

NANOEMULSIONES PARA LA ENCAPSULACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

**Grisel A. Flores-Miranda¹, Eduardo San Martín-Martínez^{2*}
Miguel A. Aguilar-Méndez², Georgina Calderon-Dominguez³
Jorge Yáñez-Fernández^{1*}**

¹Departamento de Biotecnología Alimentaria, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional, Av. Acueducto S/N Col. Barrio La Laguna Ticomán, México, D.F., CP 07340, México.

^{2*}Departamento de Biomateriales, Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional, Calzada Legaria No. 694 Col. Irrigación, México, D.F., CP 11500, México.

³Departamento de Ingeniería Bioquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN. Luis Enrique Erro s/n, U. Prof, Adolfo Lopez Mateos, CP 07738, Ciudad de México, México.

grissfomi@gmail.com, esanmartin@ipn.mx, miguel_agme@hotmail.com,
gcalderondominguez@gmail.com, jyanezfe.ipn@gmail.com

<https://doi.org/10.3926/oms.401.2>

Flores-Miranda, G. A., San Martín Martínez, E., Aguilar-Méndez, M. A., Calderon-Dominguez, G., & Yáñez-Fernández, J. (2020). Nanoemulsiones para la encapsulación de compuestos bioactivos. En E. San Martín Martínez, M. A. Ramírez Salinas (Eds.). *Avances de investigación en Nanociencias, Micro y Nanotecnologías*. Barcelona, España: OmniaScience. 45-66.

Resumen

Las nanoemulsiones, los liposomas, las microemulsiones, las nanopartículas lipídicas sólidas y las partículas poliméricas son nanoestructuras que podrían mejorar la estabilidad y la biodisponibilidad de muchos compuestos bioactivos. La metodología de superficie de respuesta (RSM) se utilizó para investigar la función de las diferentes condiciones de procesamiento que afectan el tamaño de partícula de las nanoemulsiones de ácido esteárico preparadas mediante el método de emulsificación por ultrasonido. Se estudiaron los efectos de la concentración de lípidos (4-7 %), la concentración de surfactante (0.1-2.0 %) y el tiempo de sonicación (15-30 min) en el tamaño de partícula. Los datos experimentales podrían ajustarse adecuadamente en una ecuación polinomial de segundo orden con un coeficiente de regresión (R^2) de 0.882. El tiempo de sonicación constituyó el factor principal que influye en la variable de respuesta. Aumento del tiempo de sonicación incrementa el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad. La concentración de emulsificante se observó estar inversamente relacionada con el tamaño de partícula. Las condiciones óptimas con el fin de obtener el menor tamaño de partícula en la preparación de nanoemulsiones de ácido esteárico, se estimó a: 4,08 % para la concentración de lípidos y 1,22 % para el contenido de surfactante, empleando un tiempo de sonicación de 19,18 min, obteniendo un tamaño de partícula de 198,46 nm. Se observó que la morfología de las gotitas de nanoemulsiones tenía la forma casi esférica, observado mediante microscopía electrónica de transmisión (Cryo - TEM).

Palabras claves: Metodología de Superficie de Respuesta; Nanoemulsiones de aceite en agua; Acido esteárico; Método ultrasónico; Nano Zetasizer.

1. Introducción

Las nanoemulsiones son dispersiones que típicamente presentan diámetros en el rango de 50 a 1000 nm y con frecuencia se conocen como mini emulsiones, emulsiones finamente dispersas o emulsiones submicrométricas [1]. Las nanoemulsiones consisten en una fase lipídica dispersa en una fase acuosa continua, con cada gota de aceite rodeada por una delgada capa interfacial que consiste en moléculas emulsificantes [2-4]. Por lo general, las nanoemulsiones son altamente estables a la separación gravitacional debido al tamaño de partícula relativamente pequeño, lo que significa que los efectos del movimiento browniano dominan las fuerzas gravitacionales y previenen la formación del cremado o sedimentación durante un tiempo prolongado de almacenamiento [5]. También tienen una buena estabilidad contra la agregación de las gotitas debido a que el rango de fuerzas atractivas que actúan entre las emulsiones disminuye con la disminución del tamaño de partícula, también el intervalo de repulsión estérica es menos dependiente [6]. Estas ventajas potenciales de las nanoemulsiones sobre las emulsiones convencionales las convierten en sistemas atractivos para su aplicación en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica, una vez que pueden actuar como sistemas de transporte o suministro de compuestos lipofílicos, como nutracéuticos, fármacos, sabores, antioxidantes y agentes antimicrobianos [7, 12].

En la actualidad, ha aumentado el interés de incorporar lípidos en nanoemulsiones de agua, debido a las ventajas de estos materiales lipídicos en comparación con otros, por su biocompatibilidad y biodegradación [13]. Además, se ha considerado como una estrategia para evitar la auto oxidación de lípidos, que generalmente implica una transición de fase [14, 15]. El ácido esteárico es un ácido graso saturado endógeno de cadena larga y un componente principal de las grasas tanto de origen animal como vegetal, proporcionando una mejor biocompatibilidad y menor toxicidad que las contrapartes sintetizadas [16]. El ácido esteárico tiene un punto de fusión más alto que la temperatura corporal (p.f. 69.6 °C), y es biocompatible con los tejidos humanos y neutral con respecto a los fluidos fisiológicos. El ácido esteárico, lípido utilizado en este estudio, se considera no tóxico y está clasificado como 'Generalmente Reconocido como Seguro' (GRAS) por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) [13].

Se han desarrollado varios métodos para preparar emulsiones en la escala nanométrica, que se clasifican como métodos de alta energía o de baja energía [17]. La emulsificación ultrasónica es un método de alta energía en la preparación de gotas emulsionadas a escala nanométrica [18]. Este método está documentado como una técnica rápida y eficiente para formular nanoemulsiones estables con un diámetro

de gota muy pequeño y un índice de polidispersidad bajo [19]. Utiliza ondas de sonido con una frecuencia superior a 20 kHz utilizando un sonotrodo para provocar vibraciones mecánicas seguidas de la formación de la cavitación acústica. El colapso de estas cavidades genera potentes ondas de choque que rompen las gotas gruesas en el rango nanométrico [20]. Hoy en día, estudios que sugieren que en el proceso de emulsificación, la cavitación asistida por ultrasonido parece ser más competitiva o incluso superior en términos de tamaño de partícula y eficiencia energética, en comparación con otros homogeneizadores rotacionales típicos, además de ser más rentable y práctica en términos del costo de producción a escala, la facilidad de mantenimiento y el procesamiento aséptico comparado con un microfluidizador [4, 21, 22]. El tamaño de partícula de la nanoemulsión puede controlarse optimizando los parámetros del proceso, como el contenido de aceite, la concentración de emulsionante, el tiempo de emulsificación y la energía proporcionada [23, 24].

En estas situaciones, cuando varios factores e interacciones de los factores afectan los resultados, La Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) es una herramienta efectiva para optimizar el proceso; es una colisión de técnicas estadísticas y matemáticas que resultan del ajuste de los modelos empíricos a los datos obtenidos de los experimentos y se utiliza para la mejora y la optimización del proceso [25, 26]. Al usar esta herramienta estadística, podemos optimizar simultáneamente los niveles de variables independientes para la formulación del producto y la optimización del proceso; y la principal ventaja de RSM es reducir el número de ensayos experimentales necesarios para evaluar múltiples variables y sus interacciones. Por lo tanto, es menos laborioso y lleva menos tiempo que otras técnicas necesarias para optimizar un proceso [27-29].

Esta técnica se ha utilizado para diferentes procesos de optimización en sistemas de nanoemulsiones alimentarias y farmacéuticas [25, 26, 30, 31].

El objetivo principal de este trabajo, utilizando RSM, fue formular una nueva nanoemulsión de ácido esteárico con ingredientes GRAS para evaluar simultáneamente los efectos principales y los efectos de interacción entre los factores que incluyen el contenido de lípidos y surfactantes y el tiempo de sonicación en las propiedades fisicoquímicas de las nanoemulsiones de ácido esteárico. El estudio será útil en la industria de alimentos y bebidas para diseñar un sistema coloidal estable para la entrega de componentes bioactivos lipofílicos en los alimentos.

2. Materiales y métodos

2.1 Reactivos químicos

El ácido esteárico se usó como núcleo lipídico ($C_{18}H_{36}O_2$; PM = 284,5; p.f. = 69 ° C) y se adquirió en Sigma-Aldrich, EE. UU. El agente tensoactivo de calidad alimentaria fue Tween® 80 ($C_{64}H_{124}O_{26}$; polioxietilen (20) monooleato de sorbitán, no iónico; HLB = 15,0), se adquirió en Sigma-Aldrich, EE. UU. Se usó agua ultrapura de un sistema Milli-Q en la preparación de todos los experimentos a lo largo del estudio.

2.2 Diseño compuesto central

Se utilizó un Diseño Central Compuesto (CCD) para determinar los efectos de variables independientes: concentración de ácido esteárico (4.0-7.0 %, X_1), concentración de Tween 80 (0.1-2.0 %, X_2) y tiempo de sonicación (15-30 min, X_3), así como sus interacciones en el tamaño de partícula (Y) de las nanoemulsiones de ácido esteárico. Por lo tanto, se generaron un total de 20 corridas experimentales basadas en el CCD, determinados por el uso del software Design-Expert versión 7.1.6 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, EE. UU.). Con tres variables independientes en cinco niveles para cada variable que implica 8 puntos factoriales, 6 puntos axiales y 6 réplicas de puntos centrales. Los experimentos se llevaron a cabo en orden aleatorio para minimizar los efectos de la variabilidad inexplicada en las respuestas reales debido a factores extraños [32]. Las variables independientes, sus niveles codificados y el esquema de CCD se enumeran en la Tabla 1 y 2, respectivamente.

Se utilizó una ecuación polinómica de segundo orden para expresar el tamaño de partícula (Y) de las nanoemulsiones en función de las variables independientes de la siguiente manera.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i_j < i_1}^k \beta_{ij} X_i X_j + \epsilon \quad (1)$$

Donde Y representa la función de respuesta, β_0 es la media general, β_i , β_{ii} y β_{ij} son los coeficientes de los términos lineales, cuadráticos e interactivos, respectivamente. En consecuencia, X_i y X_j representan las variables independientes codificadas, mientras que ϵ es el error. El método de mínimos cuadrados (MLS) se empleó para analizar y ajustar todos los datos experimentales en la ecuación

Tabla 1. Niveles de variables establecidas independientes basadas en un diseño compuesto central (CCD).

Variables Independientes	Unidades	Niveles Codificados				
		-1	0	+1	Axial (- α)	Axial (+ α)
Ácido Esteárico (X_1)	% p/p	4.0	5.5	7.0	2.98	8.02
Tween 80 (X_2)	% p/p	0.1	1.05	2.0	0.54	2.65
Tiempo de sonicación(X_3)	min	15	22.5	30	9.89	35.11

Tabla 2. Esquema de un diseño compuesto central (CCD): independiente (X_i) y variable de respuesta (Y_j).

Formulación	Variables			Tamaño de partícula (nm)		Índice de polidispersidad
	X_1	X_2	X_3	Valores experimentales	Valores predichos	
F1	7.00	0.10	15.00	356.30 \pm 1.35 ^e	384.61	0.125 \pm 0.04 ^h
F2	4.00	2.00	15.00	270.10 \pm 5.21 ^{fgh}	298.41	0.131 \pm 0.02 ^h
F3	7.00	0.10	30.00	372.47 \pm 4.02 ^{de}	388.30	0.195 \pm 0.03 ^{gh}
F4	2.98	1.05	22.50	238.13 \pm 45.04 ^h	206.91	0.603 \pm 0.05 ^{bc}
F5	4.00	2.00	30.00	354.90 \pm 17.25 ^e	370.73	0.678 \pm 0.08 ^{ab}
F6	5.50	1.05	35.11	497.53 \pm 85.88 ^{bc}	481.15	0.597 \pm 0.02 ^{bc}
F7	8.02	1.05	22.50	469.73 \pm 54.59 ^c	438.51	0.581 \pm 0.12 ^{bc}
F8	7.00	2.00	15.00	277.07 \pm 37.36 ^{fgh}	305.38	0.502 \pm 0.05 ^{cd}
F9	5.50	1.05	9.89	325.27 \pm 4.51 ^{ef}	279.21	0.297 \pm 0.03 ^{fg}
F10	4.00	0.10	30.00	775.47 \pm 18.97 ^a	791.30	0.441 \pm 0.06 ^{de}
F11	5.50	0.55	22.50	555.30 \pm 75.39 ^b	356.16	0.750 \pm 0.06 ^a
F12	7.00	2.00	30.00	244.23 \pm 4.36 ^{gh}	260.06	0.366 \pm 0.02 ^{ef}
F13	4.00	0.10	15.00	313.37 \pm 32.02 ^{efg}	341.68	0.365 \pm 0.02 ^{ef}
F14	5.50	2.65	22.50	432.87 \pm 17.29 ^{cd}	401.65	0.440 \pm 0.07 ^{de}
*F15	5.50	1.05	22.50	321.31 \pm 52.46 ^{ef}	323.10	0.429 \pm 0.15 ^{de}

X_1 : concentración de ácido esteárico, X_2 : concentración de Tween 80, X_3 : tiempo de sonicación. Los datos de la variable de respuesta representan el promedio \pm desviación estándar para cada muestra. Diferentes letras de superíndice en la misma columna indican significación estadística ($p < 0.05$) según la prueba diferente menos significativa de Duncan. * Promedio de seis réplicas en el punto central.

polinomial de segundo orden. Se obtuvo un modelo reducido al eliminar los términos no significativos ($p < 0,05$) del modelo inicial. Superficies de respuesta en 3D se generaron a través de las ecuaciones polinómicas de regresión ajustadas para visualizar mejor el efecto de interacción de las variables independientes en la respuesta. Se realizó una optimización numérica para obtener condiciones óptimas y predecir valores para los objetivos de respuesta deseables utilizando un optimizador de respuesta.

2.3 Preparación de nanoemulsiones de ácido esteárico por cavitación ultrasónica

Las nanoemulsiones se prepararon usando ácido esteárico como fase oleosa dispersa y agua Milli Q como fase acuosa continua. El lípido se fundió primero aproximadamente a 70 °C, la fase oleosa resultante se añadió luego a una fase acuosa que contenía Tween 80 como emulsionante para formar emulsiones, y posteriormente se llevó a cabo un proceso de homogeneización usando un Ultra-Turrax T-25 (IKA, Alemania) a 10.000 rpm durante 2 min. Las emulsiones gruesas premezcladas se sometieron a continuación a una segunda etapa de tratamiento con ultrasonido mediante el procesador ultrasónico GEX500 (Sonics & Materials Inc., EE. UU.). Al principio, la punta de la sonda con un diámetro de 13 mm se sumergió en el centro de la emulsión gruesa y las vibraciones ultrasónicas mecánicas en el sonotrodo se ajustaron a un 40 % de amplitud operativa para iniciar el proceso de emulsificación, diferentes tiempos de emulsificación se realizaron de acuerdo a la Tabla 2, y todas las emulsiones formadas fueron del tipo de aceite en agua. La sonda Sonicator, generó fuerzas disruptivas que redujeron el diámetro de la gota convirtiendo la emulsión gruesa en nanoemulsión. El calor, que se genera durante el proceso de emulsificación mediante un método de alta energía como la emulsión ultrasónica, se reduce al colocar el recipiente en baño con hielo. Finalmente, se caracterizaron las nanoemulsiones formuladas.

2.4 Caracterización fisicoquímica de la nanoemulsión

2.4.1 Medición de pH y conductividad

Los valores de pH de las dispersiones recién preparadas se midieron usando un medidor de pH (510 pH Oakton, Malasia). La conductividad se midió utilizando el mismo equipo con un electrodo de plástico conductor calibrado con solución de KCl 0,01 M siendo la conductividad específica (K) de $1413 \mu\text{v cm}^{-1}$ a 25 ± 1 °C.

2.4.2 Índice de blancura

El color de las nanoemulsiones se midió con un colorímetro Minolta CR-10 (Konica Minolta Sensing, Inc., Osaka, Japón) a temperatura ambiente. Se determinaron los valores CIE L^* , a^* , y b^* , y se calculó el índice de blancura (IB) con Eq. 2 [33].

$$IB = 100 - ((100 - L)^2 + (a^2 + b^2))^{0.5} \quad (2)$$

2.5 Medida del tamaño de partículas y del índice de polidispersidad (PDI)

El tamaño medio de partícula (Z-average) y el Índice de Poli Dispersividad (PDI) de las nanoemulsiones generadas se analizaron mediante Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido) a una longitud de onda de 633 nm y un ángulo de dispersión de 173° a 25 °C. El valor del diámetro promedio, se conoce como el diámetro hidrodinámico promedio ponderado de intensidad armónica de las emulsiones y se consideró como tamaño de partícula medio, mediante dispersión de luz dinámica (DLS), que mide el movimiento browniano de las partículas. El movimiento browniano depende del tamaño de partícula y la viscosidad del agente dispersante. Las muestras se prepararon diluyendo todas las nanoemulsiones generadas con agua Milli-Q. La dilución de las emulsiones se realiza para purgar el efecto de viscosidad que surge debido a los ingredientes (surfactante) y minimizar los múltiples efectos de dispersión. Todas las mediciones se realizaron por triplicado. El PDI fue una medida adimensional de la distribución de tamaño calculado a partir del análisis acumulativo que va de 0 a 1. Un pequeño valor de PDI indica una población monodispersa mientras que un PDI grande indica una distribución más amplia del tamaño de partícula.

2.6 Potencial Zeta (ZP)

La carga eléctrica presente en la superficie de la partícula es un parámetro útil para predecir la estabilidad física de los sistemas coloidales y se midió utilizando un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido). Las muestras se diluyeron con agua Milli-Q antes de la medición. Las muestras se inyectaron en una celda capilar plegada para la medición de la carga. Los valores de ZP proporcionan información sobre las fuerzas de repulsión o atracción entre partículas en la emulsión.

2.7 Crio - Microscopía Electrónica de Transmisión (Cryo-TEM)

Cryo-TEM se hizo con el fin de confirmar el tamaño de partícula y caracterizar la forma y estructura de las nanoemulsiones. Las muestras se congelaron con un Cryoplunge 3 - Cp3 (Gatan, Inc. EE.UU.). La cámara ambiental fue operada a 25 °C y con un 73 % de humedad relativa. Las muestras se diluyeron en la proporción de 10 µL de muestra y 990 µL de agua destilada. Se aplicó una gotita de la nanoemulsión sobre una rejilla recubierta de carbón Holey. Después de 30 s, la suspensión se secó durante 4,0 s con papel de filtro Whatman N° 1 utilizando el instrumental, sensor de borrado e inmediatamente se sumergió en etano líquido justo por encima de su punto de congelación (-183 °C). Las muestras vitrificadas se visualizaron a temperatura de nitrógeno líquido en un microscopio electrónico de transmisión JEM-2100 (JEOL, EE. UU.) Operado a 80 kV, y para evitar la recristalización del hielo vítreo, la etapa fría se mantuvo a menos de -170 °C durante la observación. Las micrografías adquirieron a una ampliación nominal de 25,000x en un desenfoque de -5760 nm y se capturaron con una cámara UltraScan XP.

2.8 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando SAS (Statistical Analysis System Version 9.0). Se aplicó el análisis de varianza unidireccional (ANOVA) para determinar la importancia de las diferencias entre los ensayos. Se aplicó una prueba de Duncan media comparativa ($p < 0,05$) para establecer la importancia de las diferencias entre cada grupo.

3. Resultados y discusión

3.1 pH, conductividad eléctrica y tensión superficial

La caracterización fisicoquímica incluyó medidas de pH, conductividad y índice de blancura de todas las nanoemulsiones formuladas (Tabla 3). Los resultados mostraron que los valores de pH de las formulaciones recién preparadas disminuyeron a medida que aumentaba la proporción de ácido esteárico en las formulaciones (gráfico 3). El análisis de varianza muestra diferencias significativas ($p < 0.05$) en todas las muestras de emulsión.

La conductividad eléctrica de las nanoemulsiones se midió para determinar el sistema de fase (o/w o w/o). Las nanoemulsiones de aceite en agua son altamente

conductoras porque el agua es la fase continua que permite una mayor libertad de movilidad de los iones. Por otro lado, el agua en los sistemas de aceite, donde el agua está en la fase interna, es menos conductora [1, 34, 35, 36]. A partir de los valores de conductividad del Gráfico 3, las formulaciones de nanoemulsión se detectaron como nanoemulsiones de aceite en agua, en consecuencia, este parámetro se vio afectado de forma inversa por la concentración de aceite.

Los datos del índice de blancura, indicados en la Tabla 3, presentaron valores que van desde 68.13 a 73.71. Por ejemplo, la formulación F13 mostró el valor más bajo y F14 el valor más alto. Estos resultados también se observaron mediante examen visual que muestra todas las nanoemulsiones en un aspecto lechoso blanco como se puede ver en la Figura 1. Sin embargo, las mediciones de WI son significativamente diferentes ($p < 0,05$) dependiendo de la concentración de lípidos y tensioactivos empleados en su preparación. La apariencia de la emulsión está determinada principalmente por la presencia de concentración de aceite y tamaño de partícula, por lo tanto, parámetros tales como el índice de refracción de fase continua y dispersa influyen directamente en las propiedades ópticas de la emulsión [37, 38]. El aspecto óptico de las nanoemulsiones es un factor importante a tener en cuenta para el desarrollo de nuevos productos. De esta manera, las nanoemulsiones de ácido esteárico podrían ser adecuadas para incorporar en productos alimenticios lácteos.

3.2 Ajuste del modelo de superficie de respuesta

Los valores de tamaño de partícula de las nanoemulsiones de ácido esteárico obtenidas de todos los experimentos se muestran en la Tabla 2. Los datos experimentales se usaron para calcular los coeficientes de la ecuación polinómica de segundo orden (Ec 3), que se usaron para predecir los valores del tamaño de las partículas. Los valores predichos por el modelo estuvieron de acuerdo con los resultados experimentales obtenidos a partir del diseño de RSM (Tabla 2).

(3)

$$Y = 124.40116 - 105.47138X_1 - 1388.04743X_2 + 56.32726X_3 + 377.35753X_1 X_2 - 10.29352X_1 X_3 - 28.59719X_2 X_3 + 23.27982X_1^2 + 570.02228X_2^2 + 0.35878X_3^2 + 3.83965X_1 X_2 X_3 - 22.22928X_1^2 X_2 - 93.68520X_1 X_2^2$$

Dónde: Y es el tamaño de partícula (nm); X1, X2, X3 son ácido esteárico y concentración de Tween 80, respectivamente, y X3 es el tiempo de sonicación.

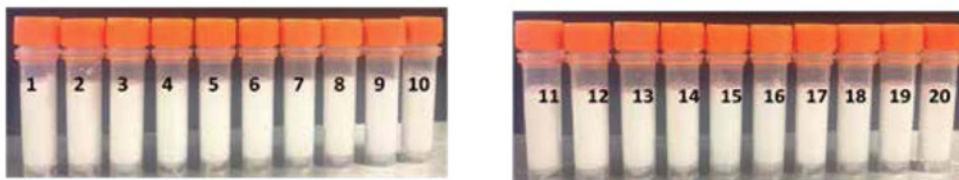


Figura 1. Aspecto óptico de las nanoemulsiones de ácido esteárico.

Tabla 3. Caracterización fisicoquímica de nanoemulsiones de ácido esteárico.

Formulación	pH	Conductividad eléctrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Índice de blancura
F1	5.18 ± 0.01^c	34.13 ± 0.06^a	70.22 ± 0.06^g
F2	4.84 ± 0.02^g	26.73 ± 0.31^g	72.97 ± 0.01^d
F3	5.04 ± 0.03^e	14.90 ± 0.10^m	69.26 ± 0.06^h
F4	4.88 ± 0.03^f	28.70 ± 0.20^e	72.98 ± 0.06^d
F5	4.19 ± 0.02^k	23.40 ± 0.20^h	72.30 ± 0.17^e
F6	4.24 ± 0.02^j	19.37 ± 0.15^k	72.39 ± 0.17^e
F7	4.25 ± 0.02^j	20.03 ± 0.25^j	72.85 ± 0.10^d
F8	4.00 ± 0.01^l	20.97 ± 0.15^i	73.18 ± 0.06^c
F9	4.85 ± 0.02^{fg}	31.07 ± 0.15^c	71.97 ± 0.09^f
F10	5.11 ± 0.01^d	18.40 ± 0.10^l	69.26 ± 0.06^h
F11	5.24 ± 0.02^b	19.47 ± 0.15^k	68.61 ± 0.05^i
F12	4.41 ± 0.02^i	32.00 ± 0.17^b	73.36 ± 0.11^b
F13	5.29 ± 0.02^a	13.00 ± 0.16^n	68.13 ± 0.05^j
F14	4.63 ± 0.02^h	29.80 ± 0.10^d	73.54 ± 0.05^a
*F15	4.64 ± 0.03^h	27.34 ± 0.44^f	73.28 ± 0.13^{bc}

Los valores experimentales son la media \pm desviación estándar de cada muestra ($n=3$). Medias con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$) de acuerdo a la prueba de Duncan. *Promedio de las 6 repeticiones en el punto central.

El análisis de varianza (ANOVA) mostró que el modelo polinómico cúbico resultante fue significativo, con una probabilidad de 0.03 % y representaba adecuadamente los datos experimentales con un coeficiente de determinación de 0.8820 (R^2). El coeficiente de determinación obtenido mostró que más del 88 % de la variación de respuesta en el tamaño de partícula podría describirse mediante el modelo RSM como la función de las principales variables de preparación de

la nanoemulsión, y solo el 12 % de la variabilidad debe ser resultado de valores atípicos no contabilizados (cambios en el comportamiento del sistema, error humano, error de instrumentación, o simplemente a través de la desviación natural de una situación estándar) [39]. Este modelo también mostró una falta de ajuste estadísticamente no significativa ($P = 0.4539$) para el modelo final reducido. Esto indica que el modelo de polinomio cúbico obtenido fue adecuado para describir la influencia de las variables independientes estudiadas sobre el tamaño de partícula de las nanoemulsiones de ácido esteárico. Los valores de la probabilidad a menudo se utilizan para verificar el significado de cada uno de los coeficientes de regresión de una ecuación polinomial. Para cualquiera de los términos en el modelo, un gran valor F y un pequeño valor P indicarían un efecto más significativo en la variable de respuesta [40]. Por lo tanto, la variable con el mayor efecto sobre el tamaño de partícula de las nanoemulsiones de ácido esteárico fue el término lineal del tiempo de sonicación, seguido del término lineal de la concentración de ácido esteárico.

3.3 Análisis de superficie de respuesta

Para obtener una mejor comprensión de los efectos de interacción de las variables sobre el tamaño de partícula, se trazaron gráficos de superficie tridimensionales frente a dos variables independientes (ácido esteárico y concentración de Tween 80), mientras que otra variable (tiempo de sonicación) se mantuvo en su nivel (-1) inferior, (0) central y (+) superior. Los diagramas de contorno y superficie de la respuesta calculados (tamaño de partícula) para las interacciones entre las variables se presentan en la Figura 2A-C.

Como se ve en la Figura 2A, el aumento en el contenido de tensioactivo da como resultado una reducción del tamaño de partícula de las nanoemulsiones. De hecho, Mehmood [41] y Polychniatou y Tzia [42] señalaron que con el aumento de la concentración de surfactante, el tamaño de partícula disminuyó debido a sus efectos sobre la tensión interfacial de la mezcla aceite-agua. Rebolleda et al. [43] también estudió el efecto del contenido de surfactante en el tamaño de partícula. Afirmaron que un aumento del contenido de surfactante entre 1-7 % (p / p) da como resultado un tamaño de partícula más pequeño y podría explicarse por el papel del surfactante en la emulsión, ya que su concentración determina el área superficial total de la gotita, la velocidad de difusión y los fenómenos de adsorción en el surfactante sobre las gotitas recién formadas. Sin embargo, un contenido excesivo de tensioactivo puede conducir a una menor velocidad de difusión de los tensioactivos que puede dar lugar a un efecto opuesto, la coalescencia de las gotas de la emulsión [30].

La Figura 2A-B demuestra que el tamaño de partícula aumenta con la concentración de ácido esteárico. Varios autores informaron el mismo comportamiento para la investigación de la fase oleosa sobre emulsificación ultrasónica [26, 31]. Este efecto se debe probablemente a un aumento en la fase oleosa, el proceso de disrupción de las gotas se vuelve más difícil debido a un aumento en la viscosidad de la fase dispersa que conduce a un aumento en la resistencia al flujo y por lo tanto la tasa de ruptura de gotitas es severamente restringido [22, 44].

El tiempo de ultrasonido es un parámetro importante relacionado con el equilibrio termodinámico en un sistema de nanoemulsión o/w y afecta la velocidad de adsorción de los surfactantes en la superficie de las gotitas y la distribución del tamaño de partícula de las gotitas recién formadas. En el presente estudio, el tamaño de partícula de las nanoemulsiones depende del tiempo de sonicación ya que el término lineal tiene un efecto principalmente significativo ($p < 0.05$). En tiempos de sonicación más bajos (Figura 2A), el tamaño de partícula permanece bajo, pero a tiempos de sonicación más altos (Figura 2C) se observó un aumento significativo en el tamaño de partícula. En la mayoría de los casos, el aumento de la amplitud ultrasónica o el tiempo de irradiación generalmente dieron como resultado una reducción en el tamaño medio de partícula. En este caso, los resultados indican claramente que al aumentar el tiempo de ultrasonido se produjo un aumento en el tamaño de partícula. Este comportamiento ha sido descrito en la literatura por varios trabajos [30, 31, 43, 45, 46]. Esto podría atribuirse al efecto del procesamiento excesivo de la emulsificación, que conduce a la coalescencia de las gotitas [18]. Otra explicación posible se debe a un mayor tiempo de irradiación ultrasónica, se generan turbulencias locales intensas y un campo de flujo de cizalladura en las proximidades de la sonda de micropunta y esta mayor fuerza turbulenta promueve una mayor tasa de colisión entre las gotitas. Por lo tanto, las gotas vecinas adyacentes a la región de las fuerzas de radiación acústica tienden a unirse y formar gotas de emulsión más grandes, lo que resulta en un aumento del tamaño de partícula [31].

Las gráficas de perturbación muestran el efecto de cada uno de los factores en un punto particular en el área del diseño de superficie de respuesta. En la Figura 3 se observa que los factores A (ácido esteárico) y C (tiempo de sonicación) tienen un efecto más pronunciado que el factor B (Tween 80) sobre el tamaño de partícula. Estudios previos ya han demostrado la influencia del tiempo de sonicación en el tamaño de partícula [31, 43].

La función de conveniencia (desirability) del método es ampliamente usada para la optimización de procesos con una o múltiples respuestas. El software Design Expert determina las condiciones que proporcionan la respuesta más conveniente dentro de los límites establecidos. Las selecciones de condiciones

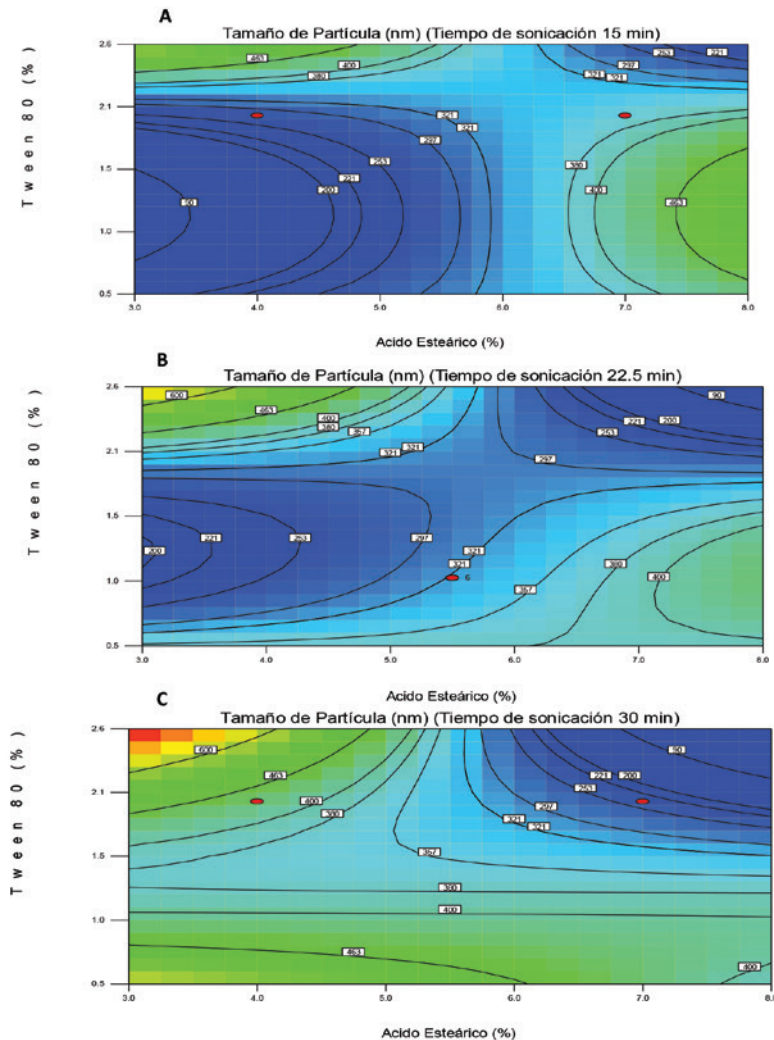


Figura 2. Gráficas de curvas de nivel mostrando el efecto de la concentración de ácido esteárico y Tween 80 sobre el tamaño de partícula de las nanoemulsiones de ácido esteárico a diferentes tiempos de sonicación.

óptimas se realizaron sobre la base de la función de deseabilidad. Los niveles de ingredientes óptimos combinados para la respuesta con la deseabilidad máxima (1.0) fueron 4.08 % para la concentración de ácido esteárico, 1.22 % para Tween 80 y 19.18 minutos de tiempo de sonicación. Sivakumar et al. [50] describen que un valor de deseabilidad diferente de cero implica que todas las respuestas están simultáneamente dentro de un rango deseado, y para un valor de conveniencia igual a 1 la combinación de diferentes criterios es óptima. La respuesta (tamaño de partícula) a este nivel fue de 198,46 nm (Figura 4).

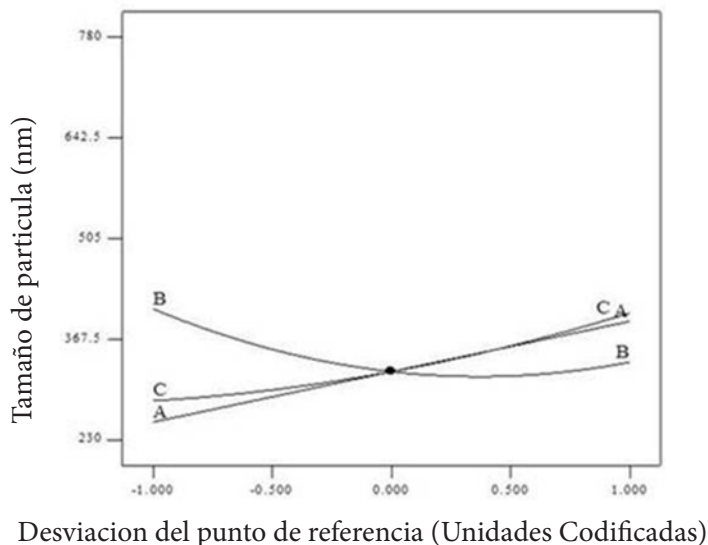


Figura 3. Gráfica de perturbación mostrando el efecto de las variables (A) concentración de ácido esteárico, (B) concentración de Tween 80 y (C) tiempo de sonicación sobre el tamaño de partícula de nanoemulsiones de ácido esteárico.

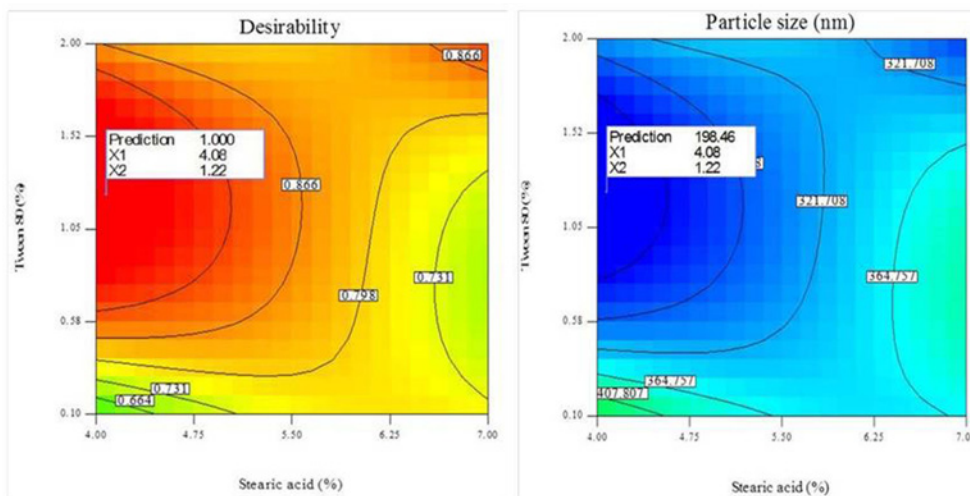
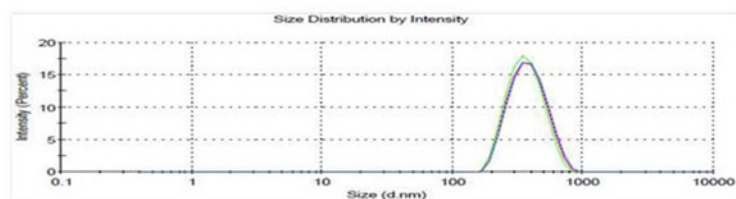


Figura 4. Gráficas de conveniencia representando los valores predichos para obtener el tamaño mínimo de partícula generada por el programa Design-Expert. Los contornos del verde a rojo indican el mínimo al máximo del valor de conveniencia y los contornos del verde al azul indican el mínimo al máximo del tamaño de partícula de las nanoemulsiones de ácido esteárico. En el recuadro se observan las concentraciones de proceso óptimas predichas para la concentración de ácido esteárico (X_1) y la concentración de Tween 80 (X_2).

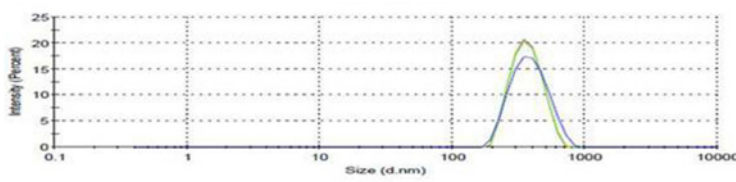
3.4 Índice de polidispersidad (PDI)

El PDI es una medida adimensional de la amplitud de la distribución del tamaño de partícula y caracteriza la dispersión de los sistemas respecto a la desviación a partir del tamaño promedio, este puede variar entre 0 - 1. Los valores bajos de PDI indican una distribución monodispersa mientras que grandes valores de PDI indican una amplia distribución del tamaño de partícula. Los valores de este parámetro deben ser lo más bajos posible para lograr una mayor estabilidad de las nanoemulsiones a largo plazo [31].

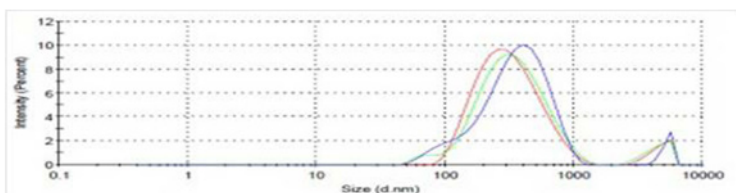
Los valores de PDI obtenidos en este trabajo estuvieron entre 0.125 a 0.750 (Tabla 2). En este caso las muestras con valores de PDI mayores a 0.5 presentan una distribución amplia de tamaño de partícula.



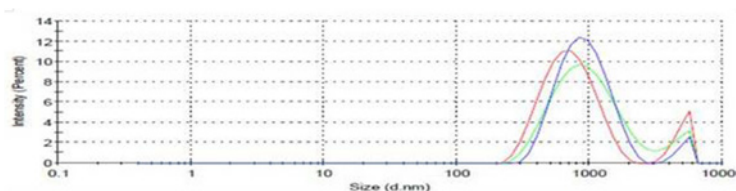
A) 7.0% ácido esteárico
0.1% Tween 80
15 min tiempo de sonicación
PDI: 0.125



B) 7.0% ácido esteárico
0.1% Tween 80
30 min tiempo de sonicación
PDI: 0.195



C) 4.0% ácido esteárico
0.1% Tween 80
15 min tiempo de sonicación
PDI: 0.365



D) 4.0% ácido esteárico
0.1% Tween 80
30 min tiempo de sonicación
PDI: 0.441

Figura 5. Gráficas de distribución de tamaño de partícula expresadas en intensidad para las nanoemulsiones de ácido esteárico seleccionadas.

En la Figura 5 se presentan las gráficas de distribución de tamaño mostrando el efecto de la concentración de ácido esteárico y el tiempo de sonicación, siendo este último el principal factor que afecta este parámetro. Se observaron valores bajos de PDI en tiempos de sonicación bajos (Figuras 5A y B). El aumento del tiempo de ultrasonido llevaría a un aumento en PDI (Figuras 5C y D) porque promueve una alta tasa de coalescencia que da como resultado un gran tamaño de partícula, este fenómeno contribuyó a un alto índice de polidispersidad. No existen suficientes estudios que reporten el efecto del proceso ultrasónico sobre el PDI. Sin embargo, a manera de comparación algunas investigaciones previas empleando la emulsificación a alta presión han reportado que un incremento en la presión de homogeneización resultó en un aumento del PDI de las nanoemulsiones preparadas [32, 47-49].

Agradecimientos

Grisel Adriana Flores-Miranda reconoce a CONACyT-México (Beca 296035) por la beca de Doctorado. Los autores agradecen al Instituto Politécnico Nacional, por su apoyo a la investigación realizada en este artículo (Proy. SIP: 20160241 y 2017053). Nos gustaría expresar nuestra gratitud al Dr. Raul Borja-Urby en CNMN-IPN por su valiosa ayuda para lograr la microscopía electrónica Cryo-Transmission (Cryo-TEM).

Referencias

1. Bhosale, R. R., Osmani, R. A., Ghodake, P. P., Shaikh, S. M., & Chavan, S.R. (2014). Nanoemulsion: A Review on Novel Profusion in Advanced Drug Delivery. *Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research*, 2(1), 122.
2. Acosta, E. (2009). Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 14(1), 3-15. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2008.01.002>
3. McClements, D. J., Decker, E.A., & Weiss, J. (2007). Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *Journal of Food Science*, 72(8), R109-R124. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00507.x>
4. Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., Solans, C. (2004). Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108, 303-318. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.023>

5. Ghosh, V., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2014). Optimization of Process Parameters to Formulate Nanoemulsion by Spontaneous Emulsification: Evaluation of Larvicidal Activity Against *Culex quinquefasciatus* Larva. *BioNanoScience*, 4(2),157-165. <https://doi.org/10.1007/s12668-014-0131-z>
6. McClements, D.J. (2004). *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. CRC Press.
7. Hu, J., Johnston, K. P., & Williams III, R. O. (2004). Nanoparticle engineering processes for enhancing the dissolution rates of poorly water soluble drugs. *Drug development and Industrial Pharmacy* 30(3), 233-245. <https://doi.org/10.1081/DDC-120030422>
8. Kesisoglou, F., Panmai, S., Wu, Y. (2007). Application of nanoparticles in oral delivery of immediate release formulations. *Current Nanoscience*, 3(2),183-190. <https://doi.org/10.2174/157341307780619251>
9. Sanguansri, P., & Augustin, M. A. (2006). Nanoscale materials development-a food industry perspective. *Trends in Food Science & Technology*, 17(10), 547-556. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.04.010>
10. Weiss, J., Decker, E. A., McClements, D. J., Kristbergsson, K., Helgason, T., & Awad, T. (2008) Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components. *Food Biophysics*, 3(2),146-154. <https://doi.org/10.1007/s11483-008-9065-8>
11. Wissing, S. A., Kayser, O., & Müller, R. H. (2004). Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(9),1257-1272. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2003.12.002>, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.12.002>
12. Ghosh, V., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2013). Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 338-344. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.08.010>
13. Severino, P., Pinho, S. C., Souto, E. B., Santana, M. H. (2011). Polymorphism, crystallinity and hydrophilic-lipophilic balance of stearic acid and stearic acid-capric/caprylic triglyceride matrices for production of stable nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 86(1),125-130. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.03.029>
14. Basri, M., Rahman, R. N., Ebrahimpour, A., Salleh, A. B., Gunawan, E. R., & Rahman, M. B. (2007). Comparison of estimation capabilities of response surface methodology (RSM) with artificial neural network (ANN) in lipase-catalyzed synthesis of palm-based wax ester. *BMC biotechnology*, 7(1), 53. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-7-53>
15. Hippalgaonkar, K., Majumdar, S., & Kansara, V. (2010). Injectable lipid emulsions-advancements, opportunities and challenges. *AAPS PharmSciTech*, 11(4), 1526-1540. <https://doi.org/10.1208/s12249-010-9526-5>

16. Fundarò, A., Cavalli, R., Bargoni, A., Vighetto, D., Zara, G. P., & Gasco, M. R. (2000). Non-stealth and stealth solid lipid nanoparticles (SLN) carrying doxorubicin: pharmacokinetics and tissue distribution after i.v. administration to rats. *Pharmacological Research*, 42(4), 337-343. <https://doi.org/10.1006/phrs.2000.0695>
17. Silva, H. D., Cerqueira, M. Â., & Vicente, A. A. (2012). Nanoemulsions for food applications: development and characterization. *Food and Bioprocess Technology*, 5(3), 854-867. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0683-7>
18. Ghosh, V., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2013). Influence of process parameters on droplet size of nanoemulsion formulated by ultrasound cavitation. *Journal of Bionanoscience*, 7(5), 580-584. <https://doi.org/10.1166/jbns.2013.1187>
19. Lin, C-Y., & Chen, L-W. (2008). Comparison of fuel properties and emission characteristics of two- and three-phase emulsions prepared by ultrasonically vibrating and mechanically homogenizing emulsification methods. *Fuel*, 87(10-11), 2154-2161. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2007.12.017>
20. Behrend, O., Ax, K., & Schubert, H. (2000). Influence of continuous phase viscosity on emulsification by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 7 (2), 77-85. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(99\)00029-2](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(99)00029-2)
21. Maa, Y-F., & Hsu, C. C. (1999). Performance of sonication and microfluidization for liquid-liquid emulsification. *Pharmaceutical Development and Technology*, 4(2), 233-240. <https://doi.org/10.1081/PDT-100101357>
22. Abismail, B., Canselier, J. P., Wilhelm, A. M., Delmas, H., & Gourdon, C. (1999). Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. *Ultrasonics Sonochemistry*, 6(1-2), 75-83. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(98\)00027-3](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(98)00027-3)
23. Jafari, S. M., He, Y., & Bhandari, B. (2007). Production of sub-micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques. *Journal of Food Engineering*, 82(4), 478-488. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.03.007>
24. Nakabayashi, K., Amemiya, F., Fuchigami, T., Machida, K., Takeda, S., Tamamitsu, K., & Atobe, M. (2011). Highly clear and transparent nanoemulsion preparation under surfactant-free conditions using tandem acoustic emulsification. *Chem Commun*, 47(20), 5765-5767. <https://doi.org/10.1039/c1cc10558b>
25. Yuan, Y., Gao, Y., Mao, L., & Zhao, J. (2008). Optimisation of conditions for the preparation of β -carotene nanoemulsions using response surface methodology. *Food Chemistry*, 107(3), 1300-1306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.015>

26. Zainol, S., Basri, M., Basri, H. B., Shamsuddin, A. F., Abdul-Gani, S. S., Karjiban, R. A., & Abdul-Malek, E. (2012) Formulation optimization of a palm-based nanoemulsion system containing levodopa. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(10), 13049-13064. <https://doi.org/10.3390/ijms131013049>
27. Sun, Y., Liu, J., & Kennedy, J. F. (2010). Application of response surface methodology for optimization of polysaccharides production parameters from the roots of *Condonopsis pilosula* by a central composite design. *Carbohydrate Polymers*, 80(3), 949-953. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.01.011>
28. Bezerra, MA., Santelli, RE, Oliveira, EP, Villar, LS., & Escalera, LA (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965-977. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>
29. Myer, R., & Montgomery, D. C. (2002). *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiment*. John Wiley and Sons, New York.
30. Li, P-H., & Chiang, B-H. (2012). Process optimization and stability of d-limonene-in-water nanoemulsions prepared by ultrasonic emulsification using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(1),192-197. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.05.017>
31. Tang, S.Y., Manickam, S., Wei, T. K., & Nashiru, B. (2012). Formulation development and optimization of a novel Cremophore EL-based nanoemulsion using ultrasound cavitation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(2), 330-345. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.07.001>
32. Anarjan, N., Mirhosseini, H., Baharin, B. S., & Tan, C. P. (2010). Effect of processing conditions on physicochemical properties of astaxanthin nanodispersions. *Food Chemistry*, 123(2), 477-483. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.036>
33. Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2013). Physicochemical characterization of lemongrass essential oil-alginate nanoemulsions: effect of ultrasound processing parameters. *Food and Bioprocess Technology*, 6(9), 2439-2446. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0881-y>
34. Üstündağ Okur, N., Apaydın, Ş., Karabay Yavaşoğlu, N. Ü., Yavaşoğlu, A., & Karasulu, H. Y. (2011). Evaluation of skin permeation and anti-inflammatory and analgesic effects of new naproxen microemulsion formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 416(1), 136-144.
35. Devarajan, V, & Ravichandran, V. (2011) Nanoemulsions: As modified drug delivery tool. *International journal of comprehensive pharmacy* 4(01),1-6.

36. Talegaonkar, S., Tariq, M., & Alabood, R. M. (2011). FOR THE TRANSDERMAL DELIVERY OF ONDANSETRON. *Bulletin of Pharmaceutical Research*, 1(3), 18-30.
37. Chantrapornchai, W., Clydesdale, F., & McClements, D. J. (1998). Influence of droplet size and concentration on the color of oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(8), 2914-2920 <https://doi.org/10.1021/jf980278z>
38. Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2013). Effect of processing parameters on physicochemical characteristics of microfluidized lemongrass essential oil-alginate nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 401-407. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.07.004>
39. Rahman, M. S., & Amri, A. (2011). Effect of outlier on coefficient of determination. *International Journal of Education Research*, 6(1), 9-20.
40. Quanhong, L., & Caili, F. (2005). Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein. *Food Chemistry*, 92(4), 701-706. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.042>
41. Mehmood, T. (2015). Optimization of the canola oil based vitamin E nanoemulsions stabilized by food grade mixed surfactants using response surface methodology. *Food Chemistry*, 183, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.021>
42. Polychniatou, V., & Tzia, C. (2014). Study of formulation and stability of co-surfactant free water-in-olive oil nano-and submicron emulsions with food grade non-ionic surfactants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(1), 79-88. <https://doi.org/10.1007/s11746-013-2356-3>
43. Rebolleda, S., Sanz, MT., Benito, JM, Beltrán, S., Escudero, I., & González San-José, ML (2015). Formulation and characterisation of wheat bran oil-in-water nanoemulsions. *Food Chemistry*, 167, 16-23. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.097>
44. Jumaa, M., & Müller, BW (1998). The effect of oil components and homogenization conditions on the physicochemical properties and stability of parenteral fat emulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, 163(1-2), 81-89. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(97\)00369-4](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(97)00369-4)
45. Kentish, S., Wooster, TJ, Ashokkumar, M, Balachandran, S., Mawson, R, & Simons, L (2008). The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 170-175. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.07.005>

46. Fathi, M., Mozafari, M. R., & Mohebbi, M. (2012). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 23(1), 13-27. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.08.003>
47. Cheong, J. N., Tan, C. P., Man, Y. B. C., & Misran, M. (2008). Tocopherol nanodispersions: Preparation, characterization and stability evaluation. *Journal of Food Engineering*, 89(2), 204-209. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.04.018>
48. Chu, B-S., Ichikawa, S., Kanafusa, S., & Nakajima, M. (2007). Preparation of protein-stabilized -carotene nanodispersions by emulsification-evaporation method. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84(11), 1053-1062 <https://doi.org/10.1007/s11746-007-1132-7>
49. Floury, J, Desrumaux, A., & Lardières, J (2000). Effect of high-pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1(2), 127-134. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(00\)00012-6](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(00)00012-6)
50. Sivakumar, T., Manavalan, R., & Valliappan, K. (2007). Global optimization using Deringer's desirability function: enantioselective determination of ketoprofen in formulations and in biological matrices. *Acta Chromatographica*, 19, 29.
51. Lim, S. S., Baik, M. Y., Decker, E. A., Henson, L., Michael Popplewell, L., McClements, D. J., & Choi, S. J. (2011). Stabilization of orange oil-in-water emulsions: A new role for ester gum as an Ostwald ripening inhibitor. *Food Chemistry*, 128(4), 1023-1028. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.008>
52. Barradas, T. N., de Campos, V. E. B., Senna, J. P., Coutinho, C. d. S. C., Tebaldi, B.S., Silva, K. G. d. H. e., & Mansur, C. R. E. (2015). Development and characterization of promising o/w nanoemulsions containing sweet fennel essential oil and non-ionic surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 480, 214-221. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.12.001>
53. Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J-E., & Benoit, J-P. (2003). Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*, 24(23), 4283-4300. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00331-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00331-4)
54. Simunkova, H., Pessenda-Garcia, P., Wosik, J., Angerer, P., Kronberger, H., & Nauer, G. E. (2009). The fundamentals of nano- and submicro-scaled ceramic particles incorporation into electrodeposited nickel layers: Zeta potential measurements. *Surface and Coatings Technology*, 203(13), 1806-1814. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2008.12.031>
55. Klang, V., Matsko, N. B., Valenta, C., Hofer, F. (2012). Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterisation and stability assessment. *Micron*, 43(2-3), 85-103. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2011.07.014>