otros lípidos anfifílicos insolubles en agua y que no absorben a esta sustancia, tales como los di- y triglicéridos, los ácidos grasos, las ceras, los ésteres de esteroides y los alcoholes de cadena larga, el colesterol forma monocapas estables en la superficie del agua.

En las farmacopeas ³ y en la bibliografía especializada ⁴, el colesterol figura como un emul-

sionante y como tal forma parte del petrolato hidrofílico USP ³, en el cual aumenta la capacidad de absorción de agua, la que se incorpora en forma de una emulsión del tipo agua en aceite ⁵. Esta es una de las pocas aplicaciones farmacéuticas, o quizá la única, del colesterol como emulsionante que figura en las farmacopeas, posiblemente debido al desconocimiento de su Balance Hidrofílico-Lipofílico (HLB).

Al colesterol se lo menciona como un estabilizante para emulsiones del tipo agua en aceite ⁶. Sin embargo, en ensayos previos realizados por nosotros se observó que se pueden obtener emulsiones estables de vaselina líquida en agua con un alto contenido de fase oleosa cuando se utiliza como emulsionante al colesterol junto con laurilsulfato de sodio o con cloruro de cetiltrimetilamonio. Estos resultados muestran que el colesterol puede ser usado conjuntamente con

PALABRAS CLAVE: Balance hidrofílico-lipofílico (HLB), Colesterol, Emulsiones.
KEY WORDS: Cholesterol, Emulsions, Hydrophile-Lipophile Balance (HLB).

* Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: rcpasquali@yahoo.com

emulsionantes que poseen un elevado valor del *HLB* para obtener emulsiones del tipo aceite en agua. En una serie de esas pruebas, en las que se empleó colesterol y cloruro de cetiltrimetilamonio, se observó que, de las formulaciones ensayadas, el tamaño de los glóbulos de las emulsiones de vaselina líquida en agua alcanzaban un valor mínimo (unos 3 μm) cuando la mezcla emulsionante estaba formada por 40% m/m del tensioactivo cuaternario y 60% m/m de colesterol. Como el valor del *HLB* del cloruro de cetiltrimetilamonio, calculado por el método de Davies ^{7,8} es 21,4 y el *HLB* requerido de la vaselina líquida es aproximadamente diez ⁹, el valor estimado del *HLB* del colesterol debería estar comprendido entre 2 y 3. Este valor es consistente con el hecho de que el *HLB* de los emulsionantes poco solubles en agua está comprendido entre uno y cuatro ¹⁰.

El colesterol interacciona tanto con los tensioactivos catiónicos formados por sales de amonio cuaternario ¹¹ como con el lauril sulfato de sodio ². Estas interacciones podrían ser responsables de la estabilidad de la interfase aceite-agua y, por lo tanto, de la estabilidad de las emulsiones. Shah & Schulman ¹² sugirieron que el colesterol interacciona con los fosfolípidos, fenómeno al que atribuyeron la fluidez de las membranas celulares. Sin embargo, los estudios posteriores parecen indicar que no existen evidencias de una interacción entre estas sustancias ^{13,14}.

La estabilidad de ciertas emulsiones que contienen una mezcla de un emulsionante hidrosoluble con otro liposoluble fue adjudicada por Schulman & Cockbain ¹⁵ a la formación de un complejo entre ambos emulsionantes en la interfase aceite-agua. Este complejo estaría formado por cantidades iguales de moléculas de los dos emulsionantes. La formación de un complejo haría que la película interfacial sea más resistente a la rotura y, por lo tanto, las gotas de la emulsión serían menos propensas a la coalescencia. Entre las mezclas emulsionantes que utilizaron Schulman & Cockbain estaba la formada por cetilsulfato de sodio y colesterol. La estabilidad de las emulsiones del tipo aceite en agua observada era atribuida al acomodamiento compacto del complejo formado por esos dos emulsionantes en la interfase. McGregor & Barnes ¹⁶ observaron que en las monocapas formadas por colesterol penetradas por cetrimida (un tensioactivo catiónico) no había evidencias de la formación de un complejo entre esas sustancias, como suponían Schulman & Cockbain. Sin embar-

go, los ensayos de titulación microcalorimétrica isotérmica realizados por Aki & Kawasaki ¹¹ demostraron que tanto el cloruro de benzalkonio como el cloruro de bencetonio, que también son tensioactivos catiónicos, se unen al colesterol.

Otra explicación a la estabilidad de las emulsiones con colesterol se podría buscar en la formación de una interfase con características líquido-cristalinas ^{17,18}. Sin embargo, las emulsiones preparadas por nosotros no presentaron birrefringencia cuando fueron observadas al microscopio polarizante. Las características líquido cristalinas que puede presentar la interfase de una emulsión se deben a la formación de la fase laminar, que es birrefringente ¹⁹⁻²¹. Por lo tanto, la ausencia de birrefringencia indica también ausencia de una estructura líquido cristalina en la interfase.

Israelachvili *et al.* ²² definieron lo que denominaron condición crítica para la formación de micelas, a la que más tarde se llamó parámetro de acomodamiento crítico (en inglés, *critical packing parameter*). Este parámetro fue definido de la siguiente manera:

$$\text{parámetro de acomodamiento crítico} = \frac{v}{a_0 l_c} \quad [1]$$

En la ecuación 1, v es el volumen ocupado por la parte lipofílica de la molécula de una sustancia anfifílica, l_c es su largo cuando están totalmente extendidas y a_0 es el área óptima disponible para la zona polar por molécula de sustancia anfifílica. Este área no es solamente el área disponible para el grupo polar de la molécula de la sustancia anfifílica sino también para su dominio de hidratación ²³. Tanto en la fase laminar como en la interfase de una emulsión sin características líquido cristalina, el parámetro de acomodamiento crítico es igual a 1, ya que el radio de curvatura de las gotas de las emulsiones es mucho mayor que el largo de las moléculas de emulsionante y la curvatura es despreciable a escala molecular. Por lo tanto, en una emulsión el acomodamiento óptimo de las moléculas de emulsionante se lograría cuando el parámetro de acomodamiento crítico se hace igual a 1. En el caso del lauril sulfato de sodio y el cloruro de cetiltrimetilamonio, en los cuales el área óptima disponible para la zona polar sería relativamente grande, la presencia de colesterol podría aumentar el volumen de la parte lipofílica de estos tensioactivos, con lo cual el valor del parámetro de acomodamiento crítico se

acercaría a 1. De esta forma se lograría un acomodamiento más compacto de la mezcla emulsionante en la interfase y una mayor estabilidad de las emulsiones.

Con el fin de contribuir a la aplicación del colesterol como emulsionante, en este trabajo se determinó experimentalmente el valor del *HLB* del colesterol y determinó la estabilidad de emulsiones de vaselina líquida en agua en las que se usó como emulsionante mezclas de colesterol-laurilsulfato de sodio y colesterol-cloruro de cetiltrimetilamonio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material

El Tween 20, Tween 60, el Span 20 y el Span 60 fueron provistos por NSC (Uniqema). El laurilsulfato de sodio fue obtenido de Mallinckrodt Chemical Works. El cloruro de cetiltrimetilamonio, en solución al 25%, fue provisto por Fabriquímica y el colesterol por Merck. Todas estas drogas fueron utilizadas tal como fueron recibidas. La vaselina líquida usada poseía una viscosidad de 168 mPa.s a 20 °C. Las observaciones microscópicas de las emulsiones se realizaron con un microscopio óptico Arcano modelo XSZ-107 E provisto de ocular graduado y cámara fotográfica.

Determinación del *HLB* requerido de la vaselina líquida usada en los ensayos

Para la determinación del *HLB* requerido de la vaselina líquida empleada se utilizaron dos métodos: el de Griffin⁹ y el método rápido de Robbers & Bhatía²⁴. En ambos métodos se determinó el valor del *HLB* de una mezcla de emulsionantes de las series Tween y Span que hace mínimo el volumen de la fase acuosa separada en emulsiones del tipo aceite en agua formadas por partes iguales en masa de vaselina líquida y agua. El valor del *HLB* se obtuvo igualando a cero a la derivada de la ecuación cuadrática, obtenida por cuadrados mínimos, que vincula al volumen de la fase acuosa separada con el *HLB* de la mezcla de emulsionantes.

Método de Griffin

Los emulsionantes usados fueron mezclas de Tween 60 (*HLB* = 14,9) y Span 60 (*HLB* = 4,7). Los porcentajes en masa de Tween 60 para un cierto valor del *HLB* fueron calculados por medio de la ecuación 2:

$$\text{Tween 60 (\% m/m)} = 100 \times \left(\frac{\text{HLB} - 4,7}{10,2} \right) \quad [2]$$

Se realizaron emulsiones de vaselina líquida en agua con una mezcla emulsionante cuyo *HLB* es igual a 10,4, que es aproximadamente el valor del *HLB* requerido esperado de la vaselina líquida para emulsiones del tipo aceite en agua de acuerdo con la bibliografía. Se hicieron sendas emulsiones con 0,5%, 1,0%, 2%, 3%, 4% y 5% de mezcla emulsionante. Las emulsiones se prepararon en probetas graduadas de 100 cm³ agregando de una vez (100-*m_e*)/2 g de agua a 70-75 °C sobre una masa igual de vaselina líquida, calentada también a 70-75 °C, en la que se disolvieron *m_e* g de la mezcla emulsionante. Las probetas fueron tapadas y agitadas manualmente inmediatamente después de preparadas las emulsiones y a los 10 min. La medición del volumen de la fase acuosa separada se realizó a las 24 h. La proporción de mezcla emulsionante que se consideró adecuada es aquella que dio una separación de la fase acuosa cercana a los 10 cm³.

Para determinar el *HLB* requerido de la vaselina líquida se prepararon emulsiones tal como se indicó anteriormente, pero con mezclas emulsionantes con valores de *HLB* comprendidos entre 9,5 y 12. La concentración de la mezcla emulsionante usada es la determinada en el ensayo anterior.

Método rápido de Robbers & Bhatía

Se utilizaron como emulsionantes Tween 20 (*HLB* = 16,7) y Span 20 (*HLB* = 8,6). Los porcentajes en masa de Tween 20 están dados por la ecuación 3:

$$\text{Tween 20 (\% m/m)} = 100 \times \left(\frac{\text{HLB} - 8,6}{8,1} \right) \quad [3]$$

Se prepararon dos emulsiones madre: una (emulsión A) con una mezcla de emulsionantes cuyo *HLB* es igual a 9,6 y otra (emulsión B) con un *HLB* igual a 11,0 de la siguiente manera: Los componentes de cada una de las emulsiones fueron pesados dentro de una probeta de 100 cm³. Primero se agregaron 49,75 g de vaselina líquida, luego 0,5 g de la mezcla de emulsionantes y, finalmente, 49,75 g de agua destilada. Se tapó la probeta y se agitó cinco veces manualmente.

Luego se prepararon una serie de emulsiones, en las cuales los *HLB* de las mezclas emulsionantes están comprendidos entre los de las emulsiones madre A y B, de la siguiente manera: (a) en un tubo de centrifuga graduado de 15

cm³ se agregaron las cantidades necesarias de cada una de las emulsiones madre, de forma tal que la masa total sea 10 g, (b) se taparon los tubos y se agitaron cinco veces manualmente. Se centrifugaron los tubos a 1.500 rpm y se tomó nota del volumen de la fase acuosa separada en cada tubo después de centrifugar durante 2, 4, 6 y 8 min.

Determinación del HLB del colesterol

Para determinar el HLB del colesterol se procedió de la misma forma que para obtener el HLB requerido de la vaselina líquida por el método de Griffin, pero el Span 60 fue reemplazado por colesterol. El valor del HLB del colesterol fue calculado mediante la ecuación 4:

$$HLB_{\text{colesterol}} = \frac{HLB_{\text{vaselina}} - 14,9 f_T}{1 - f_T} \quad [4]$$

donde HLB_{vaselina} es el valor del HLB requerido de la vaselina líquida y f_T es la fracción en masa de Tween 60 en la mezcla de Tween 60 y colesterol que da el mínimo volumen separado de fase acuosa. Las mezclas de emulsionantes usadas contenían entre 59 y 70% en masa de Tween 60.

Preparación de emulsiones con colesterol

Se prepararon dos emulsiones de vaselina líquida en agua, una con colesterol y laurilsulfato de sodio como emulsionantes y otra con colesterol y cloruro de cetiltrimetilamonio. En cada emulsión, la proporción del emulsionante fue del 5% m/m. Las emulsiones contenían 47,50 g de vaselina líquida, en la cual se disolvió a 70-75 °C el colesterol, y 47,50 g de agua, en la que se disolvió el laurilsulfato de sodio o el cloruro de cetiltrimetilamonio. Se utilizaron como conservantes metilparabeno (0,07 g) y propilparabeno (0,03 g) que se incorporaron, respectivamente, a las fases acuosa y oleosa. Las emulsiones se prepararon a 70-75 °C agregando lentamente, y mezclando con un agitador magnético, la fase acuosa sobre la oleosa.

Las masas de laurilsulfato de sodio (m_{LSS}) y de cloruro de cetiltrimetilamonio (m_{CTMCA}) usadas se calcularon con las ecuaciones 5 y 6:

$$m_{LSS} = 5 \times \frac{HLB_{\text{vaselina}} - HLB_{\text{colesterol}}}{40 - HLB_{\text{colesterol}}} \quad [5]$$

$$m_{CTMCA} = 5 \times \frac{HLB_{\text{vaselina}} - HLB_{\text{colesterol}}}{2,14 - HLB_{\text{colesterol}}} \quad [6]$$

donde 40 y 21,4 son, respectivamente, los valores de los HLB del laurilsulfato de sodio y del cloruro de cetiltrimetilamonio.

Estabilidad de las emulsiones

En cada una de las emulsiones se midió el tamaño promedio de las gotas y se centrifugó a 2.500 rpm durante 15 min. Ambos ensayos se realizaron a la semana y a los tres meses de preparadas las emulsiones. La medición del tamaño de las gotas de las emulsiones se realizó a partir de fotografías obtenidas con microscopio (400 aumentos).

RESULTADOS

HLB requerido de la vaselina líquida por el método de Griffin

Los resultados de la medición de los volúmenes de la fase acuosa separada a las 24 h de las emulsiones de vaselina líquida en agua, con cantidades variables de una mezcla de Tween 60 y Span 60 de HLB igual a 10,4 (Tabla 1), indican que una concentración de la mezcla emulsionante del 3% m/m resulta adecuada para la determinación del HLB requerido de la vaselina líquida por el método de Griffin.

Los volúmenes de la fase acuosa separada a las 24 h de emulsiones de vaselina líquida y agua con 3 % en masa de mezclas de Tween 60 y Span 60 con valores de HLB comprendidos entre 9,5 y 12, 0 (Fig.1) se pueden calcular con la ecuación 7, obtenida por el método de los cuadrados mínimos a partir de los resultados experimentales ($r = 0,9866$):

$$V = 14,1433 \times HLB^2 - 299,013 \times HLB + 1.594,94 \quad [7]$$

Para obtener la ecuación anterior no se tuvieron en cuenta a las emulsiones en las que no se podía apreciar nítidamente la separación en-

Porcentaje de la mezcla emulsionante de Tween 60-Span 60 de HLB = 10,4	Volumen de la fase acuosa separada(cm3)
0	50
0,5	42
1,0	38
2,0	28
3,0	13
4,0	0
5,0	0

Tabla 1. Volúmenes de la fase acuosa separada a las 24 h de emulsiones de vaselina líquida y agua con diferentes concentraciones de una mezcla de Tween 60 y Span 60 de HLB igual a 10,4.

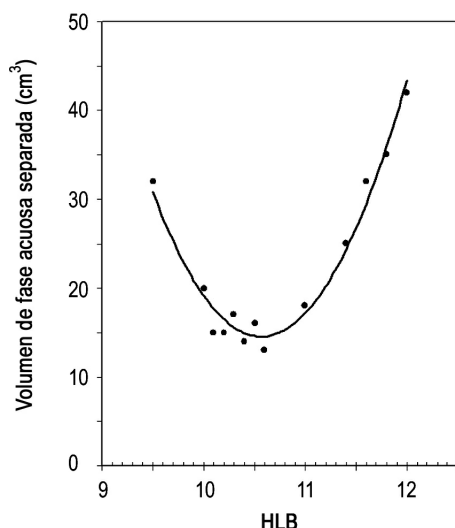


Figura 1. Volúmenes de la fase acuosa separada a las 24 h de emulsiones de vaselina líquida y agua con 3% en masa de mezclas de Tween 60 y Span 60 de HLB comprendido entre 9,5 y 12,0.

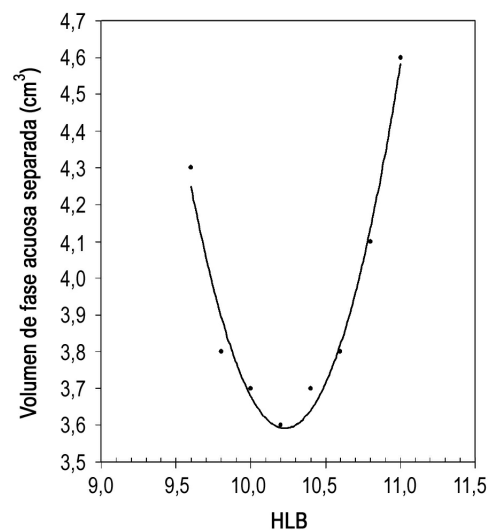


Figura 2. Volúmenes de la fase acuosa separada de emulsiones de vaselina líquida y agua con 0,5% en masa de mezclas de Tween 20 y Span 20 después de centrifugar 4 min a 1.500 rpm.

tre la fase acuosa separada y la emulsión, sobre todo en las que, por su bajo *HLB*, contenían un elevado contenido de Span 60 y una alta viscosidad.

Si se deriva la ecuación anterior y se iguala a cero, se llega a que el *HLB* para el cual el volumen de la fase acuosa separada es mínimo es igual a 10,6.

HLB requerido de la vaselina líquida por el método rápido de Robbers y Bhatia

Los volúmenes de la fase acuosa separada en emulsiones de vaselina líquida y agua (con 0,5% en masa de mezclas de Tween 20 y Span 20), medidos después de centrifugar durante 4 min a 1.500 rpm, están relacionados con el *HLB* por medio de la ecuación 8 ($r = 0,9894$):

$$V = 1,66667 \times HLB^2 - 34,0952 \times HLB + 177,964 \quad [8]$$

Derivando la ecuación 8 e igualando a cero se llega a que el valor obtenido en este ensayo para el *HLB* requerido de la vaselina líquida, para emulsiones del tipo aceite en agua, es igual a 10,2 (Fig.2).

HLB del colesterol

La proporción de la mezcla emulsionante usada es del 3 %. La relación hallada entre el volumen de la fase acuosa separada y el porcentaje en masa de Tween 60 en la mezcla emulsionante formada por Tween 60 y colesterol (Fig. 3) es la siguiente ($r = 0,9594$):

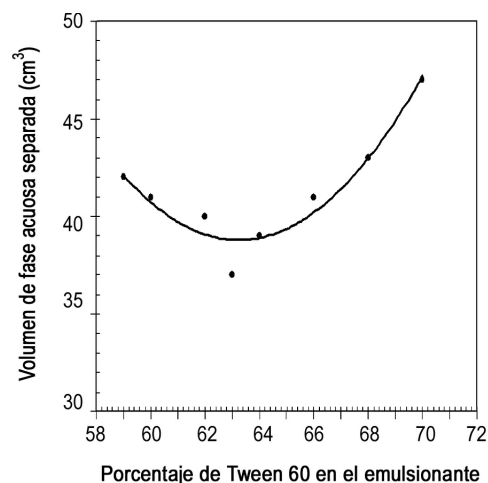


Figura 3. Volúmenes de la fase acuosa separada a las 24 h de emulsiones de vaselina líquida y agua con 3 % en masa de mezclas de Tween 60 y colesterol.

$$V = 0,183958 \times T_{60}^2 - 23,2677 \times T_{60} + 774,548 \quad [9]$$

donde T_{60} es el porcentaje de Tween 60 en la mezcla emulsionante. Derivando e igualando a cero la ecuación 9 se llega a que la mezcla emulsionante que da la máxima estabilidad está formada por 63,2% de Tween 60 y 36,8% de colesterol. Si se adopta como valor del *HLB* requerido de la vaselina líquida usada en los ensayos a 10,4, que corresponde al valor medio de los valores obtenidos por los métodos de Griffin y de Robbers y Bhatía, el *HLB* del colesterol es 2,7, con un error no menor a $\pm 0,2$ unidades de *HLB*.

Estabilidad de las emulsiones

Después de haber sido almacenadas a temperatura ambiente durante 1 semana y durante tres meses, no se observó separación de fases al centrifugar las emulsiones a 2.500 rpm durante 15 min.

Los diámetros promedio de las gotitas de la fase oleosa en la emulsión con laurilsulfato de sodio y colesterol fueron de 6,4 μm a la semana y 6,7 μm a los tres meses de preparada. Para la emulsión con cloruro de cetiltrimetilamonio y colesterol, los diámetros promedios a la semana y a los tres meses de preparada fueron, respectivamente, 2,7 μm y 2,9 μm .

DISCUSIÓN

El valor obtenido para el *HLB* del colesterol ($2,7 \pm 0,2$) está dentro del rango esperado para un emulsionante poco soluble en agua, que, según Griffin, está comprendido entre uno y cuatro ¹⁰. Este valor no pudo ser comparado con el

obtenido por otros métodos. Así, por ejemplo, con el método de Davies ²⁵ se obtiene un valor negativo para el *HLB* del colesterol. Por otro lado, a partir del valor 8,8 para el parámetro de solubilidad del colesterol ²⁶, con el método de Little ²⁷ se obtiene un *HLB* excesivamente alto (11,6), que corresponde a un tensioactivo dispersable en el agua 10, tal como el monoestearato de polietilenglicol 400.

El valor 2,7 que se obtuvo para el *HLB* del colesterol podría utilizarse, como primera aproximación, para los esteroides de la lanolina, que están propuestos como estabilizantes de emulsiones del tipo aceite en agua en combinación con otros emulsionantes ²⁶.

Agradecimientos. Los autores agradecen a Horacio Tassano (Uniqema) por las muestras de tensioactivos de las series Tween y Span y a Oscar Carballo (Fábrica Química) por la muestra de cloruro de cetiltrimetilamonio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Small, D.M. (1968) *J. Am. Oil Chem. Soc.* **45**: 108-19.
- Schulz, P.C. & S. Moya (1998) *Colloid . Polym. Sci.* **276**: 87-91.
- US Pharmacopeia, National Formulary USP 27 (2004) United States Pharmacopoeia Convention, Inc. Washington DC.
- Kibbe, A. (Ed.) (2000) "*Handbook of Pharmaceutical Excipients*". American Pharmaceutical Association, Pharmaceutical Press, 138-9.
- Gennaro, A.R. (2000) "*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*". 20th edition, United States.
- Becher, P. (1972) "*Emulsiones. Teoría y Práctica*". Editorial Blume, Madrid.
- Ho, O.B (1998) *J. Colloid Interf. Sci.* **198**: 249-60.
- Proverbio, Z. E., S.M. Bardavid, E.L. Arancibia & P.C. Schulz (2003) *Colloid. Surface A* **214**: 167-71.
- Griffin, W.C. (1949) *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1**: 311-26.
- Griffin, W.C. (1965) "*Encyclopedia of Chemical Technology*". Second edition, volume 8, Wiley, USA, págs. 117-54.
- Aki, H. & Y. Kawasaki (2004) *Thermochim. Acta* **416**: 113-9.
- Shah, D.O. & J.H. Schulman (1967) *J. Lipid Res.* **8**: 215-226.
- Zatz, J.L. & G.W. Cleary (1975) *J. Pharm. Sci.* **64** : 1534-7.
- Gómez-Fernández, J.C. & F.M. Goñi (1983) *Investigación y Ciencia* **79**: 14-23.
- Schulman, J.H & E. G. Cockbain (1940) *Trans. Faraday Soc.* **36**: 651-61.
- McGregor, M.A. & G.T. Barnes (1978) *J. Pharm. Sci.* **67** (8): 1054-6.
- Friberg, S. (1971) *J. Colloid Interf. Sci.* **37**: 291-5.
- Friberg, S. & L. Mandell (1970) *J. Pharm. Sci.* **59**: 1001-4.
- Rosevear, F.B. (1954) *J. Am. Oil Chem. Soc.* **31**: 628-39.
- Rosevear, F.B. (1968) *J. Soc. Cosmet. Chem.* **19**: 581-94.
- Pasquali, R.C., C. Bregni & R. Serrao (2005) *Cosmética* **59**: 25-36.
- Israelachvili, J.N., D.J. Mithchell & B. W. Ninham (1976) *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **72**: 1525-68.
- Pasquali, R.C., C. Bregni & R. Serrao (2005) *Acta Farm. Bonaerense* **24**: 19-30.
- Robbers, J.E. & V.N. Bhatia (1961) *J. Pharm. Sci.* **50** (8): 708-9.
- Florence, A.T. & D. Attwood (1998) "*Physicochemical Principles of Pharmacy*". Macmillan Press Ltd, third edition, cap. 7, Great Britain, págs. 268-9.
- Croda (2000) "*Guide to high purity raw materials for pharmaceutical and nutritional use*". USA, pág. 20.
- Little, R.C. (1978) *J. Colloid Interf. Sci.* **65**: 587-8.