

## VESÍCULAS LIPOSOMALES ESTABILIZADAS CON QUITOSANO: ESTUDIO REOLÓGICO

G. Porras<sup>1</sup>, A. O. Vila<sup>2</sup>, F. Molina<sup>2</sup>, M. Sibaja<sup>1</sup>, S. Madrigal-Carballo<sup>1\*</sup>

- 1) Laboratorio de Polímeros (POLIUNA), Escuela de Química, Universidad Nacional, Costa Rica. Correo electrónico: [smadriga@una.ac.cr](mailto:smadriga@una.ac.cr)
- 2) Unidad de Investigación de Coloides, Departamento de Química Física, Universidad de Valencia, España.

Recibido: Enero de 2008; Aceptado: Octubre 2008

### ABSTRACT

This study aimed to investigate the rheological effect produced by mixing chitosan solutions with liposome vesicles derived from concentrated soybean lecithin dispersions (250 g/L), prepared by slow swelling under shear. The rheological behavior of lecithin-chitosan vesicles was determined by measurements of the parameter known as shear fatigue, as well as the variation in the area of the hysteresis cycle. The results obtained were compared with the behavior observed on the same system without chitosan; showing a significant change in their properties attributable to a thixotropic effect with a plastic behavior when the chitosan biopolymer is present. These results suggest that chitosan biopolymer promotes the transition from a system of flat sheets to closed type structures, such as vesicles. In addition, we performed a study of the influence of electrolytes such as NaCl, CaCl<sub>2</sub> and AlCl<sub>3</sub>, with concentrations in the range of 10<sup>-5</sup> - 10<sup>-2</sup> mol/L, on the rheological behavior of the system.

**Key words:** chitosan, liposomes, rheology, thixotropy.

### RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo estudiar el efecto reológico producido al mezclar disoluciones de quitosano con vesículas liposomales obtenidas a partir de dispersiones concentradas de lecitina de soja (250 g/L), preparadas por hinchamiento lento bajo cizalla. El comportamiento reológico de las vesículas de lecitina-quitosano, se determinó por medio de mediciones del parámetro conocido como fatiga de cizalla, así como de la variación en el área del ciclo de histéresis. Los resultados obtenidos fueron comparados con el comportamiento observado en las dispersiones de lecitina de soja sin quitosano; observándose un cambio significativo en sus propiedades atribuible a un efecto tixotrópico con características plásticas cuando este presente el quitosano. Lo anterior sugiere que el quitosano promueve la transición de un sistema de hojas planas a un sistema de estructuras cerradas tipo vesículas. Además, se llevó a cabo el estudio de la influencia de electrolitos como NaCl, CaCl<sub>2</sub> y AlCl<sub>3</sub>, con concentraciones en el intervalo 10<sup>-5</sup>-10<sup>-2</sup> mol/L, sobre el comportamiento reológico del sistema.

**Palabras clave:** quitosano, liposomas, reología, tixotropía.

### INTRODUCCIÓN

Las estructuras de bicapa son un sistema modelo de las membranas celulares y puede utilizarse para estudiar las propiedades físicas de las bicapas anfífilas [1]. Por otra parte, las vesículas son capaces de encapsular moléculas activas y, por tanto, ser utilizadas como sistemas de liberación de fármacos [2, 3]. Una aplicación específica de este tipo que ha atraído mucho la atención es el uso de liposomas como portadores no virales [4, 5]. Con base

en lo anterior, las vesículas pueden ser utilizadas en una gran variedad de aplicaciones farmacéuticas y cosméticas [6]. Los sistemas como las liposomas, micro o nanopartículas han atraído mucha atención como posibles formas de dosificación orales [7]. Entre estos, los liposomas poseen la ventaja de estar compuestos por materiales fisiológicos, como por ejemplo fosfolípidos en la lecitina de soja [8].

Sin embargo, las liposomas son susceptibles a ser destruidos por cambios en el pH, el efecto de las sales biliares y lipasa pancreática en el tracto gastrointestinal [9]. Para minimizar estos efectos, se ha estudiado la posibilidad de formar una membrana polimérica alrededor de todo el liposoma [10]. Con base en lo anterior, diversos investigadores han utilizado el quitosano como material de recubrimiento para liposomas debido de su alta y conocida afinidad con las membranas celulares [11].

El quitosano se caracteriza por ser hidrófilo, biocompatible, biodegradable y de baja toxicidad. Además, una gran cantidad de estudios han demostrado su efectividad como un agente que favorece los procesos de adsorción. Por otra parte, debido a sus propiedades de adhesivas, el quitosano también ha recibido considerable atención como nuevo bioadhesivo en sistemas de liberación de fármacos [12]. Al combinar las características de las liposomas y del quitosano, puede lograrse una liberación prolongada y controlada [13]. La bioadhesión de las formas orales de dosificación de fármacos de pobre adsorción, han recibido mucha atención en comparación a los sistemas transdérmicos y bucales. La bioadhesión a la mucosa en el tracto gastrointestinal puede describirse en términos de mucoadhesión. A partir de la muco-adhesión, se puede prolongar el tiempo de residencia de los transportadores de fármacos en los sitios de absorción; con lo que es de esperarse una mejora en la absorción de fármacos, con la combinación de mucoadhesividades y liberación de fármacos controlada mediante estos dispositivos. El retraso del tránsito gastrointestinal, inducido por el polímero bioadhesivo, podría conducir a la generación de un aumento en la biodisponibilidad oral de un medicamento [14-17].

Una de las posibles causas del aumento en la penetración de los liposomas, es la interacción entre los lípidos intracelulares y la bicapa liposomal. La magnitud de la mejora depende del tamaño de la liposoma, la composición de los lípidos y la naturaleza liofílica de la droga sobre la piel [18]. Los liposomas líquidos son aplicados directamente sobre la piel, debido a que por lo general es imposible incorporar en forma intacta los liposomas en cremas, producto de la interacción entre el surfactante y la superficie activa de las capas liposómicas [19]. En lugar de las cremas, los polímeros pueden ser usados para incrementar la viscosidad

de los preparados liposomales; ya que éstos son capaces de influir en la penetración de los fármacos y en la formación de una capa estable en torno a las vesículas [20].

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron dispersiones concentradas de lecitina de soja y el biopolímero quitosano, con el fin de obtener vesículas recubiertas. Con lo anterior, se busca mejorar la administración oral de fármacos, así como aprovechar la versatilidad de quitosano como agente de orientación de fármacos, permitiendo la incorporación de los diferentes productos químicos y farmacéuticos en su núcleo. Por otra parte, la lecitina de soja tiene muchas aplicaciones importantes en la industria alimentaria, así como en la preparación de vesículas lipídicas [21, 22]. Además, el uso de los fosfolípidos de fuentes naturales, facilita la producción a gran escala debido a la reducción de los costos en comparación con fosfolípidos sintéticos [23].

Por otra parte, en la preparación de vesículas es muy importante la transición de la fase laminar de hojas planas a estructuras cerradas. Este proceso comienza a partir de las dispersiones concentradas de fosfolípidos, en las cuales las hojas de las bicapas (o membranas) pueden apilarse periódicamente para formar una fase laminar [24]. Esto puede realizarse por medio de un proceso de hinchamiento-sonicación-congelación [23, 25, 26], o bien, por el método de hinchamiento lento bajo cizalla.

Las propiedades reológicas de las dispersiones de lecitina de soja suelen presentar distintos comportamientos que comprenden, desde los fluidos newtonianos hasta los no newtonianos [27]. Por ejemplo, mientras las dispersiones obtenidas simplemente por hinchamiento y sonicación suelen presentar un comportamiento newtoniano (60-120 g/L), o inclusive del tipo plástico (180-240 g/L); aquellas que se obtiene por hinchamiento-sonicación seguido de un tratamiento de congelado-descongelado muestran un comportamiento pseudoplástico y reopéctico [23]. El comportamiento reopéctico<sup>1</sup> es el opuesto al tixotrópico<sup>2</sup>, por lo que se caracteriza por un incremento en la viscosidad con el tiempo y la formación de un ciclo de histéresis reverso cuando se lleva a cabo un barrido de cizalla [25]. Además, trabajos anteriores [23, 25] han descrito claramente una influencia significativa de la naturaleza, valencia y concentración de diferentes cationes, así como del pH del medio acuoso; sobre el área del ciclo de histéresis.

El área del ciclo de histéresis puede correlacionarse con la energía involucrada en el

---

<sup>1</sup> ) Fluido reopéctico. Fluido viscoelástico cuya viscosidad aparente aumenta con el tiempo de aplicación de la tensión tangencial de rozamiento.

<sup>2</sup>) Fluido tixotrópico. Fluido viscoelástico cuya viscosidad aparente disminuye con el tiempo de aplicación de la tensión tangencial de rozamiento.

proceso de segregación de las vesículas bajo cizalla y esta energía dependerá de las propiedades geométricas y eléctricas de las vesículas, así como del número de vesículas segregadas en cada proceso. Resultados previos [26] han permitido confirmar las hipótesis establecidas sobre el comportamiento reológico de dispersiones concentradas de lecitina que han sido sometidas a un proceso de congelado-descongelado, donde se aprecia que el efecto reopéctico se debe fundamentalmente a la segregación bajo cizalla de las estructuras cerradas (vesículas multilamlares) [23, 25].

Para el desarrollo de este estudio, se utilizaron dispersiones concentradas de lecitina de soja y una disolución del biopolímero quitosano para obtener vesículas recubiertas. Lo anterior con el fin de desarrollar estudios con vesículas para liberación controlada, que presenten una mejoría en sus propiedades de administración por la vía oral; así como también aprovechar la versatilidad del quitosano como agente de encapsulación, para lograr la incorporación de diferentes agentes químicos-farmacéuticos en su núcleo. Debido a lo anterior, se estudiaron las propiedades reológicas de estas nuevas dispersiones concentradas de lecitina de soja a las cuales se les ha añadido quitosano; y además, se ha puesto en práctica para el desarrollo del trabajo una metodología novedosa y simple para la preparación de estos sistemas basada en el hinchamiento lento de la lecitina bajo cizalla [23, 25, 26].

## **SECCIÓN EXPERIMENTAL**

**2.1. Materiales y equipo.** La lecitina de soja (99% pureza) fue suministrada por *Guinama S.L.* (Valencia, España). El quitosano (GD 77%,  $M_w = 1,63 \cdot 10^5$  g/mol) fue proporcionado por el laboratorio de Polímeros de la Universidad Nacional de Costa Rica. El cloruro de sodio y cloruro de calcio se adquirieron en *Panreac Química S.A.* (Barcelona, España); y el cloruro de aluminio y el ácido acético glacial fueron adquiridos en *Merck* (Madrid, España). Por otra parte, el agua utilizada fue purificada a través de una unidad Milli-Q-UF (*Millipore, Bedford*).

Las determinaciones viscosimétricas se realizaron con un viscosímetro *Bohlin Visco 88* con selección de ocho velocidades en progresión geométrica de 20-1.000 rpm y un plato paralelo PP3 de 0,1 mm. Para determinar la viscosidad de las disoluciones de electrolitos se utilizaron varios viscosímetros *Cannon-Fenske* con diferentes diámetros capilares.

**2.2. Preparación de las vesículas lecitina – quitosano.** Las dispersiones de lecitina de soja (250 g/L) se prepararon utilizando el método de hinchamiento lento bajo fuerza de cizalla usando un medio acuoso de NaCl  $10^{-5}$  M.

Para estudiar la influencia de los electrolitos, las muestras se prepararon dispersando la lecitina de soja en disoluciones acuosas de cada electrolito ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  o  $\text{Al}^{+3}$ ); para cada uno de éstos, se prepararon siete diferentes dispersiones con una variación en su concentración en un intervalo de  $10^{-2}$ – $10^{-5}$  M.

Las disoluciones de quitosano (0,25, 0,50 y 1,00% m/v) se prepararon en ácido acético al 1% v/v. Las dispersiones lecitina-quitosano se prepararon mediante la mezcla de las dispersiones previamente preparadas.

**2.3. Determinaciones reométricas.** Las gráficas de fatiga de cizalla se obtuvieron utilizando el software “*ViscoSoft*”. Todas las determinaciones se repitieron cinco veces y en todos los casos se consideró el error de dispersión de todas las mediciones realizadas.

## RESULTADOS

La Figura 1 muestra, con propósitos ilustrativos; una de las series de medición del esfuerzo de fatiga de cizalla en función del gradiente de velocidad correspondiente a la dispersión concentrada de lecitina de soja 250 g/L en  $\text{NaCl } 10^{-5}$  mol/L. Esta figura muestra un ciclo de histéresis con comportamiento reopéctico y carácter plástico, donde se aprecia su punto de cedencia (fatiga de cizalla crítica).

En trabajos previos se han realizado estudios exhaustivos relacionados con el comportamiento reopéctico de dispersiones concentradas de lecitina de soja, éstos condujeron a concluir que el comportamiento observado corresponde a la transición de la fase lamelar (hojas planas) a una fase de vesículas caracterizada por una morfología de estructuras cerradas [23, 25, 26].

En investigaciones previas, utilizando los resultados teóricos obtenidos aplicando la ecuación de *Lagrange*, se demostró que el valor del “*equilibrio energético*” ( $\delta$ ) de una configuración de hoja plana fue de 10/3, mientras que para las vesículas se obtuvieron datos entre 10/3 y 5, dependiendo del tamaño y el número de bicapas. Sin embargo, estos resultados son de aplicación general, debido a que la energética funcional muestra valores extremos, que sólo se basan en el equilibrio energético. Todas las estructuras cerradas, ya sean vesículas multilamelares o unilamelares, independientemente de su forma (esférica, de forma oval u otros) poseen el mismo índice topológico, mientras que la configuración de bicapa plana muestra uno diferente [26]. Por esta razón, el mecanismo de transición (bicapa plana-estructuras cerradas), debe incluir rupturas y reconstrucciones, con una necesaria contribución de energía, al igual que la evolución de las vesículas hacia tamaños cada vez más reducidos y

con menor cantidad de bicapas [28-30].

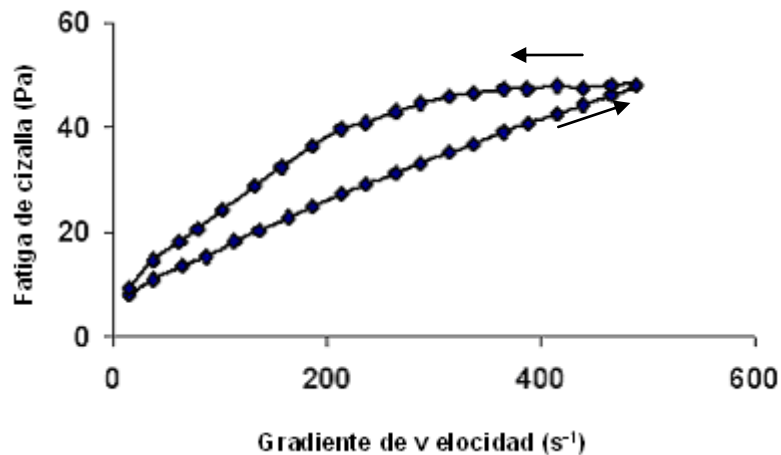


Figura 1. A: Fatiga de cizalla en función del gradiente de velocidad para dispersiones de lecitina de soja (250 g/L) en NaCl  $10^{-5}$  mol/L, obtenidas por hinchamiento lento bajo cizalla. Las flechas indican la secuencia de las mediciones.

Por otro lado, el área del ciclo de histéresis se encuentra relacionada con la energía empleada en el proceso de cizalladura utilizado para llevar a cabo la dicha transición. Este comportamiento reopéctico es similar a lo expuesto en trabajos anteriores con dispersiones de lecitina de soja (60, 120, 180 y 240 g/L) preparadas por el método de sonicación-congelación-descongelación, aunque en esos casos el carácter plástico no fue evaluado [23].

La Figura 2 muestra la variación de la fatiga de cizalla en función del gradiente de velocidad para varias disoluciones de quitosano; donde se observa un incremento de la viscosidad conforme se incrementa la concentración del biopolímero. Las disoluciones de quitosano 0,25 y 0,50% m/v mostraron un comportamiento newtoniano, mientras que la disolución al 1,00% mostró un ligero comportamiento pseudoplástico. En ningún caso se observó la aparición de ciclos de histéresis.

En la Figura 3 se muestran una de las series de mediciones para una dispersión de lecitina de soja 250 g/L en NaCl  $10^{-5}$  mol/L con la presencia de varias disoluciones de quitosano (0,25, 0,50 y 1,00% m/v), obtenidas por hinchamiento lento bajo cizalla. La gráfica muestra un comportamiento tixotrópico (opuesto al comportamiento reopéctico de las dispersiones concentradas de lecitina sin quitosano) y un carácter plástico donde se observa su punto de cedencia (fatiga de cizalla crítica); lo que permite concluir que la adición de quitosano modifica significativamente el comportamiento reológico de la matriz vesicular. Esto indica que el quitosano induce la transición de hojas planas a estructuras cerradas como vesículas. Cuando el quitosano no se encuentra en el medio, las dispersiones de lecitina en fase lamelar (hojas planas) presentan una viscosidad aparente (a un gradiente de velocidad

constante) superior al observado para las estructuras cerradas, coincidiendo este comportamiento con lo reportado en por otros investigadores [26].

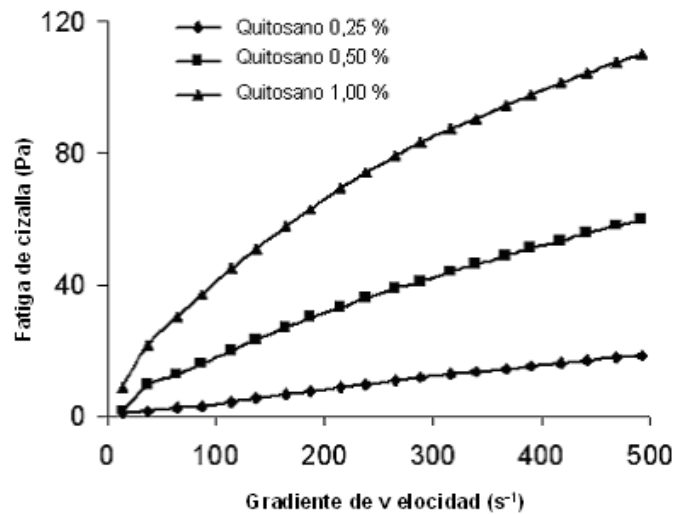


Figura 2. Fatiga de cizalla en función del gradiente de velocidad para disoluciones de quitosano de distintas concentraciones (0,25, 0,50 y 1,00 %).

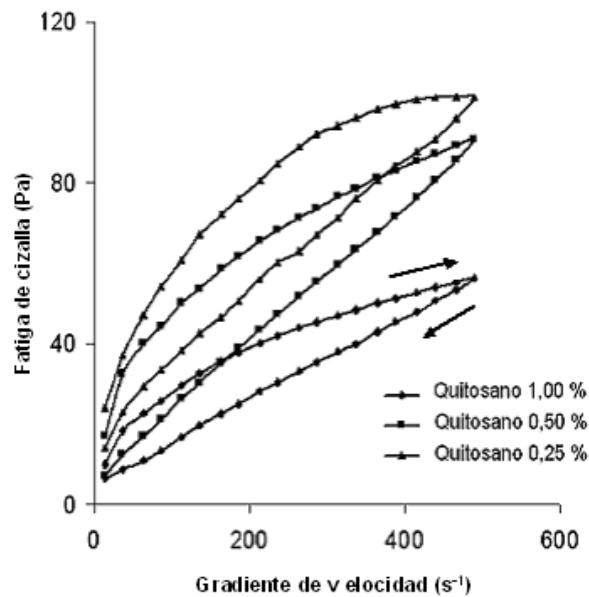


Figura 3. Fatiga de cizalla en función del gradiente de velocidad para dispersiones de lecitina (250 g/L) mezcladas con disoluciones de quitosano en distinta proporción: 2,5 g de lecitina de soja con 10 mL de disolución de quitosano al 1%; 2,5 g de lecitina de soja con 10 mL de disolución de quitosano al 0,5% y 2,5 g de lecitina de soja con 10 mL de disolución de quitosano al 0,25%. El medio acuoso fue preparado con NaCl  $10^{-5}$  M y ácido acético al 1%. Las flechas indican la secuencia de las mediciones en cada caso.

Sin embargo, cuando el quitosano se encuentra en el medio, el número de vesículas formadas se incrementa en función del contenido de quitosano, debido a lo cual la viscosidad aparente decrece conforme la concentración del biopolímero se incrementa. Este efecto se observará hasta que se complete en su totalidad la transición hoja plana-estructura cerrada; en

ese momento, se observará un incremento de la viscosidad aparente en función del aumento de la concentración de quitosano (> 1,25 % m/v de quitosano). La variación en el área del ciclo de histéresis correspondiente al comportamiento reopéctico (sin quitosano) puede ser atribuida a la segregación de las vesículas bajo cizalla (transición hoja plana-estructura cerrada); mientras que variación en el área del ciclo de histéresis correspondiente al comportamiento tixotrópico (con quitosano) se debe a la separación de las vesículas a partir de los agregados vesiculares previamente formados.

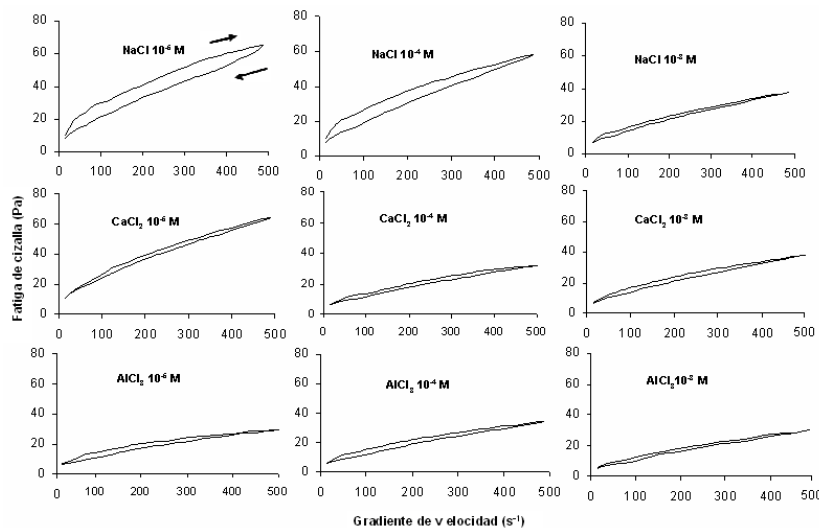


Figura 4. Fatiga de cizalla en función del gradiente de velocidad de dispersiones de lecitina de soja preparadas por hinchamiento lento bajo cizalla (2,5 g de lecitina de soja en 10 mL de disolución del electrolito en diferentes concentraciones y 0,5% de disolución de quitosano). El tipo de electrolito y la concentración usada en cada caso, se indican en la figura ( $10^{-6}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-2}$  M, respectivamente, de izquierda a derecha). Las flechas indican la secuencia de las mediciones en cada caso.

La figura que correlaciona la fatiga de cizalla en función del gradiente de velocidad para las muestras con diferentes electrolitos mostró un comportamiento tixotrópico con carácter pseudoplástico. En la Figura 4 se presenta una selección de los datos obtenidos para las dispersiones de cada electrolito utilizado y tres de sus concentraciones.

Los resultados muestran diferencias en los valores obtenidos para el área del ciclo de histéresis en función de la valencia y el tipo de electrolito. En general, el área del ciclo de histéresis tiende a decrecer cuando se da un incremento en la valencia y concentración del respectivo catión.

La Figura 5 muestra las variaciones en el área del ciclo de histéresis de las vesículas lecitina-quitosano, en función del logaritmo de la concentración del electrolito.

La variación en el área del ciclo de histéresis es muy diferente a la presentada por



dispersiones de lecitina sin quitosano [25]. Cuando el quitosano esta presente en el medio, el área del ciclo de histéresis tiende a decrecer tanto en función de la valencia del catión como de su concentración; en cambio, para las muestras sin quitosano el área del ciclo de histéresis decrece en función de la valencia del catión pero se incrementa en función de la concentración del electrolito.

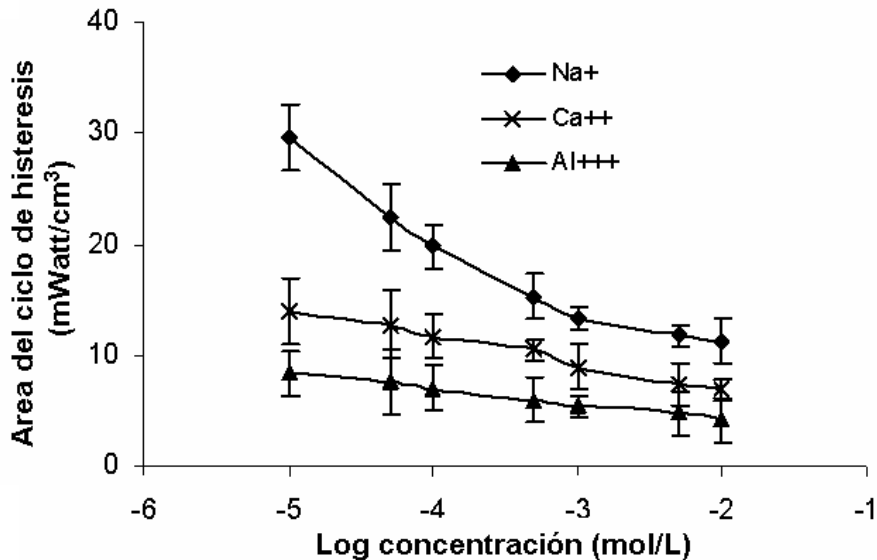


Figura 5. Variación del área del ciclo de histéresis ( $\text{mW}/\text{cm}^3$ ) de dispersiones de lecitina en función del logaritmo de la concentración del electrolito. El catión de cada electrolito empleado se indica en la figura. Las barras representan el error de dispersión generado al analizar cinco muestras en cada caso.

Estos resultados evidencian que la concentración del electrolito es determinante para la agregación y separación de las vesículas, en función de su comportamiento tixotrópico; como era de esperarse debido al efecto que ejerce el electrolito sobre la doble capa eléctrica.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos con este trabajo confirman que la adición de un biopolímero como el quitosano a dispersiones concentradas de lecitina de soja, induce la transición de la configuración de hojas planas a estructuras cerradas como vesículas. La interacción quitosano-fosfolípido provee la energía necesaria para esta transición. El número de vesículas formadas se incrementa en función de la concentración de quitosano utilizada hasta que se completa la transición hoja plana-estructura cerrada. En este proceso, el sistema mostrará un comportamiento tixotrópico contrario al comportamiento reopéctico observado para dispersiones de lecitina sin la adición del biopolímero, confirmado por una disminución en la viscosidad aparente (a un gradiente de velocidad constante). Cuando se completa la

transición, el quitosano actuará incrementando la viscosidad del sistema. El área del ciclo de histéresis correspondiente al comportamiento reopéctico (sin quitosano), se debe a la segregación de las vesículas bajo cizalla (transición hoja plana-estructura cerrada), mientras que la variación del área del ciclo de histéresis correspondiente al comportamiento tixotrópico (con quitosano), se debe a la separación de las vesículas a partir de agregados vesiculares formados previamente.

Por otra parte, la adición de un electrolito a este sistema genera una modificación significativa en el área del ciclo de histéresis en función de la concentración de electrolito, donde el área decrece conforme se incrementa la concentración o la valencia del electrolito utilizado.

**Agradecimientos.** Los investigadores desean agradecer al Ministerio de Ciencia y Tecnología (MICIT) y al Consejo para Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) de la República de Costa Rica, por el financiamiento de los proyectos de investigación y pasantías que permitieron completar este artículo.

#### BIBLIOGRAFÍA

- [1] Lipowski R, Sackmann E (editores) “*Structure and dynamics of membranes*”. Elsevier, Amsterdam (1995)
- [2] McCalden TA, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **5**, 253(1990)
- [3] Lasic D, Rosoff M (editores) “*Vesicles*”. Surface Science Series, volumen 62. Dekker, Nueva York 1996
- [4] Felgner PL, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **5**, 163(1990)
- [5] Lasic D “*Liposomes gene delivery*”. Chemical Rubber Company Press, Boca Raton. Florida (1997)
- [6] Tadros TF, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **46**, 1 (1993)
- [7] Damge C, *Diabetes Nutr. Metab.*, **8**, 3(1995)
- [8] Fukunaga M, Miller M, Deftos LJ, *Horm. Metab. Res.*, **23**, 166 (1991)
- [9] Y.Kato, *et al. Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 457 (1993)
- [10] K.Iwanaga, *J. Pharm. Sci.*, **88**, 248 (1999)
- [11] Janes KA, Calvo P, Alonso MJ, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **47**, 83 (2001)
- [12] Filipovic J, Skalko N, Jalsenjak I, *J. Microencapsul.*, **18**, 3 (2001)
- [13] H.Takeuchi, *et al. Pharm. Res.* **13** (1996) 896.
- [14] Longer MA, Ch'ng HS, Robinson JR, *J. Pharm. Sci.*, **74**, 406 (1985)
- [15] Valenta C, Janisch M, *Int. J. Pharm.*, **258**, 133 (2003)
- [16] C.Valenta, *J. Control. Release*, **77**, 323(2001)
- [17] Whiting KP, Restall CJ, Brain PF, *Life Sciences*, **67**, 743 (2000)
- [18] M.Sentjurc, K.Vrhovnik and J.Kristl, *J. Control. Release*, **59**, 87 (1999)
- [19] El Maghraby GMM, Williams AC, Barry BW, *Int. J. Pharm.*, **276**, 143 (2004)
- [20] Biruss B, Valenta C, *Eur.J.Pharm. and Biopharm.*, **62**, 210 (2006)
- [21] Gregoriadis G, *Trends. Biotechnol.*, **13**, 527 (1995)
- [22] Lasic DD, Barenholtz Y (Editores) “*Handbook of Non-Medical Applications of Liposomes*”. CRC Press (1996)
- [23] Manconi M, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **222**, 141 (2003)
- [24] Mittal KL, Lindman B (Editores) “*Surfactants in solutions*”. (Volúmenes 1-3). Plenum, Nueva York, 1984
- [25] Manconi M, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **270**, 102

(2005)

[26] Alvarez MA, *J. Colloid Interface Sci.*, **309**, 279(2007)

[27] Bhattacharya S, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **75**, 871(1998)

[28] Alonso JM, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **95**, 11 (1995)

[29] Vila AO, Rodríguez-Flores C, Figueruelo J, Molina F, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **189**, 1 (2001)

[30] Rodríguez-Flores C, Vila AO, Figueruelo J, Molina F, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **191**, 233 (2001)

[31] Molina F, Llacer C, Vila AO, Puchol A, Figueruelo F, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **140**, 91 (1998)