



Factores principales que intervienen en la estabilidad de una emulsión doble

C.E. Kosegarten-Conde* y M.T. Jiménez-Munguía

*Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental, Universidad de las Américas Puebla.
Ex hacienda Sta. Catarina Mártir S/N, San Andrés Cholula, Puebla. C.P.72810, México.*

Resumen

Una emulsión doble es una emulsión simple dentro de otra emulsión. Su uso con fines comerciales para la industria alimentaria se encuentra limitado debido a que son sistemas termodinámicamente inestables, lo cual hace difícil mantener en el tiempo las características buscadas, así como controlar de manera exacta, la liberación del principio activo que se encuentra encapsulado en la emulsión interna. Muchas son las investigaciones realizadas que han aportado conocimiento para lograr entender la influencia que tiene el pH, el uso de electrolitos, la combinación de distintos emulgentes tanto monoméricos y poliméricos, como del tipo complejos proteína-polisacárido, la viscosidad, el tamaño de gota interna y externa, el balance hidrófilo lipófilo (BHL), la temperatura y las condiciones de preparación de la emulsión, entre otros, en la estabilidad de las emulsiones dobles. En este artículo se revisarán los factores mencionados.

Palabras clave: emulsión doble, emulgente, biopolímeros alimenticios, potencial zeta, encapsulación.

Abstract

A double emulsion is a simple emulsion within another emulsion. Its commercial use for the food industry is limited because they are thermodynamically unstable systems, which make difficult to maintain them, over time. Other challenge is to control the release of the active ingredient encapsulated in the inner emulsion. Many studies have contributed for achieving the comprehension of the influence of pH, the use of electrolytes, the combination of several monomeric and polymeric emulsifiers, such as the protein-polysaccharide complex, viscosity, internal and external droplet size, the hydrophilic lipophilic balance (HLB), the temperature and the emulsification conditions, among others, in the double emulsions stability. In this review these factors are highlighted.

Keywords: double emulsions, emulsifier, food biopolymers, zeta potential, encapsulation.

Introducción

La estabilidad y disponibilidad de un principio activo es de gran interés en muchas áreas del conocimiento, incluyendo la ciencia de

alimentos. De ahí que el lograr protegerlo del medio ambiente en que se encuentre, prolongar su vida útil y controlar su liberación, son algunos de los retos que se enfrentan para cumplir con lo antes expuesto. Un intento para lograrlo es con la formación de emulsiones dobles, en donde las gotas de la fase dispersa contienen, dentro de ellas, pequeñas gotas

*Programa de Doctorado en Ciencia de Alimentos
Tel.: +52 222 229 2126, fax: +52 222 229 2727
Dirección electrónica: carlos.kosegartence @udlap.mx

inmiscibles y también dispersas, conteniendo el principio activo, disuelto o encapsulado. Los sistemas así formados presentan dos interfases termodinámicamente inestables, cuya integridad depende del tipo de compuestos que forman la fase dispersa, la fase continua y las interfases, así como las proporciones en que se encuentran éstas y los emulgentes utilizados. La técnica y condiciones de elaboración de la emulsión doble juegan además, un papel importante.

El lograr que una emulsión perdure con las características deseadas a través de un determinado tiempo, no es algo sencillo, depende entre otros factores de los emulgentes seleccionados; algunos han mostrado crear interfases más estables, pero con una inadecuada liberación del principio activo de interés o viceversa. En algunas investigaciones, se ha observado un efecto sinérgico en la utilización de macromoléculas naturales en combinación con emulgentes monoméricos tradicionales. Otro factor a considerar, es el control de la presión osmótica en la fase acuosa, la cual coadyuva de manera significativa en la estabilidad de las emulsiones dobles; es decir, a mantener sus características originales, como viscosidad, tamaño de gota y porcentaje del compuesto deseable encapsulado, al evitar que se presente coalescencia o ruptura por hinchazón o encogimiento, las cuales son las principales causas por las que se pierde o rompe una emulsión doble.

Existen dos razones principales para la aplicación de las emulsiones dobles en el área de alimentos, la primera es la de encapsular algún ingrediente sensible tal como un nutriente o compuesto de sabor y después liberarlo de manera controlada durante la digestión o masticación. La segunda es para obtener productos reducidos en grasa, más saludables.

Esta revisión pretende describir las variables más importantes a controlar, para tratar de obtener emulsiones dobles estables, para las posibles aplicaciones en el área de alimentos.

Revisión bibliográfica

1. Generalidades

Las emulsiones múltiples o dobles están constituidas por una fase dispersa inmiscible en la fase continua, donde la fase dispersa contiene a su vez gotas que son inmiscibles en ésta. Este tipo de emulsiones, se encuentra dividido en dos grupos importantes; las llamadas emulsiones aceite en agua en aceite (O/W/O, por sus siglas en inglés), y las llamadas, emulsiones agua en aceite en agua (W/O/W, por sus siglas en inglés), en las cuales se enfoca el presente trabajo, y más investigación existe.

El descubrimiento de las emulsiones dobles se atribuye a Seifriz en 1925 y una de las primeras aplicaciones de las emulsiones dobles se reporta en 1965, por Herbert, encontrando en la actualidad, aplicaciones importantes en el área farmacéutica, cosmética, médica, y en el tratamiento de aguas residuales (Weiss y Mushiolik, 2007).

En la Fig. 1 se ilustra una representación de un conjunto de gotas internas acuosas (W1), dispersas en aceite (O), resultantes de una primera emulsión (W1/O) llamada agua en aceite, debido a que el porcentaje en peso de la fase acuosa es menor al de la fase de aceite; y éste a su vez (W1/O), disperso en una segunda fase acuosa (W2), formando una emulsión doble W1/O/W2. La gota de aceite presenta dos interfases, una con las gotas acuosas internas y otra con la fase acuosa externa. En

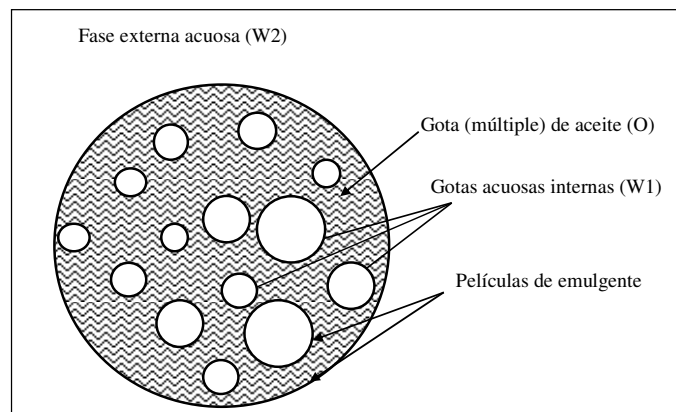


Fig.1. Representación esquemática de una gota en una emulsión W1/O/W2. Adaptado de Garti N. y Aserin A. (1996).

estas interfases están presentes, además, los emulgentes necesarios para la estabilización del sistema, localizados exactamente en la línea de contacto entre la fase acuosa y la fase de aceite (Garti y Aserin, 1996). En las emulsiones W1/O/W2, el compuesto encapsulado, para ejercer su acción, tiene que cruzar de la fase acuosa interna (W1) a la fase acuosa externa (W2) a través de la delgada película de aceite (O), llamada también, sistema de membrana líquida (Kumar *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2011).

Un emulgente es una molécula anfifílica o anfipática que tiene una “cabeza” hidrófila, la cual tiene una alta afinidad por el agua, y una “cola” lipófila, la cual tiene afinidad por el aceite. Los emulgentes se clasifican como lipófilos e hidrófilos, según su mayor afinidad por compuestos no polares o polares respectivamente, conservando en ambos casos, su capacidad de disolverse en ambos tipos de compuestos (Kralova y Sjöblom, 2009).

Las emulsiones dobles, se preparan básicamente en dos formas: homogeneizando en uno o dos pasos. Existe una gran cantidad de reportes para la preparación de emulsiones tipo W/O/W en un paso; esto incluye agitación mecánica fuerte de la fase acuosa que contiene

un emulgente hidrófilo, y una fase de aceite conteniendo grandes cantidades de emulgente lipófilo, para formar una emulsión W/O, pero parte de ésta, tiende a invertirse para dar una emulsión doble W/O/W (Garti y Aserin, 1996).

En la mayoría de los estudios recientes, las emulsiones dobles (W/O/W) se preparan en dos pasos: la primera emulsión (W/O) se prepara con emulgente lipófilo (10-30% p/p), bajo condiciones de agitación severa y la segunda (W/O/W), con el emulgente hidrófilo (0.5-5% p/p) con agitación no severa, para evitar romper las gotas formadas. Este proceso se realiza utilizando generalmente agitadores mecánicos convencionales, homogeneizadores a altas presiones, por ultrasonido u homogeneizadores de membrana (Kumar *et al.*, 2012; McClements *et al.*, 2009).

El reto para el científico en alimentos es desarrollar productos que utilicen no los emulgentes tradicionales de la industria farmacéutica y cosmética, sino aquellos de grado alimenticio estabilizados con biopolímeros naturales y no con emulgentes sintéticos, los cuales tienen restricciones de consumo. De esa manera, la atención se ha enfocado hacia la búsqueda de proteínas y

polisacáridos que ofrezcan buenas características como emulgentes. Para el caso de alimentos bajos en grasa, se espera reemplazar cierta cantidad de aceite en la emulsión, por agua en el interior de las gotas de aceite sin que se altere significativamente la viscosidad total. En casos en los que la fase interna no es fácilmente liberada en la boca, se pueden diseñar emulsiones W/O/W para influenciar percepciones de sabor (ácidos, sales, compuestos amargos, etc.) modificando el grado en que la fase acuosa interactúa con las superficies orales. El problema, es que no es fácil elaborar emulsiones dobles alimentarias, debido a su inestabilidad. En otras aplicaciones, dicho problema se resolvería agregando la cantidad de emulgente necesario, como los ésteres de sorbitán y copolímeros sintéticos, pero para los productos alimenticios, existe restricción en ese tema (Garti y Lutz, 2004; Kralova y Sjöblom, 2009).

2. Problemas de inestabilidad

El rompimiento de una emulsión doble puede seguir una serie de caminos dependiendo de su composición y microestructura. Una

representación esquemática se muestra en la Fig. 2, donde los principales mecanismos de rompimiento son: a) coalescencia de la gota exterior, b) coalescencia de la gota interior, c) coalescencia de la gota exterior e interior y d) hinchamiento o encogimiento de la gota interna, provocando en ambos casos la pérdida del material encapsulado (Kumar *et al.*, 2012).

La fase de aceite en una emulsión W/O/W es referida comúnmente como una especie de membrana líquida, que separa a la dos fases acuosas (interna y externa). Dependiendo del gradiente de presión osmótica entre ambas fases acuosas, existe una fuerza impulsora del agua de pasar de un lado al otro a través de esa película de aceite. Cuando la fase interna tiene una presión osmótica menor a la externa, se crea una contracción de las gotas internas, en el caso contrario, se produce una hinchazón de las mismas, con la subsecuente ruptura de la membrana de aceite y la pérdida del ingrediente encapsulado. De ahí que la incorporación de electrolitos en la dosis necesaria para controlar el balance osmótico del sistema, es muy útil para evitar algunos de estos problemas (Dickinson, 2011).

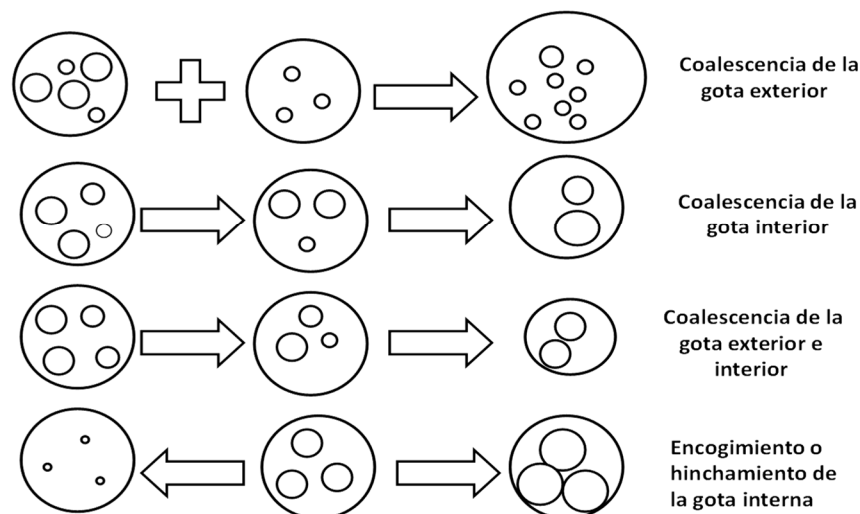


Fig.2. Representación esquemática de los principales mecanismos de rompimiento de una emulsión doble. Adaptado de Dickinson (2011).

Una manera de medir la estabilidad de una emulsión doble es el rendimiento, y se refiere al porcentaje de la fase acuosa de la primera emulsión (W1), que permanece en la fase interna al realizar la segunda emulsión. Durante la preparación de la segunda emulsión, se rompen algunas de las gotas formadas en la primera. Se dice que una emulsión tiene un buen rendimiento inmediatamente después de ser formada, si éste es del 95%, y si es del 70-80% después de algunas semanas de almacenamiento inactivo. En algunos casos se requiere que se libere rápidamente el principio activo, esto se logra diluyendo la emulsión en una solución hiposmótica, aplicando una agitación moderada o sometiendo a la fase de aceite a un ciclo de congelado y descongelado (Dickinson, 2011; McClements *et al.*, 2009).

3. Factores que afectan la estabilidad de una emulsión doble

3.1. Generalidades

Varios factores afectan la estabilidad de una emulsión W/O/W, los dos principales son: primero, la migración del emulgente lipófilo presente en la emulsión primaria, a la fase acuosa externa y segundo, la adecuada selección de la concentración del emulgente hidrófilo secundario. Una inadecuada elección de concentración del emulgente puede originar una inversión de fases de la emulsión múltiple W/O/W, a una emulsión sencilla O/W. Otro factor que interfiere en la estabilidad de estas emulsiones W/O/W, es la migración de agua entre la fase acuosa interna y la fase acuosa externa, que se ve afectada por las magnitudes de los gradientes de presión osmótica entre ambas fases, las que a su vez se ven influenciadas por la naturaleza y concentración de los emulgentes de la fase oleosa, y de todos los ingredientes que se encapsulan en la fase acuosa interna, o de aquéllos que se separan de la fase acuosa externa (Jager-Lezer *et al.*, 1997).

Los compuestos ionizados no son los únicos materiales que pueden ser transportados a través de la membrana de aceite en una emulsión W/O/W. Se ha demostrado que moléculas de electrolitos y sustancias no electrolíticas solubles en agua, pueden fácilmente migrar a través de la membrana de aceite sin afectar la estabilidad de la emulsión doble (Kita *et al.*, 1977). Se han sugerido dos posibles mecanismos para la permeación de agua y materiales solubles en agua a través de la fase de aceite; el primero “vía transporte micelar inverso” y el segundo, por “difusión a través de las delgadas láminas formadas por el emulgente”, donde la película de aceite es muy delgada (Dickinson, 2011). El transporte micelar se presenta, cuando se excede la cantidad de emulgente lipófilo y se forman micelas, constituidas por el emulgente monomérico, la sección lipófila de la película de aceite y el principio activo hidrófilo localizado en la gota interna, el cual es arrastrado. La difusión, es el mecanismo más común y obedece a los principios de la ley de Fick (Kumar *et al.*, 2012).

3.2. Tipo y concentración del emulgente

Sin duda, el tipo de emulgente o emulgentes seleccionados para la elaboración de una emulsión doble, es uno de los factores más importantes para la estabilidad de estas emulsiones. De ellos dependerá, entre otras cosas, qué tan resistente queda esa película estabilizadora que dará las características deseadas a la emulsión y que separa la fase acuosa interna de la externa. El tipo de morfología resultante depende asimismo, del método de preparación de la emulsión (Dickinson y McClements, 1996).

Las emulsiones W/O/W requieren al menos dos emulgentes, uno lipófilo y uno hidrófilo, que ayuden a formar y estabilizar la emulsión. Los emulgentes pueden ser clasificados de diferentes maneras; se clasifican por su número de regiones hidrófilas en

monofuncionales y multifuncionales. Los emulgentes monofuncionales poseen sólo una región hidrófila; los multifuncionales, en contraste, tienen varios grupos hidrófilos y también, en la mayoría de los casos, más de un grupo lipófilo. Por su carga eléctrica se clasifican en aniónicos, anfotéricos, catiónicos y no iónicos. Pueden ser clasificados en poliméricos y monoméricos; tales clasificaciones no son excluyentes. Por ejemplo, el Grindsted o PGPR (poliglicerol polirricinoleato) puede ser clasificado como polimérico a pesar de ser multifuncional. Los emulgentes utilizados en la industria

alimentaria son principalmente no iónicos (monoacilgliceroles, ésteres de ácidos grasos de sacarosa), aniónicos (sales de ácidos grasos, estearoil-2-lactato de sodio), o anfotéricos (lecitina). En la Fig.3 se presenta una clasificación de emulgentes utilizados en la industria alimentaria. En el mercado existe un gran número de emulgentes pero no todos funcionan adecuadamente en cualquier alimento; de acuerdo con su composición y estado de dispersión, cada sistema requiere de un emulgente específico. Por esta razón, la selección del emulgente adecuado debe ser muy cuidadosa (Kralova y Sjöblom, 2009)

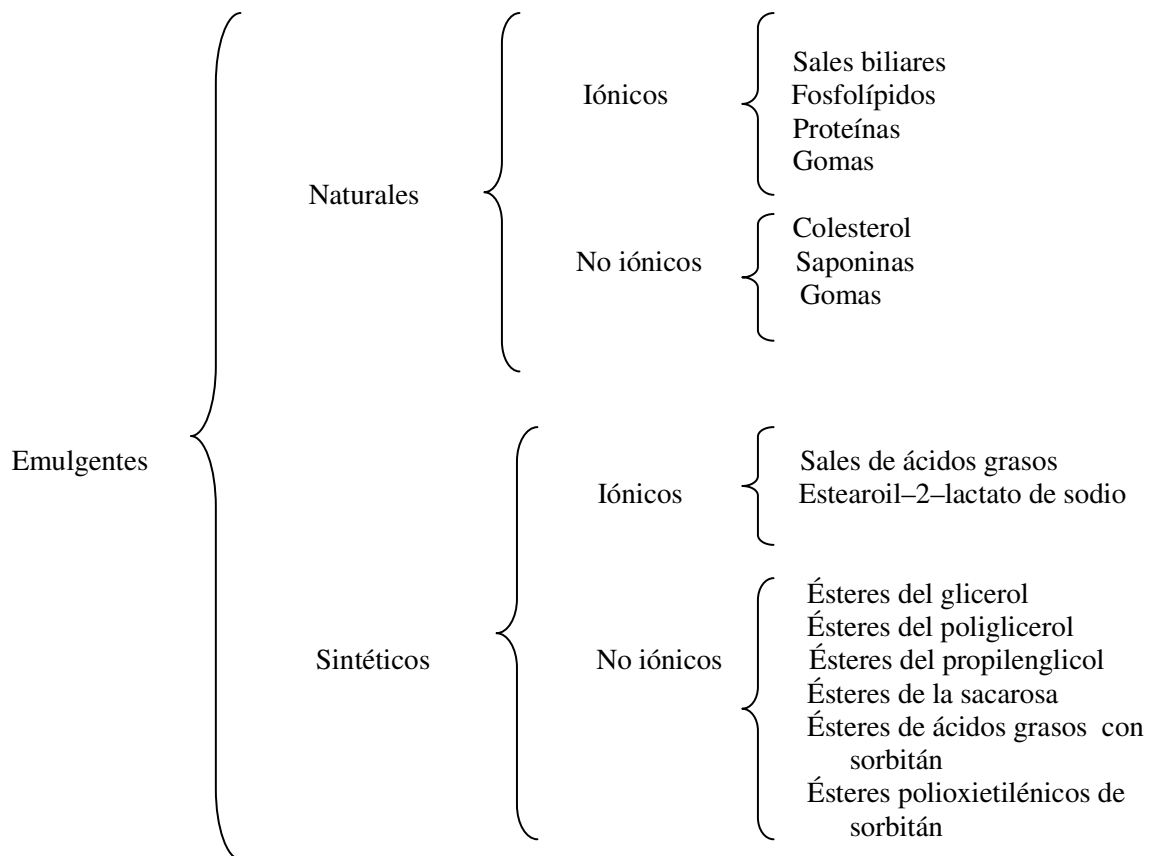


Fig. 3. Clasificación de emulgentes usados en alimentos. (Adaptada de Badui-Dergal *et al.* (1999).

En la práctica, el método de las dos etapas de homogeneización es el que se ha empleado para lograr emulsiones de tamaño de gota reproducibles, e involucra el formar una fina emulsión agua en aceite (W/O) usando una alta proporción de emulgente lipófilo, y luego, dispersando la emulsión primaria en agua, utilizando un nivel bajo de un emulgente hidrófilo. Hasta hace pocos años, la mayoría de los estudios relacionados a emulsiones dobles reportaban el uso de emulgentes de bajo peso molecular (Spans, Tweens y Brijes), lo cual permitió establecer una serie de recomendaciones empíricas para la preparación de emulsiones dobles (McClements *et al.*, 2009). El emulgente lipófilo, puede desestabilizar la emulsión doble si migra de la interfase agua-aceite interna a la interfase aceite-agua externa. Además, el emulgente hidrófilo presente durante la segunda etapa de la homogeneización, puede desestabilizar a la emulsión primaria original. Por ello se ha buscado optimizar la mezcla de emulgentes lipófilos e hidrófilos que mejores características otorguen a la emulsión doble (Sela *et al.*, 1995). Otro efecto detrimental, ocurre cuando se usa una concentración alta de emulgente hidrófilo (emulgente para la segunda emulsión) en la fase acuosa externa, ya que las gotas externas de la emulsión W/O/W se vuelven tan pequeñas, que durante el proceso de la segunda etapa de homogeneización, las gotas acuosas internas son alteradas o rotas. Por esta razón, se emplean por lo general muy bajas concentraciones de emulgente hidrófilo en la formulación de emulsiones W/O/W (Dickinson y McClements, 1996).

El uso de emulsiones dobles formuladas con emulgentes de bajo peso molecular no ha resultado exitoso en la práctica, ya que estos sistemas por lo general no pueden ser usados en procesos donde ocurren perturbaciones hidrodinámicas, que causan rompimiento de la emulsión interna y de la emulsión doble. Se

ha propuesto la incorporación de un espesante o un polímero gelificante en la fase acuosa interna de la emulsión primaria. La idea es que la presencia de este polisacárido conduzca a una estructura viscoelástica tipo gel en todas las gotas acuosas internas y en la interfase entre la fase acuosa interna y la fase de aceite. La formación de una membrana gelatinosa en la interfase agua-aceite actúa como una barrera física, para evitar la coalescencia de las gotas internas (Dickinson y McClements, 1996; Kralova y Sjöblom, 2009; McClements *et al.*, 2009).

Las investigaciones en el área de alimentos de este tipo de emulsiones dobles se han encaminado a mejorar su estabilidad usando mezclas binarias de emulgentes de bajo peso molecular en la formulación de la emulsión W1/O, y sustituyendo el emulgente hidrófilo presente en la fase acuosa externa, por materiales biopoliméricos. Considerando que varios factores fisicoquímicos afectan la estabilidad de la emulsión W1/O/W2, es necesario el uso de biopolímeros o mezclas de éstos que actúen como emulgentes, presentando no sólo una actividad superficial relativamente alta como las proteínas, sino también propiedades de solvatación de la fase acuosa, como los polisacáridos. Lo anterior, implica el uso de complejos proteína-polisacárido (Baeza *et al.*, 2002; Tolstoguzov, 2003). La naturaleza y fuerza de las interacciones entre estas moléculas contribuyen a la estabilidad, características estructurales y funcionales del sistema disperso. En la Tabla I, se presentan las características comunes y diferencias entre proteínas y polisacáridos, como biopolímeros funcionales en sistemas alimenticios. Dependiendo de la química del biopolímero y de las condiciones de la solución (temperatura, pH, fuerza iónica, entre otras), estas interacciones pueden ser repulsivas o atractivas, débiles o fuertes, específicas o no específicas (Kruif y Tuinier, 2001).

Tabla I. Características comunes y diferencias entre proteínas y polisacáridos como biopolímeros funcionales en sistemas alimenticios.**Similitudes**

Polímeros naturales
 Ampliamente distribuidos en alimentos
 Usados en farmacéuticos, cosméticos y productos personales
 Polímeros amigables al medio ambiente
 Estructura complicada
 Comportamiento de agregación compleja
 Agentes gelantes/estabilizantes

Diferencias

<i>Proteínas</i>	<i>Polisacáridos</i>
Estructuras muy diversas	Estructuras similares
Reactivas	No reactivas
Monodispersas	Polidispersos
Muchos tipos de segmentos	Pocos tipos de segmentos
Cadena lineal	Cadena lineal o ramificada
Cadena flexible	Cadena rígida
Peso molecular medio	Alto peso molecular
Volumen molecular pequeño	Alto volumen molecular
Amfifílicas	Hidrófilos
Superficialmente activas	Sin actividad superficial
Polielectrolitos	No iónicos o cargados
Emulgente/espumante	Espesante/retención de agua
Sensible a la temperatura	Insensible a temperatura
Fuerte interacción con surfactantes	Baja interacción con surfactantes

Adaptado de Dickinson (2003).

3.2.1. Balance hidrófilo lipófilo (BHL)

El BHL es un método semiempírico que es ampliamente usado para la clasificación de emulgentes no iónicos. El valor del BHL de un emulgente es un indicador de su grado de solubilidad en la fase acuosa o en la fase oleosa, y puede ser usado dependiendo del tipo de emulsión que será formada. Cada emulgente tiene asignado un valor de BHL de acuerdo con su estructura química. En la escala utilizada los valores para este término

van de 0.5 a 19.5, el punto medio del balance es el 10, de ahí hacia abajo son cada vez más lipófilos y del 10 hacia el 19.5 van creciendo en hidrofiliadad. Estos valores se calculan tomando en cuenta el porcentaje hidrófilo (peso molecular) de la molécula del emulgente y dividido entre cinco (únicamente por facilidad de manejo). Fue William C. Griffin (1971) quien acuñó el término y la metodología para el cálculo de su valor (Kralova y Sjöblom, 2009). Cuando se escucha un valor de BHL para un emulgente

iónico, es sólo un número comparativo y no un cálculo matemático. Podemos decir que para emulsiones agua en aceite (W/O), escogeríamos un emulgente con un valor de BHL entre 4 y 6 y para aceite en agua (O/W), de entre 8 y 16; por lo tanto, para una emulsión doble, se utilizaría por lo menos, uno lipófilo y otro hidrófilo (Kralova y Sjöblom, 2009).

Algunos emulgentes utilizados en la industria alimentaria y su BHL son presentados en la Tabla II. Las mezclas de los distintos emulgentes ofrecen una alternativa cuando no se tiene uno con el valor deseado para un sistema en particular.

Para la selección de un emulgente es necesario considerar primero si es aniónico o catiónico, no-iónico o anfotérico; segundo,

determinar la solubilidad buscada con base en el compuesto a disolver (hidrófilo o lipófilo); tercero, cómo afectará dicha solubilidad al comportamiento deseado, en el caso de emulsiones dobles es conveniente encontrar una mezcla apropiada de éstos, para ambas interfases.

La mayoría de los estudios entre los años 1970 y 1985 se enfocaban a la búsqueda de una mezcla apropiada de dichos emulgentes, que proporcionara las mejores características en la emulsión. En gran parte de los casos, la cantidad de emulgente interno es mayor que la del externo. Matsumoto *et al.* (1985) han establecido una relación aproximada de 10 a 1 entre el emulgente lipófilo e hidrófilo respectivamente, para la elaboración de emulsiones dobles (Jiménez-Alvarado *et al.*, 2009).

Tabla II. Emulgentes empleados en la industria alimentaria y su BHL.

Emulgente	BHL
Acido oleico	1
Monoglicéridos acetilados (ACETEM)	1.5
Dioleato de glicerol	1.8
Triestearato de sorbitán (Span 65)	2.1
Monoestearato de propilenglicol	3.4
Monoestearato de glicerol	3.8
Poliglicerol Polirricinoleato (Grindsted PGPR)	4.3
Monoestearato de sorbitán (Span 60)	4.6
Monoestearato de diglicerilo	5.5
Monopalmitato de sorbitán	6.7
Monoestearato de triglicerol	7
Ésteres del ácido acetyl tartárico (Panodán DATEM)	8
Monolaurato de sorbitán	8.6
Dioleato de hexaglicerol	9
Trioleato de sorbitán y polioxietileno (Tween 85)	10.5
Triestearato de Sorbitán y polioxietileno (Tween 65)	10.9
Dioleato de decaglicerol	12
Monoglicérido etoxilado	13
Monooleato de decaglicerol	14
Monolaurato de sorbitán y polioxietileno (Tween 20)	14.9
Monooleato de sorbitán y polioxietileno (Tween 80)	15
Monopalmitato de sorbitán y polioxietileno (Tween 40)	15.6
Oleato de sodio	18
Oleato de potasio	20
Estearoil-2-lactato de sodio	20

Información compilada de: McClements (2005), Badui-Dergal (1999).

El valor del BHL para una mezcla de emulgentes corresponde al valor ponderado de sus BHL individuales y la proporción en peso utilizada. En un estudio como el de Schmidts *et al.* (2010), se realizaron una serie de mezclas de emulgentes y con éstos analizaron la estabilidad de las emulsiones dobles formadas, respecto al grado de cremosidad, viscosidad, tamaño de gota, conductividad y potencial Z. Así, encontraron la mezcla de emulgentes que mostró la mejor estabilidad para la emulsión doble en cuestión.

3.2.2. Emulgentes poliméricos naturales

La estabilidad de las emulsiones dobles puede mejorarse formando una película polimérica en las interfases aceite-agua. Omotosho *et al.* (1990), han sugerido el uso de macromoléculas y emulgentes no iónicos para formar esos complejos estabilizadores. Al evaluar varios polímeros con este propósito, se encontró que la velocidad de liberación del material encapsulado, contenido dentro de la emulsión doble, depende del complejo formado, y esta razón de liberación sigue un patrón dependiendo la naturaleza de la fase de aceite según el siguiente orden: miristato de isopropilo > octadecano > hexadecano > dodecano > octano. Es decir, al aumentar el tamaño de cadena, se aumenta la razón de liberación, lo cual también es un reflejo del aumento del tamaño de gota en la emulsión. Los emulgentes con un BHL alto, usados como segundo agente emulgente, incrementan las razones de liberación principalmente por incrementar la razón de difusión a través de la membrana líquida no acuosa (Garti y Aserin, 1996; Dickinson, 1993).

Después del trabajo original de Herbert, se han realizado muchos estudios acerca de la incorporación de proteínas como potenciales agentes activos en emulsiones W/O/W, para aplicaciones farmacéuticas. Se han encontrado que cantidades más bien bajas de esas proteínas como albúmina de suero de bovino,

en combinación con emulgentes lipófilos como el Span 80 o 60, mejoran la estabilidad de las emulsiones, posiblemente por formar barreras viscoelásticas más estables, que evitan la coalescencia y pérdida de moléculas pequeñas de la fase interna (Dickinson, 2011).

Frank y Oza (1989), utilizaron celulosa microcristalina coloidal y varios emulgentes monoméricos para estabilizar emulsiones dobles, vía un mecanismo de estabilización mecánico. Se obtuvieron emulsiones dobles estables, por un mes. Se logró además, disminuir la razón de liberación por gelación de la fase de aceite. Garti *et al.* (1994), utilizaron albumina de suero de bovino (ASB) como emulgente polimérico, añadido a ambas fases acuosas, externa e interna, en ausencia y presencia de emulgentes convencionales monoméricos (Span 80 y Tween 80). Evaluaron el mecanismo de liberación de un electrolito (Na^+), de la fase acuosa interna hacia la externa, ya que se creía, que el mecanismo de liberación está asociado con el transporte micelar, el cual es controlado por difusión. Se realizaron intentos para obtener emulsiones dobles estables con gotas relativamente pequeñas, y un mínimo de capacidad de micelización. Los resultados revelaron, que la ASB al 0.2% en peso en la fase acuosa interna, disminuyó la velocidad de liberación. Además, las emulsiones permanecieron estables sin ningún cambio en tamaño de gota por 25 horas. De acuerdo a otros estudios, se sugiere que los emulgentes poliméricos forman un complejo con los emulgentes lipófilos monoméricos, siendo este complejo una película gruesa y de fuerte gelificación, la cual imparte resistencia a la ruptura de las gotas internas. La película mejora la estabilidad mecánica y estérica de la emulsión doble, y disminuye la razón de coalescencia. Además, parece ser que deprime la formación de micelas inversas en la fase de aceite, disminuyendo así el transporte de electrolitos vía este mecanismo. Sin embargo, los emulgentes monoméricos que cubren la

interfase externa, no previenen la coalescencia de las gotas externas en las emulsiones dobles. De hecho, después de una semana de almacenamiento, se detecta un incremento en la distribución del tamaño de gota así como una fuerte floculación. De tal manera que al agregar ASB, también a la fase acuosa externa, además de los emulgentes monoméricos, se disminuyó el tamaño de gota, lo cual contribuyó a mejorar la estabilidad de la emulsión doble (Garti y Lutz, 2004).

El evitar la agitación vigorosa en la segunda homogeneización, previene la ruptura de las gotas y una posible inversión a una emulsión simple, con la consecuente pérdida de el principio a encapsular; por otro lado, la agitación demasiado lenta, no producirá gotas lo suficientemente pequeñas, lo cual disminuye la estabilidad de la emulsión doble y facilita la coalescencia. Con el uso de emulgentes poliméricos se busca encontrar un punto intermedio, optimizando la velocidad de agitación.

3.3. Biopolímeros en las gotas internas de emulsiones dobles

Dickinson (2011) señala tres beneficios técnicos del uso de biopolímeros como agentes estabilizantes en emulsiones dobles:

1. En comparación con los emulgentes de bajo peso molecular, la migración de los biopolímeros por difusión u otro mecanismo hacia las fases acuosas es menor.
2. Los biopolímeros pueden formar estructuras de red estabilizadoras con las fases acuosas dispersas y continuas.
3. Los biopolímeros de superficie activa, pueden usarse como estabilizadores efectivos de la interfase externa aceite-agua, en las gotas externas de emulsiones W/O/W.

Se han investigado varios biopolímeros alimenticios, como gelatina, caseína, proteína de suero, proteína de habas, goma acacia y goma de xantana. La gelatina (1% p/p), ha mostrado mejorar el rendimiento del material encapsulado en las gotas internas acuosas, así como un incremento en la estabilidad de las emulsiones. En emulsiones del tipo W/O/W, elaboradas con PGPR (poliglicerol polirricinoleato) como emulgente lipófilo, se encontró que el agregar 0.5% p/p de caseinato de sodio en la fase acuosa interna, ayudó a reducir del 8% al 2% en peso la cantidad de PGPR necesaria, sin afectar el rendimiento o estabilidad. Ese efecto sinérgico del caseinato, se atribuye no sólo a la formación de una barrera viscoelástica en la película, sino también, a su actuación como agente quelante de cationes como el magnesio, lo cual contribuye a evitar la pérdida de éstos y otros iones (Garti y Lutz, 2004; Mun *et al.*, 2010).

Se ha utilizado almidón gelificado dentro de las gotas internas, logrando reducir la velocidad de liberación de un principio hidrófilo dentro de la gota. Pero, la presencia del almidón complica la formación de la emulsión doble; además, la alta viscosidad de la fase acuosa, incrementa la cantidad de emulgente necesario. Se crean asimismo, complejos no deseados, entre el almidón y los emulgentes no iónicos como el Span 80 y el Tween 80 (Dickinson, 2011).

3.4. Biopolímeros en las gotas externas de emulsiones dobles

Las proteínas son muy buenos agentes estabilizadores de la segunda emulsión, tal como lo son para emulsiones simples. Una ventaja adicional, es que éstas son insolubles en aceite, por lo cual no tienden a migrar a la interfase interna aceite-agua, o interferir con la estabilidad de la fase acuosa interna. En las emulsiones O/W, es común el agregar polisacáridos en baja concentración como agentes gelificantes y espesantes, para

alcanzar las propiedades reológicas deseadas. Este mismo principio, puede aplicarse para las emulsiones dobles (McClements *et al.*, 2009; Weiss y Mushiolik, 2007; Garti y Reichman, 1993).

Para la estabilización de las gotas externas en las emulsiones dobles, se han estudiado diferentes proteínas incluyendo caseinato de sodio, gelatina, albumina de suero de bovino, y aislado de proteína de suero de leche; así como algunos hidrocoloides como goma arábica y almidones modificados. Se han realizados pruebas con polisacáridos solubles como pectina, carragenina, alginato, xantano, gelano, semilla de algarroba, carboximetilcelulosa y partículas coloidales de celulosa microcristalina. La presencia de un hidrocoloide como la maltodextrina o goma arábica en la fase acuosa externa de una emulsión W/O/W, es esencial si dicha emulsión será convertida en microcápsulas por secado por aspersión. Utilizando caseinato de sodio como el segundo emulgente y altas presiones, se ha observado la producción de emulsiones finas W/O/W (gotas externas de micras) y un rendimiento relativamente alto, respecto a emulsiones preparadas sin altas presiones. En este caso, al aumentar la cantidad de caseinato, se disminuye el rendimiento y el tamaño de gota, de tal manera que es necesario buscar un punto medio entre estos dos factores. Otro aspecto que afecta el rendimiento, es la intensidad de agitación o presión durante la segunda etapa de elaboración de la emulsión, al aumentar la presión o velocidad de agitación, disminuye el rendimiento, debido posiblemente a ruptura o coalescencia de las gotas. Se ha encontrado, que el componente glicoproteico de la goma arábica, confiere propiedades emulgentes únicas en las emulsiones, pero es necesario agregarla en concentraciones de alrededor del 10% (p/p). Esta glicoproteína provee una estabilidad coloidal contra la floculación, en un rango mayor de pH (Dickinson, 2011).

3.5. Complejos conjugados proteína-polisacárido

En estos complejos de biopolímeros, las moléculas de proteína y polisacárido deben ser unidas permanentemente (vía enlace covalentes) o reversiblemente (vía interacciones electrostáticas) (Dickinson y McClements, 1996).

Uno de los métodos más utilizados para la formación de híbridos proteína-polisacárido con enlaces covalentes es mediante el secado controlado. Esta conjugación tipo Maillard inducida por el tratamiento de calor seco, conduce a una mejora en la solubilidad de las proteínas y en la estabilidad de la emulsión, bajo condiciones desfavorables de la solución acuosa, como pH bajos y alta fuerza iónica. Esta mejora en la funcionalidad, se debe a un incremento en la hidrofiliidad del conjugado y en su capacidad de estabilización estérica, comparada con la proteína sola. Un ejemplo de estos conjugados es el de caseína-dextrano, utilizado para estabilizar la gota externa en emulsiones W/O/W (Dickinson, 2003). Dickinson y McClements (1996) utilizaron un conjugado de este tipo en sustitución del caseinato de sodio, mostrando gotas más pequeñas a pH neutro, mejorando la estabilidad de la emulsión y evitando la coalescencia, bajo condiciones ácidas, además de una mejor encapsulación del principio activo (vitamina B12), dentro de las gotas internas.

Garti y Lutz (2004) han descrito la estabilización de emulsiones dobles con sistemas APS (aislado de proteína de suero de leche)-goma de xantana y APS-galactomananos (goma de algarroba, goma guar y goma de fenogreco).

Jiménez-Alvarado *et al.* (2009) por su parte, investigaron sistemas con concentrado de proteína de suero -goma arábica, pectina o goma de mesquite. En esos estudios, la

sensibilidad al pH de los complejos descritos, en la superficie de las gotas de las emulsiones W/O/W, era indicado por una combinación de mediciones reológicas y del potencial Z. En los trabajos indicados las propiedades de las emulsiones como son tamaño de gota y el encapsulado de principios activos, eran sustancialmente mejorados. Dependiendo del pH y el grado de esterificación, la pectina puede interactuar con proteínas de leche para formar una gama de estructuras estabilizadoras en emulsiones y geles. De tal manera, la interacción de las pectinas con caseínas y proteínas de suero, tiene buen potencial en el desarrollo de nuevos productos alimenticios, que contienen gotas de emulsiones dobles. Por ejemplo, en el diseño de emulsiones dobles para películas comestibles.

3.6. Temperatura

El efecto de la temperatura para la formación y estabilidad de las emulsiones es importante. De ésta, depende el tipo de interacciones entre las moléculas presentes. Muchos de los conceptos y experimentos mencionados se manejan a temperaturas cercanas a 20-25°C, pero algunos procesos industriales manejan temperaturas alejadas de esos valores, lo cual es necesario considerar. La temperatura tiene acción directa en la solubilidad de todos los compuestos presentes (aceites, proteínas, polisacáridos, emulgentes) y sus interacciones, así como en la viscosidad de la emulsión (entre otros factores). La temperatura a la cual una emulsión cambia su fase dispersa a continua (W/O a O/W o viceversa), se denomina temperatura de inversión de fase (TIF) y se debe conocer en nuestro sistema a preparar, para evitar llegar a ese punto. Por otro lado, las emulsiones con componentes alimenticios, requerirán en muchas ocasiones, de algún tratamiento térmico que coadyuve a la estabilidad antimicrobiana. Otros procesos podrían incluir congelado-descongelado. Se espera que las emulsiones logradas, resistan

ciertas condiciones de temperatura esperadas (McClements *et al.*, 2009).

Shinoda y Arai (1964) y Shinoda y Saito (1969), presentaron estudios muy interesantes que en la actualidad seguimos confirmando, con pocas excepciones, con la siguientes conclusiones: a) entre más soluble es el emulgente no iónico respecto a la fase oleosa y viceversa, más baja es la temperatura de inversión de fase (TIF); b) al aumentar la TIF, aumenta el punto de enturbiamiento (punto en el cual la emulsión pasa de transparente a turbia); c) entre más larga es la cadena hidrófila del emulgente, más alta es la TIF y el punto de enturbiamiento; d) los tamaños de gota en la emulsión cambian sustancialmente con la variación en la temperatura y el BHL de los emulgentes; e) el diámetro de las gotas es muy pequeño, pero menos estable contra la coalescencia cercano a la TIF; f) se pueden obtener emulsiones O/W estables, si las TIF de los sistemas obtenidos, son 20-65°C más grandes, que las temperaturas de almacenamiento; g) la estabilidad de las emulsiones se mejora, si éstas son enfriadas rápidamente, después de haber sido formadas a temperaturas cercanas y por debajo de la TIF. Los estudios de Hsu y Nacu (2002) en aceite de soya, confirman lo mencionado, respecto al tamaño de gota en la emulsión y la temperatura.

Es importante que la temperatura se mantenga por arriba de la temperatura de cristalización de los lípidos presentes, para evitar solidificación de grasas durante la homogeneización (McClements *et al.*, 2009)

3.7. Potencial Z, tamaño de gota, pH y concentración de iones en la emulsión doble

A menor tamaño de gota, mayor es la estabilidad de la emulsión doble. El pH juega un papel importante a considerar en una emulsión, debido sobre todo, a las diferentes interacciones electrostáticas que se tienen al

variario y la manera en que afecta a la estructura de los biopolímeros presentes, misma que modificará las interacciones entre ellos y la estabilidad de la emulsión (McClements *et al.*, 2009). La forma más común de medir estas interacciones es por medio del potencial Z. A continuación se dará una explicación breve de este concepto y su relación con el pH y la estabilidad de las emulsiones.

Las emulsiones se comportan como cualquier coloide y sus partículas (fase dispersa) en suspensión (en la fase continua) están cargadas en mayor o menor medida, lo cual las hace repelerse unas con otras y evitar acoplamiento o aglomeraciones que se darán más fácilmente entre menos carga exista. Esta carga puede variar de fuerte a débil; entre mayor sea, mayor será la repulsión y más estable será la emulsión. Si no existe repulsión, las partículas tienden a unirse unas con otras, lo cual provoca una separación de las fases.

El potencial Z, es una medida del potencial eléctrico en la superficie interfacial de las partículas suspendidas. Sus unidades son los milivoltios (mV). En la Fig. 4 puede observarse su variación con respecto al pH. Valores de -30 a 30 mV indican inestabilidad en el sistema, valores por debajo de -30 y arriba de 30 mV, indican aumento en la

estabilidad, siendo ésta, cada vez mayor conforme aumenta (de forma absoluta) el valor del potencial Z.

La medición se realiza en una celda electroforética, con dos electrodos conectados a una fuente de poder, esto crea un campo eléctrico. Los coloides migran, y dependiendo de su movimiento y dirección se tiene el valor del potencial Z (Zeta-Meter, Inc, 2012).

El valor del potencial Z se ve marcadamente afectado por el pH de la emulsión, por el efecto de éste en la carga de las partículas. Así, las variaciones en el pH resultarán en variaciones en el potencial Z y por tanto, en la estabilidad de la emulsión. En una dispersión proteica, por ejemplo, un potencial Z de cero a cierto pH, coincide con el punto isoeléctrico, y provocará precipitación de estas macromoléculas (Maldonado *et al.*, 2011).

La existencia de iones en la fase acuosa de la emulsión, tiene también un efecto directo en el valor del potencial Z y por ende, en la estabilidad de la emulsión. El tamaño de gota, independientemente de que el tipo y concentración de emulgentes, temperatura y características de la homogeneización, tienen efecto sobre su tamaño, se ve asimismo, influenciado por los valores del pH y concentración electrolítica.

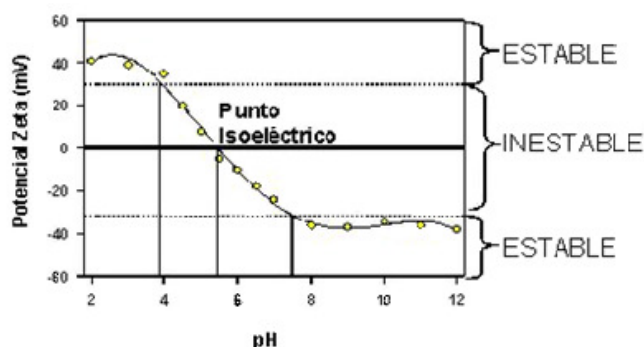


Fig. 4. Representación gráfica de la variación del potencial Z en función del pH. Adaptado de Zeta-Meter, Inc. (2012).

Maldonado *et al.* (2011), en su estudio sobre la influencia del pH en la estabilidad de emulsiones elaboradas con proteínas de salvado de arroz, encontraron un tamaño de partícula significativamente menor a pH 8 que a pH 6 (37 y 63 micras respectivamente), siendo la solubilidad también mayor a pH 8, lo cual contribuyó a crear una emulsión más estable a ese valor.

Weiss y Muschiolik (2007), realizaron un estudio para determinar el efecto de la composición de la fase oleosa, la tensión interfacial en las dos interfases y la viscosidad de la fase de aceite en el tamaño de partícula de la gota interna W1 y de la gota de aceite W1/O, concluyendo los siguiente: a) la tensión interfacial en la interfase W1/O aumenta, si se incrementa el porcentaje de ácidos grasos de cadena media (C8, C10) en la fase de aceite, esto incrementa el tamaño de gota W1 y disminuye el tamaño de la gota de aceite (O); caso contrario para ácidos grasos de cadena larga (C16-C20); b) el tamaño de la gota W1/O, aumenta al aumentar la viscosidad del aceite y disminuye el tamaño de gota W1; c) la viscosidad del aceite no debe exceder cierto valor crítico, pues provocará que la fase dispersa W1/O no se rompa (segunda emulsión) en gotas lo suficientemente pequeñas para ser estable. Los autores mencionados, desarrollaron una ecuación para predecir el tamaño de gota W1 y W1/O, dependiendo de la concentración de ácidos grasos de cierto tamaño, de la tensión interfacial y de la viscosidad del aceite, con buena correlación.

Por otra parte, Onsaard *et al.* (2005), en su trabajo sobre propiedades y estabilidad de emulsiones estabilizadas con proteínas de leche de coco, analizaron, entre otras cosas, la influencia del pH, concentración de NaCl en la fase acuosa y el efecto de la temperatura del tratamiento térmico, sobre la estabilidad de la emulsión, encontrando que el potencial Z va de +60 mV a -70 mV cuando se pasa de pH 3

a 8, mostrando gran estabilidad a pH 7; el tamaño de partícula se incrementa al variar el pH, mostrando un máximo en los valores del punto isoeléctrico (floculación) y disminuyendo conforme éste sigue aumentando. Al aumentar la concentración de NaCl se encontró un aumento en el tamaño de partícula, efecto que fue compensado con el hecho de que aumentó a la vez, la solubilidad de las proteínas, y sugieren que esto sucede ya que la proteína debe estar soluble, para migrar a la interfase y ubicarse en ella. Hsu y Nacu (2002), en su investigación sobre el comportamiento de emulsiones de agua en aceite de soya estabilizadas por emulgentes no iónicos, confirmaron que el potencial Z es fuertemente dependiente del pH y que existe gran influencia también de éste y la concentración de los iones Na^{+1} y K^{+1} , siendo grandes concentraciones de éstos, capaces de separar la fase oleosa de la emulsión; que los cationes divalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} a altas concentraciones, pueden llevar a la emulsión a una zona de carga cero, lo cual no sucede con cationes trivalentes como Al^{3+} y Fe^{3+} .

3.8. Viscosidad

La fracción de volumen de la emulsión primaria, en el sistema de emulsión doble, cambia debido a la difusión del agua. El cambio en esta fracción de volumen de la emulsión primaria, afecta las propiedades reológicas de la emulsión doble. Como en las emulsiones simples, la manera en que las emulsiones dobles fluyen, es una de sus características más importantes. Por eso, el entendimiento del comportamiento reológico de las emulsiones dobles es importante en la formulación, manejo, mezclado, procesado, transporte y almacenamiento de dichos sistemas. Aún más, los estudios reológicos pueden proveer información útil de la estabilidad y microestructura interna de las emulsiones dobles (Jiao y Burgess, 2003).

En un estudio realizado por los autores antes citados, se analizó el comportamiento reológico de una emulsión doble, ante cambios en concentración para los emulgentes hidrófilo (Tween 80) y lipófilo (Span 83), encontrando que a medida que se aumenta la concentración del emulgente hidrófilo, disminuye la estabilidad de la emulsión, ya que la viscosidad de la película interfacial disminuye, al aumentar la solubilidad de la misma y hace que se rompan más fácilmente las gotas de aceite. Al aumentar el emulgente lipófilo, se incrementa el valor del módulo G' y con ello la estabilidad de la emulsión. El NaCl tiene un efecto ambiguo en la estabilidad de las emulsiones dobles; por un lado, mejora algunos factores que ayudan a crear una película más firme, y por otro lado, puede alterar el balance osmótico de la fase interna, provocando coalescencia de las gotas internas.

La estabilidad de una emulsión W/O/W se incrementa con la disminución de la polaridad y el incremento de la viscosidad de la fase oleosa (Weiss y Muschiolik, 2007). La viscosidad de la fase de aceite tiene gran efecto en el tamaño de gotas en la emulsión y de ahí en la estabilidad de la misma. La composición del aceite en cuanto al largo de cadena de los ácidos grasos que lo contienen es importante. Al aumentar la proporción de ácidos grasos de cadena media (C8, C10) disminuye la viscosidad, caso contrario para ácidos grasos de cadena más larga (C16-C20).

Conclusiones y comentarios finales

Las emulsiones dobles W/O/W ofrecen expectativas en aplicaciones para la industria alimentaria, siendo muchas de ellas, excelentes posibles soluciones para mejorar los productos existentes o desarrollar nuevos, debido a los componentes encapsulados que estos sistemas pudieran contener. Sin

embargo, casi no existen productos comerciales que se encuentren en el mercado y que utilicen la aplicación de dichas emulsiones. La razón principal es la inestabilidad de estas emulsiones y la liberación no controlada del componente encapsulado. Muchos de los estudios realizados respecto a los principales factores que hay que considerar para mejorar la estabilidad de una emulsión doble varían de un sistema a otro, es decir, lo que para un caso funciona, puede no ser lo más apropiado para otro. Las tendencias de comportamiento al variar el pH, agregar un electrolito, combinar emulgentes, entre otros, siguen principios generales pero que a detalle, presentan variaciones que hacen que la investigación sobre las emulsiones en general, sea un tema apasionante. El estudio sistemático de nuevos emulgentes y su combinación con macromoléculas alimenticias, así como de las condiciones de homogeneización, nos llevará a lograr elaborar emulsiones cada vez más estables, con las características deseadas de viscosidad y tamaño de gota.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Universidad de las Américas Puebla (UDLAP) por el apoyo para la realización de este trabajo.

Referencias

- Aoki, T., Decker, E. y McClements, D.J. 2005. Influence of environmental stresses on stability of O/W emulsions containing droplets stabilized by multilayered membranes produced by a layer-by-layer electrostatic deposition technique. *Food Hydrocolloids*. 19: 209-220.

- Badui-Dergal, S., Bourges-Rodríguez, H. y Anzaldúa-Morales, A. 1999. *Química de los alimentos*. Cuarta edición. Ed. Alhambra Mexicana, México. 648 pp.
- Baeza, R.I., Carp, D.J., Perez, O.E. y Pilosof, A.M.R. 2002. K-Carrageenan-protein interactions: effect of proteins on polysaccharide gelling and textural properties. *Food Science and Technology*. 35: 741-747.
- Dickinson, E. 2003. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*. 17: 25-39.
- Dickinson, E. 2011. Double emulsions stabilized by food biopolymers. *Food Biophysics*. 6: 1-11.
- Dickinson, E. y McClements, D.J. 1996. *Advances in Food Colloids*. Blackie Academic & Professional. London.
- Dickinson, E. 1993. Protein-polysaccharide interactions in food colloids. En E. Dickinson, P. Walstra (Eds.), *Food Colloids and Polymers: Stability and Mechanical Properties*. 77-93.
- Frank, S.G. y Oza, K. P. 1989. Multiple emulsions stabilized by colloidal microcrystalline cellulose. *Journal of Dispersion Science and Technology*. 10:163-185. Citado en: Garti, N. y Aserin, A. 1996. Double emulsions stabilized by macromolecular surfactants. *Advances in Colloid and Interface Science*. 65: 37-69.
- Garti, N. y Reichman, D. 1993. Hydrocolloids as food emulsifiers and stabilizers. *Food Structure*. 12: 411-426.
- Garti, N., Aserin, A. y Cohen, Y. 1994. Mechanistic considerations on the release of electrolytes from multiple emulsions stabilized by BSA and nonionic surfactants *Journal of Controlled Release*. 29: 41-51. Citado en: Garti, N. y Aserin, A. 1996. Double emulsions stabilized by macromolecular Surfactants. *Advances in Colloid and Interface Science*. 65: 37-69.
- Garti, N. y Aserin, A. 1996. Double emulsions stabilized by macromolecular surfactants. *Advances in Colloid and Interface Science*. 65: 37-69.
- Garti, N. y Lutz, R. 2004. Recent progress in double emulsions. *Emulsions: Structure Stability and Interactions*. 4: 587-605.
- Hsu, J-P. y Nacu, A. 2002. Behavior of soybean oil-in water emulsion stabilized by nonionic surfactant. *Journal of Colloid and Interface Science*. 259: 374-381.
- Jager-Lezer, N., Terisse, I., Bruneau, F., Tokgoz S., Ferreira, L., Clausse, D., Seiller, M. y Grossiord, J.L. 1997. Influence of lipophilic surfactant on the release kinetics of water-soluble molecules entrapped in a W/O/W multiple emulsion. *Journal of Controlled Release*. 45: 1-3.
- Jiménez-Alvarado, R., Beristain, C.I., Medina-Torres, L., Román-Guerrero, A. y Vernon-Carter, E.J. 2009. Ferrous bisglycinate content and release in W1/O/W2 multiple emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes. *Food Hydrocolloids*. 23: 2425-2433.
- Jiao, J. y Burgess, D. J. 2003. Rheology and Stability of water-in oil in-water multiple emulsions containing Span 83 and Tween 80. *AAPS Pharm Scientists*. 5: 1-12.
- Kita, Y., Matsumoto, S. y Yonezawa, D. 1977. Viscometric method for estimating the stability of W/O/W type multiple-phase emulsions. *Journal of Colloid Interface Sci*. 62:87-94. Citado en: Dickinson, E. 2011. Double emulsions stabilized by food biopolymers. *Food Biophysics*. 6: 1-11.
- Kralova, I. y Sjöblom, J. 2009. Surfactants used in food industry: A Review. *Journal of Dispersion Science and Technology*. 30: 1363-1383.
- Kruif de, C.G. y Tuinier, R. 2001. Polysaccharide protein interactions. *Food Hydrocolloids*. 15: 555-563.
- Kumar, R., Kumar, M.S. y Mahadevan, N. 2012. Multiple emulsions: A Review. *International Journal of Recent Advances in Pharmaceutical Research*. 2(1): 9-19.
- Li, B., Jiang, Y., Liu, F., Chai, Z., Li Y. y Leng, X. 2011. Study of the encapsulation efficiency and controlled release property of whey protein isolate-polysaccharide complexes in W1/O/W2 double emulsions. *International Journal of Food Engineering*. 7: 1-16
- Maldonado, L., Latorre, K., Rocha, P., Medrano, A., Abirached, C. y Panizzolo, L.A. 2011. Influencia del pH en la estabilidad de emulsiones elaboradas con proteínas de salvado de arroz. *Revista del Laboratorio Tecnológico de Uruguay*. 6: 28-31.
- Matsumoto, S., Koh, Y. y Michiura, J. 1985. Preparation of W/O/W emulsions in an edible form on the basis of phase inversion technique *J. Dispersion Science and Technology*. 6:507-521. Citado en: Jiménez-Alvarado, R., Beristain, C.I., Medina-Torres, L., Román-Guerrero, A. y Vernon-Carter, E.J. 2009. Ferrous bisglycinate content and

- release in W1/O/W2 multiple emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes. *Food Hydrocolloids*. 23: 2425-2433.
- McClements, D.J. 2005. *Food Emulsions*. Principles Practice and Techniques. 2nded. CRC Press. Elsevier. Florida. USA.
- McClements, D.J., Decker, E.A., Park, Y. y Weiss, J. 2009. Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 49:577–606.
- Mun, S., Choi, Y., Rho, S.J., Kang, C.G., Park, C.H. y Kim, Y.R. 2010. Preparation and characterization of water/oil/water emulsions stabilized by polyglycerol polyricinoleate and whey protein isolate. *Journal of Food Science*. 75(2): 116-125.
- Omotosho, J.A., Florence, A.T. y Whateley, T.L. 1990. Absorption and lymphatic uptake of 5-fluorouracil in the rat following oral administration of w/o/w multiple emulsions. *International Journal of Pharm.* 61:51-56. Citado en: Garti, N. y Aserin, A. 1996. Double emulsions stabilized by macromolecular surfactants. *Advances in Colloid and Interface Science*. 65: 37-69.
- Onsaard, E., Vitatayanont, M., Srigam, S. y McClements, D. 2005. Properties and stability of oil in water emulsions stabilized by coconut skim milk proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 5747-5753.
- Schmidts, T., Dobler, D., Guldán, A.-C., Paulus, N. y Runkel, F. 2010. Multiple W/O/W emulsions using the required HLB for emulsifier evaluation. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 372: 48-54.
- Seifriz, W. 1925. Studies in emulsions III. Double reversal of oil emulsions occasioned by the same electrolyte. *J. Phys. Chem.-US*, 29: 738–749. Citado en Weiss, J. y Mushiolik, G. 2007. Factors affecting the droplet size of water-in-oil emulsions (W/O) and the oil globule size in water-in-oil-in-water emulsions (W/O/W). *Journal of Dispersion Science and Technology*. 28: 703–716.
- Sela, Y., Magdassi, S. y Garti, N. 1995. Release of markers from inner water phase of W/O/W emulsions stabilized by silicone based polymeric surfactants. *Journal of Controlled Release*. 33: 1-12.
- Shinoda, K. y Saito, H. 1969. The stability of O/W type emulsions as functions of temperature and the HLB of emulsifiers: The emulsification by PIT-method. *Journal of Colloid and Interface Science*. 30: 258-263.
- Shinoda, K. y Arai, H. 1964. The Correlation between phase inversion temperature in emulsion and cloud point in solution of nonionic emulsifier. *The Journal of Physical Chemistry*. 68: 3485-3490.
- Tolstoguzov, V. 2003. Some thermodynamic considerations in Food formulation. *Food Hydrocolloids*. 17: 1-23.
- Weiss, J. y Mushiolik, G. 2007. Factors affecting the droplet size of water-in-oil emulsions (W/O) and the oil globule size in water-in-oil-in-water emulsions (W/O/W). *Journal of Dispersion Science and Technology*. 28: 703–716.
- Zeta-Meter, Inc. 2012. Curso sobre potencial zeta. Disponible en: <http://www.zeta-meter.com> Consultado el: 27 de septiembre de 2012.