

Influencia de la formulación en emulsiones dobles con ingredientes ecológicos preparadas mediante una técnica microfluídica

J. Santos^{1*}, L. R. Arriaga^{2,3}, N. Calero¹, H. Lee³, J. Muñoz¹ y D. A. David³

¹Reología Aplicada. Tecnología de Coloides. Facultad de Química, Universidad de Sevilla, C/ Profesor García González, 1, 41012, Sevilla, España.

²Departamento de Química Física I, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Complutense S/N, 28040 Madrid.

³School of Engineering and Applied Sciences and Department of Physics, Harvard University, 9 Oxford Street, Cambridge, MA, US 02138.

Influence of the formulation on double emulsions containing ecological ingredients prepared by a microfluidic technique

Influència de la formulació en emulsions dobles amb ingredients ecològics preparades mitjançant una tècnica microfluídica

RECEIVED: 18 DECEMBER 2017; REVISED: 28 DECEMBER 2017; ACCEPTED: 30 DECEMBER 2017

SUMMARY

Multiple emulsions have significant potential in myriad applications, including foods, cosmetics, drop networks, controlled microreactors, synthesis of microcapsules and drug delivery systems. Great control of multiple-emulsion drops production can be achieved using microfluidic devices. The field of emulsification through microfluidic devices has in recent years become a popular topic of research.

In this work, we used a practical approach to make monodisperse double-emulsions drops with an ultrathin middle layer using a single step emulsification in a capillary microfluidic device. The goal of this study was to investigate the influence of different surfactants and additives on stability and droplet size of W/O/W eco-friendly emulsions formulated with a green solvent (D-Limonene). The incorporation of Pluronic F108 destabilised the double emulsions due to a process of precipitation, forming microcapsules. By contrast, there was a necessity to include Span 80 in the formulation in order to achieve stable double emulsions. The addition of rosin gum or silicone oil did not show any improvement in the stability of these complex emulsions. Finally, the formulation used in ultrathin shell microfluidic device did not produce stable double emulsions in the traditional microfluidic device.

Keywords: Double emulsions; microfluidics, D-Limonene, ecofriendly solvents, Pluronic, Span 80.

RESUMEN

Las emulsiones múltiples tienen multitud de aplicaciones en la industria alimentaria, cosméticos, microreactores controlados, síntesis de microcápsulas y sistemas de liberación controlada. Se puede conseguir un gran control de la producción de gotas en emulsiones dobles usando técnicas microfluídicas.

En este trabajo se desarrollaron emulsiones dobles formuladas con D-Limoneno usando un dispositivo de microfluídica en un solo paso. El D-Limoneno, el componente principal del aceite esencial de naranja, es un monoterpeno natural que tiene propiedades antioxidantes, bactericida, quimiopreventivas y terapéuticas. El objetivo del presente estudio fue investigar la influencia de diferentes tipos de tensioactivos y aditivos en la formulación de emulsiones dobles ecológicas tipo corteza-ultrafina-núcleo sobre la estabilidad física. Las emulsiones dobles tipo corteza ultra fina y núcleo preparadas con Pluronic P108 sufrieron un fenómeno de desestabilización debido a la precipitación de este tensioactivo polimérico creando microcápsulas. Las emulsiones dobles necesitaron un tensioactivo hidrófobo (Span 80) en la fase media para estabilizarlas. Se consiguieron emulsiones dobles estables utilizando Span 80 como tensioactivo en la fase oleosa y PVA en la fase exterior para la configuración tipo corteza

*Corresponding author: jsantosgarcia@us.es

ultrafina-núcleo. Estas condiciones no son extrapolables al tradicional dispositivo de microfluídica.

Palabras clave: Emulsiones dobles; microfluídica; D-Limoneno; disolventes verdes; Pluronic; Span 80.

RESUM

Les emulsions múltiples tenen multitud d'aplicacions en la indústria alimentària, cosmètics, microreactors controlats, síntesi de microcàpsules i sistemes d'alliberament controlat. Es pot aconseguir un gran control de la producció de gotes en emulsions dobles fent servir tècniques microfluídiques.

En aquest treball es van desenvolupar emulsions dobles formulades amb D-limoné utilitzant un dispositiu de microfluídica en un sol pas. El D-limoné, el component principal de l'oli essencial de taronja, és un monoterpè natural que té propietats antioxidants, bactericides, quimiopreventives i terapèutiques. L'objectiu del present estudi va ser investigar la influència de diferents tipus de tensioactius i additius en la formulació d'emulsions dobles ecològiques tipus escorça-ultrafina-nucli sobre l'estabilitat física. Les emulsions dobles tipus escorça ultrafina i nucli preparades amb Pluronic P108 van patir un fenomen de desestabilització a causa de la precipitació d'aquest tensioactiu polimèric creant microcàpsules. Les emulsions dobles van necessitar un tensioactiu hidròfob (Span 80) en la fase mitjana per estabilitzar-les. Es van aconseguir emulsions dobles estables utilitzant Span 80 com tensioactiu en la fase oliosa i PVA en la fase exterior per a la configuració tipus escorça ultrafina-nucli. Aquestes condicions no són extrapolables al tradicional dispositiu de microfluídica.

Paraules clau: Emulsions dobles; microfluídica; D-Limoné; dissolvents verds; Pluronic; Span 80.

INTRODUCCIÓN

Las emulsiones múltiples son sistemas complejos de gotas, en las que hay gotas dentro de gotas y éstas están dispersas en un tercer fluido inmiscible. Estos sistemas tienen multitud de aplicaciones en alimentos^{1,2}, cosméticos³, microreactores^{4,5}, síntesis de microcápsulas^{6,7}, y sistemas de liberación controlada^{8,9}. Además, las emulsiones múltiples tienen algunas ventajas en relación a las emulsiones convencionales simples para algunas aplicaciones industriales y médicas. Los componentes funcionales que sean hidrófilos pueden ser encapsulados en la fase interna (W1). Estos pueden ser liberados a una velocidad controlada en respuesta a un estímulo ambiental por ejemplo cambios de pH, fuerza iónica, temperatura o tiempo de envejecimiento. Además, un ingrediente activo que sea hidrófobo puede ser encapsulado en la fase oleosa. Otra de las posibles ventajas de las emulsiones múltiples es que la viscosidad es mayor que la de su homóloga en concentración de fase oleosa, lo que puede tener importantes implicaciones para el desarrollo de productos light.

El principal problema de las emulsiones múltiples es su dificultad para ser estables cinéticamente. Pueden tener diferentes mecanismos de desestabilización como coalescencia de las gotas acuosas internas, coalescencia de las gotas oleosas, ruptura de la película de aceite dando lugar a la pérdida de la gota acuosas y la transferencia de agua o de ingredientes solubles en agua a través de la capa de aceite¹⁰. Todos estos tipos de inestabilidad son producidos debido a la existencia de las dos interfases: interfase agua1/aceite e interfase aceite/agua2. Para combatir las posibles desestabilizaciones se necesitan dos tensioactivos diferentes: uno con bajo HLB (por ej. Span 80) para estabilizar la interfase agua/aceite y otro con alto HLB (por ej. Pluronic PE9400) para estabilizar la interfase aceite/agua. El tensioactivo Span 80, también llamado sorbitán monoleato, ha sido utilizado en multitud de ocasiones para estabilizar interfaces agua/aceite¹¹⁻¹³. Para estabilizar interfaces aceite/agua se han utilizado multitud de tensioactivos diferentes, entre los que se encuentran los tensioactivos poliméricos como los Pluronic dando excelentes resultados en estabilización de emulsiones aceite en agua¹⁴⁻¹⁶.

Usando dispositivos basados en microfluídica se puede conseguir un gran control de la producción de gotas en emulsiones dobles. Este campo de estudio ha atraído la atención en los últimos años debido a los recientes avances en el coste y facilidad. Además estos dispositivos ofrecen altos niveles de uniformidad de las gotas y versatilidad en el tipo de emulsiones que pueden formar¹⁷⁻¹⁹. Recientemente, se ha estudiado un nuevo dispositivo basado en microfluídica en el que se reduce el grosor de la fase media²⁰. En estos dispositivos, se crean gotas dobles tipo corteza-núcleo en las que la corteza es ultrafina. Si el grosor de la corteza en una gota doble es muy fino, el efecto de lubricación reduce la migración de la gota interna hasta la pared externa, aumentando enormemente su estabilidad²¹.

El D-Limoneno, el componente principal del aceite esencial de naranja, es un monoterpeno natural y posea actividad bactericida, antioxidante, y terapéutica y su uso ha recibido mucho interés en la última década. Además, este disolvente es poco soluble en agua por lo que puede usarse para incorporar y encapsular ingredientes activos. El bajo riesgo para la salud que conlleva su uso y su bajo impacto ambiental le hacen un disolvente muy interesante para ser usado en química verde²²⁻²⁴. Recientemente se ha utilizado D-Limoneno como componente en matrices para productos agroquímicos^{25,26} pero nunca ha sido usado en emulsiones dobles.

En este estudio, se usó un dispositivo de capilares de vidrio basado en microfluídica para preparar emulsiones dobles tipo corteza-núcleo con la corteza ultrafina en un solo paso. El objetivo del presente fue investigar la influencia de diferentes tensioactivos además de diferentes aditivos en la fase media en la estabilidad y tamaño de gota de emulsiones ecológicas agua-aceite-agua con corteza ultrafina producidas por microfluídica.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

El D-Limoneno fue suministrado por Sigma Aldrich y se usó como fase oleosa. Los diferentes tensioactivos usados como el Span 80 y Polivinilalcohol (PVA; Mw =13000-23000) usados en la fases oleosa y acuosa, respectivamente, fueron suministrados por Sigma Aldrich. En cambio, el Pluronic F108 fue suministrado por BASF. El polietilenglicol (PEG) (Sigma Aldrich) se utilizó para igualar la presión osmótica. Los aditivos utilizados fueron un aceite de silicona (DC 200R viscosidad= 1 cSt) y la goma rosin (Sigma Aldrich)

Métodos

Fabricación del dispositivo microfluidica basado en capilares de vidrio.

Este dispositivo consiste en dos capilares cilíndricos (World Precision Instruments, Inc.), de diámetro interno y externo de 0.58 y 1.00 mm, respectivamente, insertados dentro del final de un capilar cuadrado (Atlantic International Technology, Inc.) de una dimensión interna de 1.05 mm. Se afilan los capilares cilíndricos hasta un diámetro de 20 µm con un micropulidor (P-97, Sutter Instruments, Inc.) y luego se lijan hasta los diámetros finales de 60 y 120 µm. El capilar de inyección se trata con n-octadecil-trimetoxisilano (Sigma Aldrich) para aumentar la hidrofobicidad del capilar y el capilar con mayor diámetro (capilar de colección de gotas) con 2-[metoxi (poliethileno)propil] trimetoxisilano (gelest, Inc.) para aumentar la hidrofilia del capilar. Se estira un tercer capilar cilíndrico con un mechero para que tenga un diámetro exterior de aproximadamente de 200 µm. A continuación, se montan los capilares de la forma que fue descrita por Shin-Hyun Kim et al (2011)²⁰.

Modo de operación con el dispositivo de microfluidica.

Las fases acuosas se usan en jeringas de plástico de 10 mL (Becton D) mientras que la fase oleosa en jeringas de vidrio (Hamilton Gastight). Estas jeringas están conectadas a bombas para controlar el flujo de las fases (Harvard Apparatus).

Caracterización de las gotas:

Se graba la producción de las gotas en el dispositivo microfluidica en un microscopio invertido (Leica; objetivo 5x) equipado con una cámara para grabar a alta velocidad (Phantom V9). Luego se caracterizan las gotas en con microscopia óptica en campo claro y microscopia de fluorescencia confocal (Leica, objetivo 10x). Se usan el láser de Argon (458 nm) y HeNe(543 nm) como excitadores para el naftopireno y la rodamina B.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Emulsiones dobles tipo corteza ultrafina y núcleo. Influencia del tensioactivo.

Se estudió la influencia de dos tensioactivos diferentes (Span 80 y Pluronic F108) y dos aditivos di-

ferentes para la fase oleosa (goma Rosin y aceite de silicona) en la estabilidad física y la producción de emulsiones dobles mediante microfluidica. Para una mayor claridad, en la tabla 1 se exponen las diferentes formulaciones usadas:

Tabla 1. *Diferentes formulaciones usadas para formar emulsiones dobles mediante microfluidica.*

	Fase interior	Fase media	Fase exterior
1	9% PEG+ 1% PVA + 1% F108+ agua	Limoneno + 5% Span 80	10% PVA + 1% F108 + agua
2	9% PEG+ 1% PVA + 1% F108+ agua	Limoneno	10% PVA + 1% F108+ agua
3	9% PEG+ 1% PVA + agua	Limoneno + 5% Span 80	10% PVA + 1% F108+ agua
4	9% PEG+ 1% PVA + agua	Limoneno	10% PVA + 1% F108 + agua
5	9% PEG+ 1% PVA + agua	Limoneno + 5% Span 80	10% PVA + agua
6	9% PEG+ 1% PVA + agua	Limoneno + 5% Span 80 + 2% aceite de silicona	10% PVA + agua
7	9% PEG+ 1% PVA + agua	Limoneno + 5% Span 80 + 10% Goma Rosin	10% PVA + agua

Cabe mencionar que se utilizó el 10% de PVA en todas las fases externas de las emulsiones para aumentar la viscosidad y así facilitar la formación de gotas. Además este polímero ha mostrado propiedades interfaciales para ayudar a la estabilización de emulsiones^{21,27}. Se utilizó también PEG para igualar la presión osmótica de la fase interna y de la fase externa. Por lo tanto, la concentración de PVA y PEG no se cambió de una formulación a otra. También se incorporó un 1% de PVA en la fase interna ya que hay estudios que señalan la mejor estabilidad de gotas dobles debido a ello ²¹. La formulación número 1, la cual contiene Pluronic F108 en ambas fases acuosas y Span 80 en la fase oleosa, no pudo formar gotas mediante la técnica microfluidica indistintamente de los flujos utilizados porque nunca consigue estar en modo goteo (está en modo jetting o también llamado de chorro). Sin embargo, si no se utilizaba Span 80, las gotas se formaron como muestra la figura 1. En esta figura, se ve la formación de gotas dobles tipo corteza-núcleo con la corteza ultrafina. Es importante resaltar que en este tipo de sistemas de microfluidica, no solo se forman gotas dobles también se forman emulsiones simples. Sin embargo, es fácil separar los dos tipos de gotas por gravedad ya que las gotas simples van hacia arriba mientras que las dobles van hacia abajo por la diferente densidad. Luego las gotas simples se desechan recogéndolas con una pipeta²⁰.

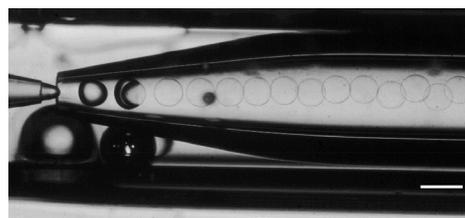


Figura 1. *Imagen de microscopia óptica donde se muestra la producción de gotas de la formulación número 2. La barra de escala representa 200 micras.*

Sin embargo, estas gotas no fueron estables con el paso del tiempo y se convirtieron en gotas simples de aceite al cabo de dos horas (Figura 2). Esta inestabilidad es causada por la elección incorrecta del/ de los tensioactivo/s ya que no protegen suficiente las interfases¹⁰.

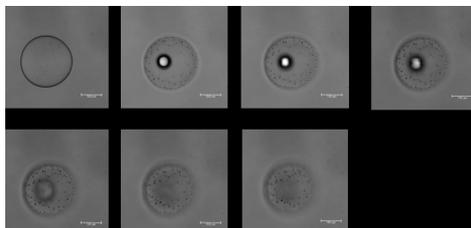


Figura 2. Proceso de rotura de la capa oleosa en una gota doble formulada con la formulación 2. Microfotografías tomadas cada 0.2s.

Por el contrario, las gotas obtenidas usando la formulación 3 solo con Pluronic F108 en la fase exterior y Span 80 en la fase media se muestran en las figura 3.

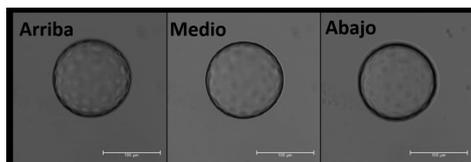


Figura 3A. Morfología de una gota doble preparada con la formulación 3 tomada por microscopía óptica.

Justo después de ser preparadas, estas gotas tienen morfología tipo “bola de golf”. La fase media que forma la corteza ultrafina no recubre homogéneamente la fase interna formando así este tipo de estructura. El radio medio de gota interna de estas emulsiones dobles fueron de $75.40 \pm 4.98 \mu\text{m}$. En la figura 3B se muestra una gota con esta formulación vista con microscopía confocal. Se pueden distinguir diferentes fases al incorporar dos fluoróforos diferentes: Sulforodamina B (rojo) y naftopireno (azul cian). La sulforodamina B permanece totalmente en la fase interna (núcleo) y el naftopireno en la corteza. Se demuestra que la corteza es ultrafina y que no hay mezcla entre las dos fases por lo que la encapsulación de la sulforodamina B ha sido completa. Claramente se muestra una morfología corteza-núcleo con corteza ultrafina.

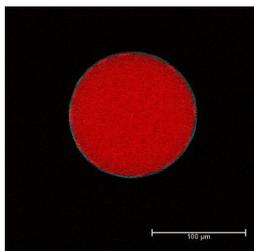


Figura 3B. Imagen resultante de solapar las microfotografías tomadas por microscopía laser confocal para una gota preparada con la formulación 3 a las dos horas de tiempo de envejecimiento.

Sin embargo, esta estructura no fue estable con el paso de los días ya que la fase que formaba la corteza se movió hacia arriba a los dos días después de su preparación como muestran las figuras 4A y 4B. La figura 4A es fruto de la observación de esta gota doble a los dos días en la zona ecuatorial. Toda la gota es roja, por lo que no tiene Limoneno en la zona ecuatorial. Además, la intensidad ha disminuido considerablemente. La figura 4C muestra la microfotografía tomada desde arriba. Se ve una gota totalmente azul arriba, por lo que cabe deducir que el D-Limoneno ha migrado hacia arriba de la gota por diferencia de densidad. Esto es un caso típico de “dewetting”^{28,29}.

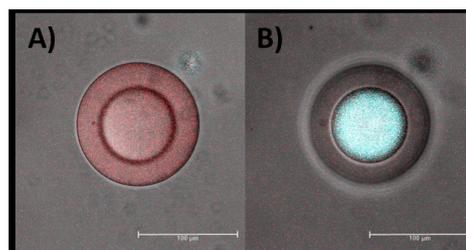


Figura 4A y 4B. Imagen resultante de solapar las microfotografías tomadas por microscopía laser confocal y microscopía óptica para una gota preparada con la formulación 3 a los dos días de tiempo de envejecimiento vistas desde A) plano ecuatorial y B) arriba.

Sin embargo las gotas que no llegaron a romperse debido a este proceso de “dewetting”, formaron una microcapsula espontáneamente a los siete días de tiempo de envejecimiento (figura 5A y 5B). Esta formación de capsulas con otros Pluronicos se han visto anteriormente^{30,31}.

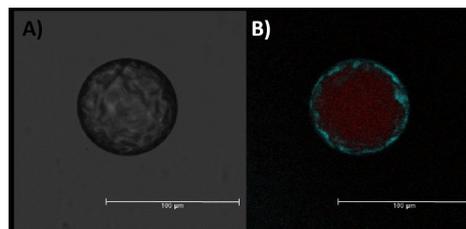


Figura 5A 5B. Microfotografía de una gota preparada con la formulación 3 tomada 7 días después de su preparación usando A) microscopía óptica y B) microscopía laser confocal.

Sin embargo, al formarse la capsula la mayoría no eran compactas dejando escapar la fase interna. Debido a este proceso no deseado de precipitación, el Pluronic F108 se eliminó de las formulaciones 5, 6 y 7.

La formulación 4 que no contiene Span 80 en la fase media no fue capaz de formar gotas de forma homogénea debido a un mojado heterogéneo en el capilar de inyección del dispositivo de microfluidica. Esto nos hace pensar que el Span 80 puede ser determinante para que exista un mojado uniforme de la fase media en el tubo.

La formulación 5 contiene solo Span 80 como tensioactivo y está en la fase media como en formulaciones anteriores. Con esta formulación, la producción fue estable pero algunas gotas dobles se volvían sim-

ples en el capilar de colección (figura 6). Los flujos de fase externa, media e interna en la que la producción de gotas era alta y estable se representan en la figura 7. Dentro del cubo representado, las emulsiones dobles producidas fueron estables durante más de un mes.

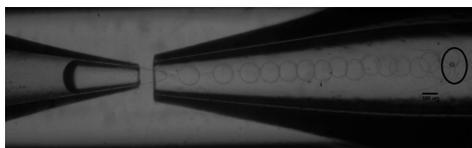


Figura 6. Imagen de microscopía óptica donde se muestra la producción de gotas de la formulación número 5. La barra de escala representa 100 micras.

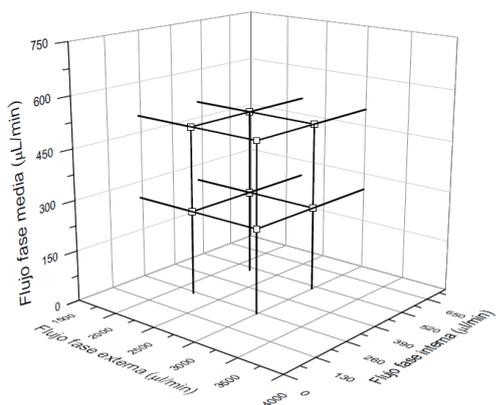


Figura 7. Flujo de fase interna, media y externa donde se forman emulsiones dobles estables tipo corteza-núcleo con corteza ultrafina usando la formulación 5.

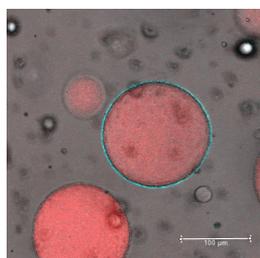


Figura 8. Microfotografía resultante de solapar las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal y microscopía óptica para la formulación número 5.

La figura 8 muestra la microfotografía combinada de confocal y microscopía óptica de una gota de la formulación 5. Estas gotas dobles son más pequeñas que las preparadas con la formulación 3. Una vez más queda demostrada que el Pluronic F108 no es un buen candidato como tensioactivo en las fases acuosas para este tipo de emulsiones dobles. Las gotas con la formulación 5 fueron estables durante todo el tiempo del estudio (un mes).

Emulsiones dobles tipo corteza ultrafina y núcleo. Influencia del aditivo en la fase media.

Una vez obtenidas emulsiones dobles medianamente estables, se incorporó un aditivo a la fase media. El primer aditivo utilizado fue un aceite de silicona. Gutiérrez y colaboradores publicaron un estudio donde se muestra una mejora en la estabilidad en emulsiones

simples haciendo la fase oleosa más apolar incorporándole este tipo de productos³². Sin embargo, la formulación 6 que contiene aceite de silicona como aditivo en la fase media no mostró ningún tipo de mejora comparándola con la formulación 5. El segundo aditivo probado fue la goma rosín. Existen estudios sobre su incorporación en emulsiones simples para mejorar la estabilidad¹⁶we examined the influence of the addition of a natural gum (rosin gum). Primeramente, cabe destacar que la formulación 7 que contiene goma rosín mostró una producción de gotas mayor. Para estudiar la influencia de estos aditivos en la fase media con mayor profundidad, se midieron los tamaños de gotas con los distintos aditivos. La incorporación de estos dos aditivos no mostró ni una reducción del tamaño de gota ni de polidispersión (tabla 2). Todas estas gotas fueron estables con el paso del tiempo. Debido a ello, la formulación número cinco sería la adecuada para la preparación de este tipo de sistemas ecológicos.

Tabla 2. Radio medio y sus desviaciones estándar de las gotas obtenidas usando diferentes formulaciones.

Formulación	Radio medio de gota/ μm	Desviación estándar/ μm
5	55.20	2.30
6	58.56	4.41
7	62.00	2.11

Emulsiones dobles tipo corteza gruesa y núcleo.

Una vez obtenida una formulación que consigue gotas estables preparadas con un dispositivo de microfluídica especialmente para la producción de cortezas ultrafinas, se prepararon emulsiones dobles con la misma formulación (formulación 5) con un dispositivo de microfluídica convencional. Aunque la producción fue estable, el grosor de la fase media parece variar observando las gotas una vez recogidas (figura 9). Además estas gotas se convirtieron en gotas simples al cabo de las 12 horas. Esto nos lleva a pensar que aunque una formulación pueda funcionar y producir gotas estables en el dispositivo especial para corteza ultrafina, no podemos extrapolar esa formulación a la preparación con dispositivos de microfluídica convencionales.

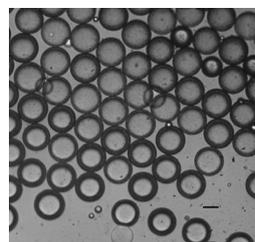


Figura 9. Microfotografía óptica de gotas dobles tipo corteza-núcleo con corteza gruesa con la formulación 5. La barra de escala representa 100 μm .

CONCLUSIONES

Se han producido emulsiones dobles ecológicas tipo corteza-núcleo con corteza ultrafina mediante un solo paso usando un dispositivo de microfluídica de capi-

lares de vidrio. Se estudió la influencia de dos tipos de tensioactivo diferentes: un tensioactivo polimérico y un tensioactivo Span. Aunque los tensioactivos poliméricos suelen dar buen resultado en emulsiones simples, en estas emulsiones dobles han provocado un proceso de desestabilización por “dewetting”. Sin embargo, el uso de Span 80 ha conllevado la producción de emulsiones dobles con corteza ultrafina y estables. En el caso de estudio de diferentes aditivos como goma rosin o aceite de silicona, se ha concluido que ninguno de estos aditivos mejoró la estabilidad o el tamaño de las gotas internas de estas emulsiones dobles. Debido a ello, la formulación que contiene solo Span en la fase media es la óptima para la preparación de emulsiones dobles ecológicas en este tipo de dispositivos. Además se demuestra que no se pueden extrapolar formulaciones óptimas de un sistema de microfluídica basado en la formación de cortezas ultrafinas a un sistema de microfluídica convencional. Finalmente, estas emulsiones dobles estables pueden ser consideradas como matrices para productos agroquímicos y así tener la capacidad de disolver dos productos activos diferentes en la fase acuosa interna y en la fase oleosa.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte de los resultados obtenidos en el proyecto CTQ2015-70700-P, financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España y por la Comisión Europea (Programa FEDER). Además se agradece la financiación recibida por el V Plan Propio de la Universidad de Sevilla para estancias breves.

REFERENCIAS

- McClements, D. J.; Li, Y. Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2010**, *159*, 213–228.
- Muschiolik, G. Multiple emulsions for food use. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2007**, *12*, 213–220.
- Lee, M.-H.; Oh, S.-G.; Moon, S.-K.; Bae, S.-Y. Preparation of silica particles encapsulating retinol using O/W/O multiple emulsions. *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, *240*, 83–89.
- Duncanson, W. J.; Abbaspourrad, A.; Shum, H. C.; Kim, S.-H.; Adams, L. L. A.; Weitz, D. A. Monodisperse gas-filled microparticles from reactions in double emulsions. *Langmuir* **2012**, *28*, 6742–6745.
- Theberge, A. B.; Whyte, G.; Huck, W. T. S. Generation of picoliter droplets with defined contents and concentration gradients from the separation of chemical mixtures. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 3449–3453.
- Liu, J.; Zhang, Y.; Wang, C.; Xu, R.; Chen, Z.; Gu, N. Magnetically sensitive alginate-templated polyelectrolyte multilayer microcapsules for controlled release of doxorubicin. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 7673–7679.
- Shum, H. C.; Zhao, Y.; Kim, S.; Weitz, D. A. Multicompartment polymersomes from double emulsions. *Angew. Chemie* **2011**, *123*, 1686–1689.
- Okochi, H.; Nakano, M. Preparation and evaluation of w/o/w type emulsions containing vancomycin. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2000**, *45*, 5–26.
- Raynal, S.; Grossiord, J. L.; Seiller, M.; Clausse, D. A topical w/o/w multiple emulsion containing several active substances: formulation, characterization and study of release. *J. Control. release* **1993**, *26*, 129–140.
- Kumar, R.; Kumar, M. S.; Mahadevan, N. Multiple emulsions: A review. *Int. J. Recent Adv. Pharm. Res.* **2012**, *2*, 9–19.
- Hou, W.; Papadopoulos, K. D. W1/O/W2 and O1/W/O2 globules stabilized with Span 80 and Tween 80. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **1997**, *125*, 181–187.
- Porrás, M.; Solans, C.; Gonzalez, C.; Martínez, A.; Guinart, A.; Gutiérrez, J. M. Studies of formation of W/O nano-emulsions. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2004**, *249*, 115–118.
- (Santini, E.; Liggieri, L.; Sacca, L.; Clausse, D.; Ravera, F. Interfacial rheology of Span 80 adsorbed layers at paraffin oil–water interface and correlation with the corresponding emulsion properties. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2007**, *309*, 270–279.
- Barnes, T. J.; Prestidge, C. A. PEO–PPO–PEO Block Copolymers at the Emulsion Droplet–Water Interface. *Langmuir* **2000**, *16*, 4116–4121.
- Bouchemal, K.; Briançon, S.; Perrier, E.; Fessi, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. *Int. J. Pharm.* **2004**, *280*, 241–251.
- Pérez-Mosqueda, L. M.; Ramírez, P.; Trujillo-Cayado, L. A.; Santos, J.; Muñoz, J. Development of eco-friendly submicron emulsions stabilized by a bio-derived gum. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2014**, *123*, 797–802.
- Nisisako, T.; Torii, T. Microfluidic large-scale integration on a chip for mass production of monodisperse droplets and particles. *Lab Chip* **2008**, *8*, 287–293.
- Shah, R. K.; Shum, H. C.; Rowat, A. C.; Lee, D.; Agresti, J. J.; Utada, A. S.; Chu, L.-Y.; Kim, J.-W.; Fernandez-Nieves, A.; Martinez, C. J. Designer emulsions using microfluidics. *Mater. Today* **2008**, *11*, 18–27.
- Utada, A. S.; Chu, L.-Y.; Fernandez-Nieves, A.; Link, D. R.; Holtze, C.; Weitz, D. A. Dripping, jetting, drops, and wetting: The magic of microfluidics. *Mrs Bull.* **2007**, *32*, 702–708.
- Kim, S.-H.; Kim, J. W.; Cho, J.-C.; Weitz, D. A. Double-emulsion drops with ultra-thin shells for capsule templates. *Lab Chip* **2011**, *11*, 3162–3166.
- Arriaga, L. R.; Datta, S. S.; Kim, S.; Amstad, E.; Kodger, T. E.; Monroy, F.; Weitz, D. A. Ultrathin shell double emulsion templated giant unilame-

- llar lipid vesicles with controlled microdomain formation. *Small* **2014**, *10*, 950–956.
22. Ciriminna, R.; Lomeli-Rodriguez, M.; Carà, P. D.; Lopez-Sanchez, J. A.; Pagliaro, M. Limonene: a versatile chemical of the bioeconomy. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 15288–15296.
 23. Lu, H.; Shen, Y.; Sun, X.; Zhu, H.; Liu, X. Washing effects of limonene on pesticide residues in green peppers. *J. Sci. Food Agric.* **2013**, *93*, 2917–2921.
 24. Virot, M.; Tomao, V.; Ginies, C.; Visinoni, F.; Chemat, F. Green procedure with a green solvent for fats and oils' determination: microwave-integrated Soxhlet using limonene followed by microwave Clevenger distillation. *J. Chromatogr. A.* **2008**, *1196*, 147–152.
 25. Trujillo-Cayado, L. A.; Alfaro, M. C.; Muñoz, J. Effects of ethoxylated fatty acid alkanolamide concentration and processing on d-limonene emulsions. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2018**, *536*, 198-203.
 26. Trujillo-Cayado, L. A.; García, M. C.; Muñoz, J.; Alfaro, M. C. Development, rheological properties, and physical stability of d-limonene-in-water emulsions formulated with copolymers as emulsifiers. *J. Appl. Polym. Sci.* **2016**, *133* (34).
 27. Ogino, K.; Abe, M. *Mixed surfactant systems*; CRC Press, **1992**.
 28. Hayward, R. C.; Utada, A. S.; Dan, N.; Weitz, D. A. Dewetting instability during the formation of polymersomes from block-copolymer-stabilized double emulsions. *Langmuir* **2006**, *22*, 4457–4461.
 29. Kim, S.-H.; Kim, B. Controlled formation of double-emulsion drops in sudden expansion channels. *J. Colloid Interface Sci.* **2014**, *415*, 26–31.
 30. Karolewicz, B.; Gajda, M.; Pluta, J.; Górnica, A. The effect of Pluronic F127 on the physicochemical properties and dissolution profile of lovastatin solid dispersions. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2016**, *123*, 2283–2290.
 31. Li, F.; de Haan, L. H. J.; Marcelis, A. T. M.; Leermakers, F. A. M.; Stuart, M. A. C.; Sudhölter, E. J. R. Pluronic polymersomes stabilized by core cross-linked polymer micelles. *Soft Matter* **2009**, *5*, 4042–4046.
 32. Gutiérrez, J. M.; González, C.; Maestro, A.; Sole, I.; Pey, C. M.; Nolla, J. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2008**, *13*, 245–251.