



UNIVERSITAT POLITÈCNICA
DE CATALUNYA
BARCELONATECH

Estudio de la influencia de los diferentes parámetros involucrados en la microencapsulación mediante coacervación complejas

Óscar García Carmona

ADVERTIMENT La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del repositori institucional UPCommons (<http://upcommons.upc.edu/tesis>) i el repositori cooperatiu TDX (<http://www.tdx.cat/>) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual **únicament per a usos privats** emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei UPCommons o TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a UPCommons (*framing*). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del repositorio institucional UPCommons (<http://upcommons.upc.edu/tesis>) y el repositorio cooperativo TDR (<http://www.tdx.cat/?locale-attribute=es>) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual **únicamente para usos privados enmarcados** en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio UPCommons No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a UPCommons (*framing*). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the institutional repository UPCommons (<http://upcommons.upc.edu/tesis>) and the cooperative repository TDX (<http://www.tdx.cat/?locale-attribute=en>) has been authorized by the titular of the intellectual property rights **only for private uses** placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading nor availability from a site foreign to the UPCommons service. Introducing its content in a window or frame foreign to the UPCommons service is not authorized (*framing*). These rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH
Departament d'Enginyeria Tèxtil i Paperera

Estudio de la influencia de los diferentes parámetros involucrados en la microencapsulación mediante coacervación compleja

Memoria presentada por

Óscar García Carmona

Para optar al grado de Doctor

Por la Universitat Politècnica de Catalunya

Departamento de Ingeniería Textil y Papelera

Universitat Politècnica de Catalunya

Terrassa, 2019

AGRADECIMIENTOS

Primero empezaré por la persona central de todo esto. La persona que llevó mi proyecto de final de carrera y que desde entonces me ha guiado en lo profesional, en lo personal y, obviamente, en este doctorado. Muchísimas gracias por contagiarme su pasión y por ser un excelente motivador.

Seguiré por todos los compañeros y compañeras que he conocido durante el desarrollo de esta tesis, algunos de ellos son participes poniendo su granito de arena en la parte experimental, otros la han revisado como si fuera suya, dedicándole mucho tiempo y, por ello, quedando marcadas como personas diferentes para mí.

Gracias a las personas que han estado y estarán conmigo siempre, las que han celebrado conmigo y sufrido conmigo. Las que siempre me apoyan y las que desde que yo era bien pequeñito sabían por dónde me tenían que guiar. Gracias por estar ahí de forma incondicional, vuestra inversión de vida por fin da algún fruto.

Ahora me acuerdo del compañero de vida, la misma casa, la misma familia, la misma carrera y ahora el mismo doctorado. En todos mis recuerdos apareces, a pesar de ser yo el mayor, me siento guiado por ti.

A la persona que me ha cedido su casa y me ha aguantado en periodos vacacionales, con esto que parece, no acabaría nunca, ahora cuando suba a verte sabrás que voy porque quiero y sin excusas.

A la sonrisa que me ha aguantado tantos años ya, porque así es mi recuerdo de ti. Gracias por sonreír siempre y por no dejar de hacerlo nunca.

Gracias a todos vosotros por haber llevado a cabo esta tesis.

“Si no quieres usar los
brazos, usa la cabeza”

Mi abuelo

RESUMEN

En 1931 se publicó el primer trabajo de investigación referido a la microencapsulación en el que se describía una tecnología de formación de microcápsulas utilizando gelatina como material de pared mediante un proceso que se denominó “coacervación”.

El interés en esta tecnología se basa en la posibilidad de evitar la degradación de las propiedades físicoquímicas y biológicas de sustancias expuestas a condiciones que le son perjudiciales mediante su empaquetamiento bajo una pared polimérica que puede ser de diferentes espesores o características permitiendo controlar así la liberación de la sustancia microencapsulada.

En esta tesis se plantea la fabricación de microcápsulas de aromas mediante coacervación compleja utilizando como material de pared gelatina y goma arábiga. El proceso se basa en 5 etapas: Disolución de la gelatina y la goma en la fase acuosa, microemulsión del aroma en la fase acuosa en presencia o no de un tensioactivo, coacervación de la gelatina y la goma, gelación del coacervado formando la pared de la cápsula y la reticulación del material de pared mediante un agente reticulante.

Inicialmente, la investigación se centrará en el desarrollo de un protocolo de microencapsulación por coacervación compleja que permita encapsular gran parte del aroma del sistema obteniendo microcápsulas relativamente esféricas.

La etapa de microemulsión es la que mayor influencia tiene sobre la eficiencia final de la encapsulación y, por tanto, es la etapa que mayor interés ha centrado en los últimos años. Los fenómenos de interfase ligados a este proceso determinan el tamaño de partícula, la estabilidad de la emulsión y la interacción en la interfase aceite-agua de los componentes del sistema, en este caso, gelatina, goma y los posibles tensioactivos presentes. Es por esto que una parte de la presente tesis se centrará en el estudio de la influencia de diferentes tensioactivos (SMA, SDS y Kolliphor®) en la morfología de las microcápsulas y la eficiencia de encapsulación.

La última parte se focalizará en el estudio del proceso de reticulación. Típicamente, las microcápsulas formadas mediante coacervación compleja usando gelatina y goma arábiga como materiales de pared se han reticulado con glutaraldehído o formaldehído, sustancias con una alta toxicidad. Es por ello que estudios recientes han intentado la sustitución de estos aldehídos por la enzima transglutaminasa. Para confirmar si la transglutaminasa es una opción comparable al glutaraldehído o formaldehído se llevará a cabo un estudio de la cinética de reticulación de la pared de la microcápsula obteniendo las ecuaciones que regulan este proceso en función del tipo de agente reticulante estudiado.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
1.1. MICROENCAPSULACIÓN	3
1.1.1. Materiales	3
1.1.2. Sistema de encapsulado.....	4
1.1.3. Métodos de encapsulación.....	6
1.2. COACERVACIÓN COMPLEJA	7
1.2.1. Microcápsulas para aromas obtenidas mediante coacervación compleja.....	9
1.3. MICROEMULSION	11
1.3.1. Mecanismo de emulsificación.....	13
1.3.2. Tensioactivos.....	14
1.3.3. Agregaciones y comportamiento de fase.....	16
1.3.4. Mezclas polímero-polímero y polímero-tensioactivo	20
1.3.5. Interacciones proteína-tensioactivo	26
1.4. RETICULACIÓN	28
1.4.1. Cinética de reacción	30
1.4.2. Cinética de reticulación.....	35
1.5. BIBLIOGRAFÍA.....	36
2. ENFOQUE DE LA INVESTIGACIÓN.....	48
2.1. OBJETIVOS	48
2.2. ESTRUCTURA EXPERIMENTAL Y JUSTIFICACION	48
2.2.1. Estudio bibliográfico de la microencapsulación mediante coacervación compleja	48
2.2.1.1. Estudio bibliográfico de la microencapsulación mediante coacervación compleja	48
2.2.2. Desarrollo de microcápsulas	49
2.2.3. Rol de la concentración micelar crítica (cmc) de los tensioactivos y la agitación en el proceso de microencapsulación.....	49
2.2.4. Estudio de los mecanismos de reticulación en la obtención de microcápsulas gelatina-goma arábica	50
2.3. MATERIALES	51

2.4.	CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE MICROENCAPSULACIÓN	51
2.4.1.	Microscopía óptica.....	51
2.4.2.	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	52
2.4.3.	Termogravimetría.....	53
2.4.4.	Espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-VIS).....	54
2.4.5.	Tensión superficial	55
3.	ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO DE LA MICROENCAPSULACIÓN MEDIANTE COACERVACIÓN COMPLEJA	60
3.1.	INTRODUCCIÓN	60
3.2.	REFERENCIAS UTILIZADAS COMO BASE DEL DISEÑO.....	60
3.3.	HIPÓTESIS DE PARTIDA	62
3.4.	DEFINICIÓN DEL PROTOCOLO DE PARTIDA.....	63
3.5.	BIBLIOGRAFÍA.....	63
4.	DESARROLLO DE MICROCÁPSULAS.....	70
4.1.	INTRODUCCIÓN	70
4.2.	ESTUDIO DE LAS DIFERENTES VARIABLES.....	70
4.2.1.	Influencia de la relación gelatina:goma arábiga (G:GA)	70
4.2.2.	Influencia del reticulante	72
4.2.3.	Influencia de la concentración en el medio	74
4.2.4.	Influencia de la concentración de glutaraldehído.....	75
4.2.5.	Influencia del orden de adición de los reactivos	77
4.2.6.	Selección del método de microencapsulación óptimo.....	79
4.3.	CONCLUSIÓN	80
4.4.	BIBLIOGRAFÍA.....	81
5.	ROL DE LA CONCENTRACIÓN MICELAR CRÍTICA (CMC) DE LOS TENSIOACTIVOS EN EL PROCESO DE MICROENCAPSULACIÓN.....	85
5.1.	INTRODUCCIÓN	85
5.2.	DESCRIPCIÓN DE LOS TENSIOACTIVOS ESTUDIADOS	85
5.3.	METODOLOGÍA DE ENCAPSULACIÓN.....	89
5.4.	RESULTADOS.....	90

5.4.1.	Tensión superficial	90
5.4.2.	Microscopía óptica	92
5.4.3.	SEM.....	96
5.4.4.	Distribución del tamaño de partícula.....	97
5.4.5.	Análisis termogravimétrico (TGA/DTGA)	98
5.5.	CONCLUSIÓN	103
5.6.	BIBLIOGRAFÍA.....	103
6.	ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE RETICULACIÓN EN LA OBTENCIÓN DE MICROCÁPSULAS DE GELATINA-GOMA ARÁBIGA	109
6.1.	INTRODUCCIÓN	109
6.2.	PROCESO DE RETICULACIÓN	109
6.2.1.	Agentes reticulantes usados.....	109
6.2.2.	Cinética de reticulación.....	112
6.3.	PROCESO EXPERIMENTAL	113
6.3.1.	Agente reticulante: Glutaraldehído	113
6.3.2.	Agente reticulante: Formaldehído.....	114
6.3.3.	Agente reticulante: Transglutaminasa	114
6.4.	CÁLCULOS Y RESULTADOS	115
6.4.1.	Rectas de calibrado.....	115
6.4.2.	Tamaño de las microcápsulas.....	116
6.4.3.	Cinética de reticulación.....	117
6.4.4.	Morfología de las microcápsulas obtenidas	127
6.5.	DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES.....	128
6.5.1.	Concentración y cinética de reticulación.....	128
6.5.2.	Tamaño de las microcápsulas.....	133
6.5.3.	Coeficiente de difusión.....	135
6.5.4.	TGA (Análisis termogravimétrico)	137
6.6.	CONCLUSIONES	141
6.7.	BIBLIOGRAFÍA.....	143

7. CONCLUSIONES GENERALES	147
8. TRABAJO FUTURO	152
9. BIBLIOGRAFÍA GENERAL	156
10. ANEXO.....	169
10.1. ARTÍCULOS PUBLICADOS	169
10.2. CAPÍTULOS DE LIBRO PUBLICADOS.....	172
10.3. PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS	172

Figura 1. Composición de una microcápsula de aceite de forma simplificada [1].....	5
Figura 2. Diferentes tipos de microcápsulas: (i) microcápsula simple, (ii) matriz(microesfera), (iii) microcápsula irregular, (iv) microcápsulas con multinúcleos, (v) microcápsula multicapa, (vi) microcápsula rellena de microcápsulas [1].	5
Figura 3. Esquema de las diferentes tecnologías de microencapsulación [2].	6
Figura 4. Representación esquemática del proceso de coacervación compleja [16].....	8
Figura 5. Representación esquemática de varios procesos de rotura de emulsión [51].	12
Figura 6. Ejemplos de moléculas de tensioactivos [55].	15
Figura 7. Variación de la estabilidad de una emulsión, el tamaño de gota y la tensión interfacial con relación al porcentaje de tensioactivo con mayor HLB [51].	16
Figura 8. Variación de las diferentes propiedades físicas de un tensioactivo en solución antes y después de la CMC [55].	18
Figura 9. Ejemplos de diferentes estructuras de tensioactivos autoagregados [55].	19
Figura 10. Diagramas de fase para comportamientos de fase asociativo (izquierda) y segregativo (derecha). 1Φ y 2Φ representan una y dos fases respectivamente [55].	21
Figura 11. Efecto de un tensioactivo iónico en las interacciones intra e inter poliméricas (a) en el régimen diluido y (b) en el régimen semidiluido. La concentración de tensioactivo aumenta al ir a la derecha en la figura. A concentraciones intermedias de tensioactivo (es decir, un número bajo de micelas por cadena de polímero), hay una contracción de la cadena de polímero en soluciones de polímero diluido y un efecto de reticulación en las soluciones semidiluidas. A medida que aumenta el número de micelas por cadena de polímero, los polímeros se hinchan en el régimen diluido debido a la repulsión electrostática entre las micelas. En el régimen semidiluido, la red se descompone a medida que las interacciones intrapoliméricas toman el control [84].	23
Figura 12. Tendencia de la tensión superficial en función de la concentración de tensioactivo en presencia y ausencia de un homopolímero (a) unión del tensioactivo en presencia o ausencia de polímero (b) y unión de la asociación entre un tensioactivo iónico y un polímero modificado hidrófobamente [55].	24
Figura 13. Ilustración esquemática de la interacción entre polímeros anfifílicos y tensioactivos. Los grupos laterales hidrófobos injertados en el polímero se asocian en ausencia del tensioactivo.	

Las primeras moléculas de tensioactivo añadido se disuelven en estos dominios (a) para formar micelas mixtas. Para tensioactivos iónicos, una unión inicialmente no cooperativa va seguida de una unión no cooperativa a medida que aumenta la ratio de tensioactivo/agregado. A concentraciones más altas de tensioactivo (b) el tensioactivo forma micelas (unión cooperativa), disolviendo así los grupos hidrófobos del polímero. Cuando el número de micelas es igual al número al número de zonas hidrofóbicas del polímero, la reticulación del polímero es despreciable [84].	25
Figura 14. Tendencia de la unión cuando CAC(2) está presente [90].	26
Figura 15. Efecto de la gelatina en la tensión superficial de soluciones de dodecil sulfato de sodio (círculos) y Triton X-100 (octil fenol etoxilato) (triángulos): símbolos rellenos, sin proteína; símbolos sin rellenar, en presencia de proteína [91].	27
Figura 16. Curva de la tensión superficial de C12E6 en presencia de albúmina de suero bovino, de las siguientes concentraciones: (1) 0; (2) 10 ⁻⁶ ; (3) 5x10 ⁻⁶ ; (4) 1x10 ⁻⁵ ; (5) 5x10 ⁻⁵ [92].	28
Figura 17. La solubilización (medida por el incremento de la absorbancia de UV) del (dimetiamino) azobenzeno por los complejos de ovoalbúmina-dodecil sulfato de sodio [92].	28
Figura 18. Velocidad de reacción vs Substrato en cinética enzimática [93].	31
Figura 19. Velocidad de acumulación del producto [93].	33
Figura 20. Velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato [S] [93].	33
Figura 21. Gráfica de Lineweaver-Burke [93].	35
Figura 22. Microscopio óptico (OLYMPUS BX43F).	52
Figura 23. Microscopio electrónico de barrido (Phenom Standard) y equipo de recubrimiento (SC7620, Quorum technologies).	53
Figura 24. Termogravímetro (TGA/SDTA851e, Mettler Toledo).	54
Figura 25. Espectrofotómetro UV-Visible (Shimadzu, UV-2401 PC).	55
Figura 26. Analizador de forma de gota (Krüss, DSA100).	55
Figura 27. Kolliphor® estructura [97].	87
Figura 28. Estructura del SMA [98].	88

Figura 29. Estructura del SDS [99].	88
Figura 30. Goma arábica [101], en la que " Gal " es D-Galactopiranososa, " GluA " es β -D-ácido glucurónico y " R " es uno de los siguientes radicales: L-Ara- (1-; oc -D-Gal) 1-3) -L-Ara; o β -L-Arap (1-3) -L-Araf (1-3).	89
Figura 31. Determinación de la CMC del Kolliphor®.	90
Figura 32. Determinación de la CMC del copolímero SMA.	91
Figura 33. Posible CMC detectada a concentraciones reducidas de SMA 3000H.	91
Figura 34. Determinación de la CMC del SDS.	92
Figura 35. Influencia de la agitación en la eficiencia de encapsulado.	100
Figura 36. Influencia de la agitación y el tensioactivo en la eficiencia de encapsulado.	102
Figura 37. Estructura química del Glutaraldehído.	110
Figura 38. Actuación del glutaraldehído con las proteínas [115].	110
Figura 39. Reacciones del formaldehído con proteínas[93].	111
Figura 40. Actuación de la TG [117].	112
Figura 41. Recta de calibrado para la reticulación con glutaraldehído.	115
Figura 42. Recta de calibrado para la reticulación con transglutaminasa.	116
Figura 43. Recta de calibrado para la reticulación con 15 g de transglutaminasa.	116
Figura 44. Evolución de la masa de glutaraldehído en las microcápsulas durante la reticulación con 1 g de glutaraldehído.	118
Figura 45. Evolución de MtM^∞ en función de t durante la reticulación con 1 g de glutaraldehído.	120
Figura 46. Representación de MtM^∞ en función de t durante la reticulación con 1 g de glutaraldehído para tiempos cortos	120
Figura 47. Evolución de la masa transglutaminasa en las microcápsulas durante la reticulación con 1 g de transglutaminasa	122

Figura 48. Evolución de MtM^∞ en función de t durante la reticulación con 1 g de transglutaminasa.....	123
Figura 49. Representación de MtM^∞ en función de t durante la reticulación con 1 g de transglutaminasa para tiempos cortos.	123
Figura 50. Evolución de la masa de formaldehído en las microcápsulas durante la reticulación con 1 g de formaldehído.....	125
Figura 51. Evolución de MtM^∞ en función de t durante la reticulación con 1 g de formaldehído.	126
Figura 52. Representación de MtM^∞ en función de t durante la reticulación con 1 g de formaldehído para tiempos cortos.	126
Figura 53. Evolución de MtM^∞ en función de t durante la reticulación mediante el agente reticulante glutaraldehído.....	129
Figura 54. Evolución de MtM^∞ en función de t durante la reticulación mediante el agente reticulante transglutaminasa.	130
Figura 55. Evolución de MtM^∞ en función de t durante la reticulación mediante el agente reticulante formaldehído.	132
Figura 56. TGA de un reactor llevado a cabo con glutaraldehído como agente para la reticulación.	137
Figura 57. TGA de un reactor llevado a cabo con transglutaminasa como agente para la reticulación.....	139
Figura 58. TGA de un reactor llevado a cabo con formaldehído como agente para la reticulación.	140

Tabla 1. Aplicación de la coacervación compleja para la encapsulación de sabores y aceites esenciales.....	11
Tabla 2. Clasificación de emulsiones [51].	12
Tabla 3. Resumen de los rangos de HLB de los tensioactivos y sus aplicaciones [51].....	16
Tabla 4. Número de HLB requerido para la emulsificación de varios aceites [51].....	16
Tabla 5. Listado de los materiales utilizados en la presente tesis.	51
Tabla 6. Especificaciones TGA.....	54
Tabla 7. Bibliografía analizada para el diseño del protocolo de microencapsulación que se utilizará como punto de partida.....	62
Tabla 8. Diseño de ensayos para el estudio de la relación G:GA.....	71
Tabla 9. Estudio de la relación Gelatina:Goma mediante MO y SEM.....	71
Tabla 10. Diseño de ensayos para el estudio de la influencia de reticulante.....	72
Tabla 11. Estudio de la influencia del reticulante mediante MO y SEM.	73
Tabla 12. Diseño de ensayos para el estudio de la influencia de la concentración en el medio. 74	
Tabla 13. Estudio de la influencia de la concentración en el medio mediante MO y SEM.	74
Tabla 14. Diseño de ensayos para el estudio de la influencia de la concentración de glutaraldehído.....	75
Tabla 15. Estudio de la influencia de la concentración de glutaraldehído mediante MO y SEM.	76
Tabla 16. Diseño de ensayos para el estudio de la influencia del orden de adición.....	77
Tabla 17. Estudio de la influencia del orden de adición mediante MO y SEM.	78
Tabla 18. Descripción del método óptimo.	79
Tabla 19. Resultados de MO y SEM para el método óptimo.....	80
Tabla 20. Características de cada tensioactivo.....	89

Tabla 21. Valores de la CMC determinados experimentalmente mediante tensión superficial. .	92
Tabla 22. Efecto de la concentración de tensioactivo y de la agitación.	93
Tabla 23. Morfología de las microcápsulas formadas.	96
Tabla 24. Influencia de la agitación en la eficiencia de encapsulado.	99
Tabla 25. Influencia de la agitación y el tensioactivo en la eficiencia de encapsulado.	101
Tabla 26. Tabla resumen de los diámetros y radios medios de los lotes reticulados a diferentes concentraciones de Glutaraldehído y formaldehído.	117
Tabla 27. Absorbancia obtenida durante la reticulación con 1 g de glutaraldehído.	118
Tabla 28. Masa de glutaraldehído presente en el baño y en las microcápsulas durante la reticulación con 1 g de glutaraldehído.	118
Tabla 29. Cálculo de MtM^∞ y t durante la reticulación con 1 g de glutaraldehído.	119
Tabla 30. Cálculo del coeficiente de difusión para todas las reticulaciones llevadas a cabo con glutaraldehído.	121
Tabla 31. Absorbancia obtenida durante la reticulación con 1 g de transglutaminasa.	122
Tabla 32. Masa de transglutaminasa presente en el baño y en las microcápsulas durante la reticulación con 1 g de transglutaminasa.	122
Tabla 33. Cálculo de MtM^∞ y t durante la reticulación con 1 g de transglutaminasa.	123
Tabla 34. Cálculo del coeficiente de difusión para todas las reticulaciones llevadas a cabo con transglutaminasa.	124
Tabla 35. Absorbancia obtenida durante la reticulación con 1 g de formaldehído.	124
Tabla 36. Masa de formaldehído presente en el baño y en las microcápsulas durante la reticulación con 1 g de formaldehído.	125
Tabla 37. Cálculo de MtM^∞ y t durante la reticulación con 1 g de formaldehído.	125
Tabla 38. Cálculo del coeficiente de difusión para todas las reticulaciones llevadas a cabo con formaldehído.	127

Tabla 39. Morfología de las microcápsulas reticuladas mediante el uso de formaldehído, glutaraldehído y transglutaminasa.....	128
Tabla 40. Velocidad de reacción o absorción de los diferentes agentes de reticulación a diferentes concentraciones en las paredes de las microcápsulas.....	132
Tabla 41. Radio medio de las microcápsulas obtenidas en los reactores en los que se ha utilizado glutaraldehído a diferentes concentraciones como agente para la reticulación.....	133
Tabla 42. Radio medio de las microcápsulas obtenidas en los reactores en los que se ha utilizado transglutaminasa a diferentes concentraciones como agente para la reticulación.....	134
Tabla 43. Radio medio de las microcápsulas obtenidas en los reactores en los que se ha utilizado formaldehído a diferentes concentraciones como agente para la reticulación.	134
Tabla 44. Radio medio, máximo y mínimo de los reactores en los que se ha utilizado glutaraldehído, formaldehído y transglutaminasa como agentes para la reticulación.....	134
Tabla 45. Coeficientes de difusión de los reactores llevados a cabo con glutaraldehído como agente para la reticulación a diferentes concentraciones.....	135
Tabla 46. Coeficientes de difusión de los reactores llevados a cabo con transglutaminasa como agente para la reticulación a diferentes concentraciones.....	136
Tabla 47. Coeficientes de difusión de los reactores llevados a cabo con formaldehído como agente para la reticulación a diferentes concentraciones.	136
Tabla 48. Coeficiente de difusión de los reactores en los que se ha utilizado glutaraldehído, formaldehído y transglutaminasa como agentes para la reticulación.....	136

Gráfico 1. Distribución del tamaño de partículas debida a la influencia del tensioactivo a 900 rpm. 97

Gráfico 2. Distribución del tamaño de partícula debida a la influencia de la velocidad de agitación con SDS 98

CAPÍTULO 1:
Introducción general

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. MICROENCAPSULACIÓN

La microencapsulación consiste en la aplicación de una capa delgada sobre pequeñas partículas de sólido, gotas de líquido o gas, con el objetivo de proteger el material encapsulado, separarlo o facilitar su almacenamiento y manipulación. De esta forma el material queda cubierto de manera individual y protegido del ambiente y de agentes externos.

Otro de los objetivos de la microencapsulación puede ser la de liberar la sustancia recubierta, a unas condiciones concretas que rodean a la microcápsula, de forma abrupta o prolongada. Las condiciones que pueden llevar a esta liberación suelen ser la humedad, el pH, la fuerza física o una combinación de ellas.

Las partículas que se recubren en la microencapsulación tienen un tamaño que varía entre unos pocos y alrededor de 200 μm ; sin embargo, algunos autores extienden el tamaño hasta partículas del orden de las 5000 μm . En general todas las partículas que tengan un tamaño inferior a 1 mm serán consideradas microcápsulas, en cambio, cuando las partículas poseen un tamaño inferior a 1 μm , el producto resultante del proceso de microencapsulación recibe la denominación de “nanoesferas”, “nanopartículas” o “nanocápsulas”.

1.1.1. Materiales

Existe una amplia variedad de materiales utilizados en el proceso de microencapsulación, además, van surgiendo nuevos materiales a medida que se incrementa la investigación en este campo. La clasificación más común de los materiales involucrados se basa en la función de cada uno de ellos dentro del proceso:

- **Material de pared:**

Incluye a todos los materiales utilizados para recubrir y proteger el núcleo de la microcápsula. La elección de este material irá en función de la aplicación final de la microcápsula, del proceso de microencapsulación y de la compatibilidad de este con el componente a encapsular. Además, este material tendrá influencia sobre la estabilidad, el tamaño de partícula y la vida útil de la microcápsula final. Los materiales de pared comúnmente utilizados suelen ser polímeros naturales, polímeros sintéticos, polímeros semisintéticos, lípidos, materiales inorgánicos, etc.

- **Agentes activos:** Comprende una gran variedad de material a encapsular.

- **Disolventes:** Para disolver las sustancias activas empleadas y que, además, sean relativamente miscibles con agua como el acetato de etilo, acetona, diclorometano, cloroformo, metanol, propilenglicol o acetonitrilo.
- **Emulsionantes:** Encargados de facilitar el proceso de emulsión de los ingredientes influyendo en la tensión interfacial entre la fase continua y la fase dispersa. Algunos ejemplos son los tensioactivos no iónicos, catiónicos y aniónicos.
- **Reticulantes:** Se utilizan para mejorar las propiedades físicas de la microcápsula y actúan uniendo las diversas moléculas del polímero que conforma la pared incrementando la solidez y estabilidad de las microcápsulas. Algunos ejemplos son el glutaraldehído y el formaldehído.
- **Antiespumantes:** Evitan la generación de espuma, los más destacados son la urea, el glicerol y el propilenglicol.

1.1.2. Sistema de encapsulado

1.1.2.1. Partes principales

El material encerrado en la cápsula se puede llamar núcleo, fase interna, o encapsulado. El recubrimiento se puede denominar carcasa, funda, fase externa o bien membrana. Por tanto, se distinguen dos partes fundamentales en la microcápsula:

- **Núcleo:**

Como ya se ha comentado es el material encerrado en la cápsula y puede estar constituido, generalmente, por partículas sólidas o por pequeñas gotas de líquido. En muchas ocasiones se requiere un tratamiento previo del material. En el caso de productos sólidos, puede ser necesario seleccionar el tamaño de las partículas o efectuar transformaciones en su forma. Se puede requerir el empleo de coadyuvantes, tales como estabilizadores, antioxidantes, antisépticos, diluyentes u otras sustancias con el propósito de modificar la cesión. En el caso de los líquidos en algunas ocasiones se efectúan operaciones de dispersión o emulsificación. El tratamiento previo al cual debe someterse el núcleo, como asimismo la técnica a emplear en este tratamiento, son de mucha importancia, ya que pueden influir poderosamente en el comportamiento del producto en el preparado final.

- **Pared:**

En la selección de los materiales que se van a utilizar para el recubrimiento es importante considerar las características del producto final. Por ejemplo, si se trata de proteger el núcleo de la acción del vapor de agua o que la cubierta resista la acción extractiva del agua, ésta deberá ser de naturaleza hidrofóbica para que provea una adecuada barrera protectora. La película de

recubrimiento tiende a seguir el contorno y la forma exterior del núcleo; por esta razón, debe adherirse firmemente a él. También son propiedades importantes la flexibilidad, la fuerza o resistencia, la permeabilidad y la facilidad de aplicación. Junto con el material formador de la película, suelen emplearse algunas otras sustancias, tales como colorantes, plastificantes, etc. La película de recubrimiento suele ser muy delgada ya que las partículas que se recubren son, generalmente, de pequeño tamaño. Su continuidad es un factor de mucha importancia y aun las más pequeñas alteraciones pueden hacer variar las características de cesión del material incluido en el núcleo.

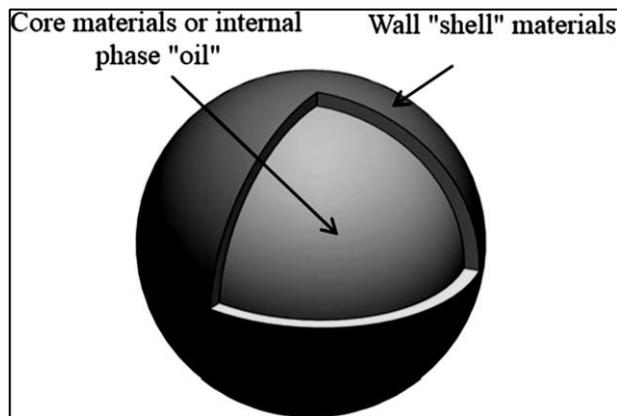


Figura 1. Composición de una microcápsula de aceite de forma simplificada [1].

1.1.2.2. Forma

Las microcápsulas pueden tener diferentes formas dependiendo, principalmente, de las características físicas que tenga el núcleo, los elementos que actúan sobre la interfase entre la fase continua y la fase dispersa, y las propiedades de material de pared utilizado.

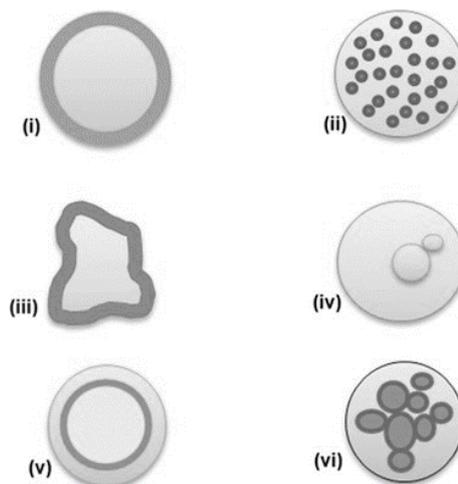


Figura 2. Diferentes tipos de microcápsulas: (i) microcápsula simple, (ii) matriz(microesfera), (iii) microcápsula irregular, (iv) microcápsulas con multinúcleos, (v) microcápsula multicapa, (vi) microcápsula rellena de microcápsulas [1].

1.1.3. Métodos de encapsulación

La selección del método es una tarea complicada, ya que se deben considerar diferentes factores con la complejidad de que es posible que ninguno englobe todos ellos. Por tanto, se debe llegar a un compromiso identificando el método que mejor se adapte a las características de las microcápsulas que se quieren conseguir. Algunos de los factores que se deben tener en cuenta son:

- Naturaleza del núcleo
- Características de solubilidad del núcleo con relación al material de pared
- La sustancia de recubrimiento
- Las posibles interacciones entre el núcleo, el tensioactivo y el material de pared
- Tamaño de las microcápsulas
- Mecanismo de transferencia o liberación del núcleo que se quiera lograr
- Factor económico

Existen diferentes métodos para llevar a cabo la encapsulación. Algunos tipos de procesos que están basados exclusivamente en fenómenos físicos, otros usan reacciones químicas de polimerización para producir la pared de la cápsula, y otros combinan métodos físicos y químicos.

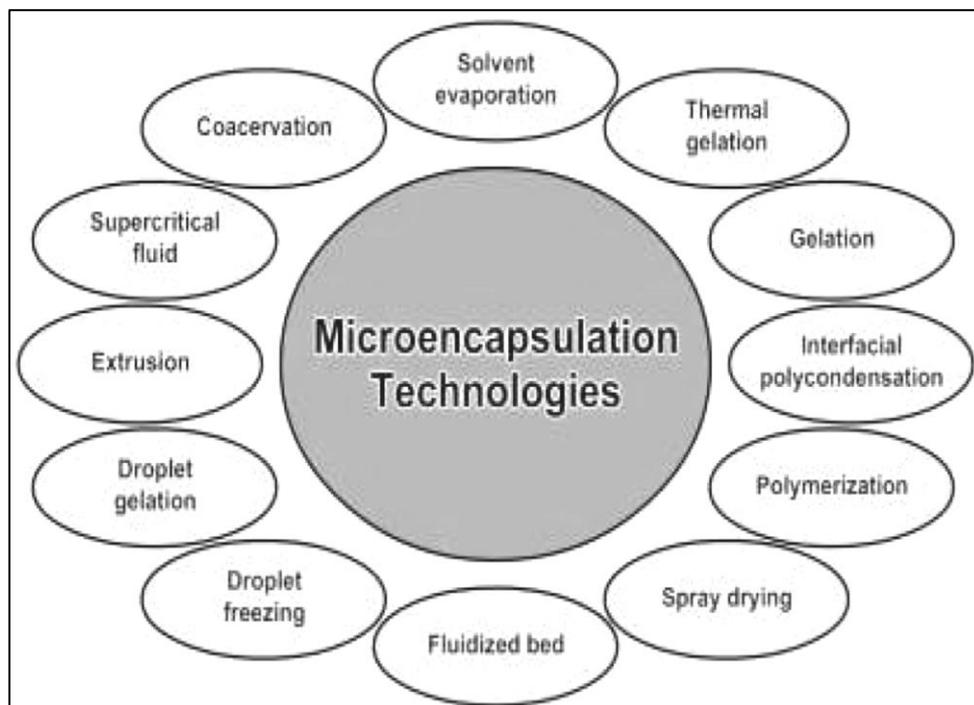


Figura 3. Esquema de las diferentes tecnologías de microencapsulación [2].

1.2. COACERVACIÓN COMPLEJA

La coacervación compleja fue descrita por primera vez en 1949 por Bungenberg de Jong[3] como la separación de fases de dos líquidos debida a interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, interacciones hidrófobas o interacciones atractivas inducidas por la polarización que ocurren entre dos polímeros de carga opuesta en solución acuosa[4].

A pesar de que aún no se ha determinado el mecanismo exacto de esta interacción, se pensó que la coacervación compleja debía seguir una nucleación en dos etapas y un proceso de crecimiento cinético asociado con la formación de complejos solubles e insolubles[5]. Varios modelos teóricos tales como los de Overbeek and Voorn[6], Veis[7], Nakajima y Sato[8], Tainaka[9], y Gupta y Sato[10], han sido propuestos para abordar la cinética de separación de fase que conduce a la transición de coacervación.

En la mayoría de los casos, la coacervación compleja ocurre cuando se mezclan soluciones de polielectrolito con carga opuesta bajo el efecto de uno de los siguientes factores: cambio de pH o temperatura, adición de un compuesto no solvente o electrolito, que provocan que las dos sustancias de tipo coloidal formen un complejo de solubilidad menor a la de los coloides en forma separada[11][12]. Un ejemplo característico, es el que se produce cuando reacciona la goma arábiga con la gelatina en condiciones apropiadas. La goma arábiga posee carga negativa y si se encuentra en un medio con la gelatina cargada en forma positiva, se produce una interacción entre ambas, provocándose la separación de fases y formación de un coacervato. En este caso, la coacervación compleja es muy dependiente de pH, puesto que para que la interacción se produzca en buenas condiciones, es necesario que la gelatina se encuentre cargada fuertemente positiva, y esto ocurre cuando la solución está a un pH por debajo de su punto isoeléctrico. Para efectuar la microencapsulación por coacervación, es necesario que, una vez producida la separación de fase, se encuentre en la interfase el material formador del núcleo para que el polímero se deposite formando una película sobre él[13].

La producción de microcápsulas por coacervación compleja comprende cinco pasos básicos[14],[15] (Figura 4):

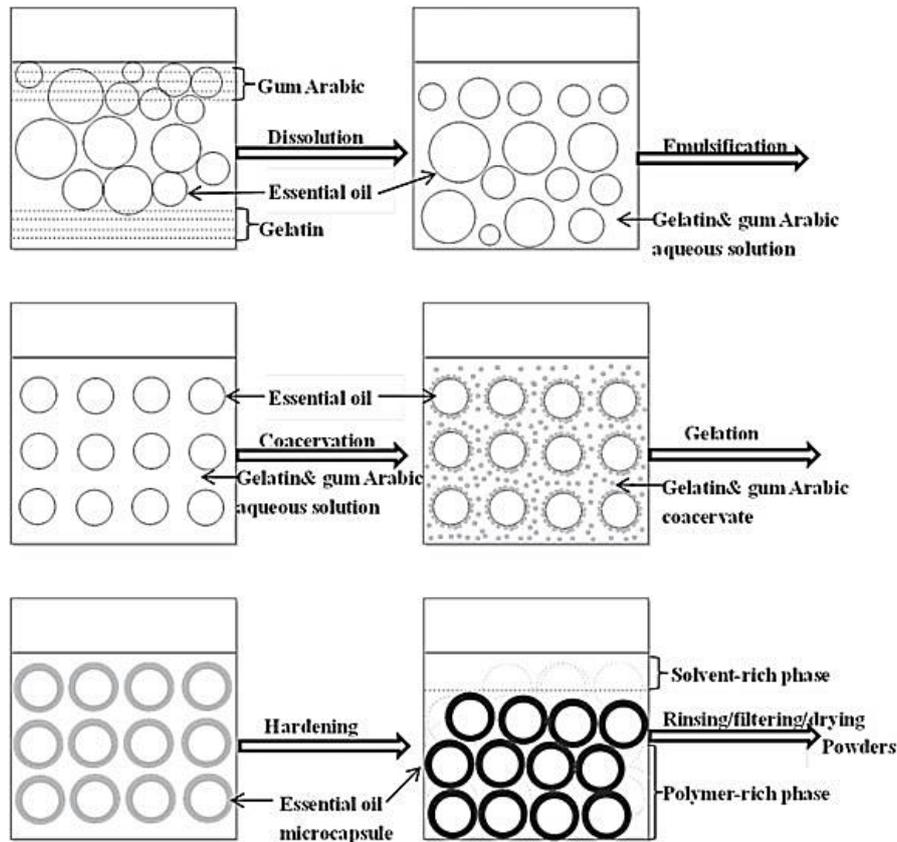


Figura 4. Representación esquemática del proceso de coacervación compleja [16].

1. Disolución: Se produce una solución acuosa que contiene dos polímeros diferentes (normalmente una proteína y un polisacárido) generalmente a una temperatura por encima del punto de gelación de la proteína y a un pH por encima del punto isoeléctrico de la proteína.
2. Microemulsión: El material hidrófobo presente en el sistema se microemulsiona mediante una energía externa. Las microgotas formadas se mantienen estables gracias a la presencia de polímeros, y en ocasiones tensioactivos, en la fase acuosa.
3. Coacervación: Separación en dos fases líquidas como resultado de interacciones electrostáticas atractivas entre los polímeros cargados de forma opuesta debido al descenso del pH por debajo del punto isoeléctrico de la proteína.
4. Gelación: Formación de la pared debido a la deposición de la fase rica en polímero alrededor de las gotas de material hidrófobo, inducido por el descenso controlado de la temperatura por debajo del punto de gelación.
5. Reticulación: Un agente de *crosslink* es adicionado para endurecer la pared y establecer la estructura.

Una microcápsula producida por coacervación compleja tiene una estructura típica denominada “*core-shell*”, es decir, una microesfera recubierta por una pared de espesor relativamente uniforme.

1.2.1. Microcápsulas para aromas obtenidas mediante coacervación compleja

La coacervación compleja normalmente ocurre bajo un estrecho rango de pH, entre el pKa de los grupos reactivos que se encuentran a lo largo de la cadena aniónica del polisacárido y el punto isoeléctrico de la proteína. La formación de la microcápsula se atribuye a la interacción física entre los grupos amino protonados de la proteína y el grupo carboxilo desprotonado del polisacárido.

La Tabla 1 muestra en que aplicaciones se han utilizado paredes compuestas por proteínas y polisacáridos para microencapsular fragancias o aceites esenciales.

Núcleo	Pared	Reticulante	Eficien. (%)	Diámetro (µm)	Aplicación	Ref
Aceite de naranja, aroma de limón	Proteína de suero - GA	Glutaraldehído o sin reticulante	80-90	5-1000	Queso Gouda	[17]
Aceite dulce de naranja	SPI-GA	Sin reticulante	80	8	Conservación de alimentos	[18]
Oleoresina de cúrcuma	GE-GA	Sin reticulante	49-73	45*	Ingrediente de comida	[19]
Aceite de Menta	GE-GA	Formaldehído o transglutaminasa	90	50	Ingrediente de comida	[20][21][22]
Isocianato de alilo	GE-GA	Ácido tánico	84	117	Comida	[23]
Saborizante	GE-GA	Sin reticulante	NR	67-92	Comida	[24]
Triglicérido de cadena media	GE-GA	Glutaraldehído	NR	9-50	Comida horneada	[25]
Dodecanol	GE-GA	Formaldehído o glutaraldehído	16-96	1-2	Control de plagas de insectos	[26][27]

Dodecil acetato	Proteína de suero - GA	Sin reticulante	41-86	5*	Control de plagas de insectos	[28]
α -Pino	CS-GA	Glutaraldehído	52	5	Control de plagas de insectos	[29]
Aceite de semilla de Neem	GE-CMC	Glutaraldehído	72-97	10*-100	Control de plagas	[30]
	GE-Carragenina	Genipina	76-96	100*		[31]
	CS-Carragenina	Glutaraldehído, genipina y ácido tánico	37-85	2-10		[32]
Aceite de Zanthoxylum	GE-CS	Genipina	30-60	3*	Repelente de mosquitos	[33]
Aceite de Pachuli	GE-GA	Glutaraldehído	NR	5-10	Tejidos de algodón	[34]
	GE-CS		51	13-18		[35]
	CS-GA		67	10*	Tratamiento médico	[36]
	CS y derivado-GA		61	3-9	Tratamiento médico	[37]
Aceite de limón	GE-GA	Glutaraldehído o formaldehído	NR	28-76	Tejidos funcionales	[38]
Aceite de Citronela	GE-GA	Glutaraldehído	NR	25-100	Tejidos de algodón	[39]
Aceite de Lavanda	Colágeno hidrolizado-CS	Glutaraldehído	37-60	5*	Liberación controlada	[40]
Aceite de <i>Artemisia argyi</i>	GE-GA	Formaldehído	NR	10-25	Tejidos de algodón	[41]
Aceite de Moxa	GE-GA	Glutaraldehído	NR	1-10	Tejidos de algodón	[42]

Aceite de Vertiver	GE-GA	Glutaraldehído o transglutaminasa	NR	20-60	Liberación controlada	[43][44]
Aceite de Ajo	GE-GA	Formaldehído	63-99	90-120	Liberación controlada	[45]
Aceite de Jasmín	GE-GA, GE-CMC	Transglutaminasa	76-81	1-50	NR	[46]
Limoneno	GE-GA	Glutaraldehído	70-86	219-325	NR	[47]
Aceite de Alcanfor	GE-GA	Glutaraldehído	99	86-295	Tratamiento médico	[48]
Caseína hidrolizada	SPI-Pectina	Sin reticulante	79-92	16-24	Ingrediente de comida	[49]
Extracto de Propóleo	SPI-Pectina	Sin reticulante	66-72	10-90	Ingrediente de comida	[50]
<p>*Los valores han sido estimados a partir de las imágenes de SEM presentes en las publicaciones. NR: Esta información no aparece en la publicación; GE: Gelatina; GA: Goma Arábiga; CMC: Carboximetilcelulosa; CS: Chitosan; SPI: Proteína de soja aislada.</p>						

Tabla 1. Aplicación de la coacervación compleja para la encapsulación de sabores y aceites esenciales.

1.3. MICROEMULSION

Las emulsiones son un tipo sistema disperso formado por dos líquidos inmiscibles. Las gotas de líquido (fase dispersa) se dispersan en un medio líquido (fase continua). Se pueden diferenciar varias clases de emulsiones, llamadas aceite en agua (O/W), agua en aceite (W/O) y aceite en aceite (O/O). Esta última puede estar representada por la emulsión de un aceite polar (p.e. propilenglicol) dispersado en un aceite no polar (aceite de parafina), y *viceversa*. Para dispersar dos líquidos inmiscibles se requiere un tercer componente llamado emulsionante. La elección de este emulsificante es crucial no solo para la formación de la emulsión sino también para la estabilidad de esta.

Las emulsiones se pueden clasificar de acuerdo a la naturaleza del emulsificante o a la estructura del sistema.

Naturaleza del emulsionante	Estructura del sistema
Moléculas simples e iones	Naturaleza de la fase interna y externa
Tensioactivos no iónicos	O/W, W/O
Mezcla de tensioactivos	Emulsiones micelares (microemulsiones)
Tensioactivos iónicos	Macroemulsiones
Polímeros no iónicos	Gotas bicapa
Poliectrolitos	Emulsiones dobles y múltiples
Mezcla de polímeros y tensioactivos	Emulsiones mezcladas
Fases cristalinas líquidas	
Partículas sólidas	

Tabla 2. Clasificación de emulsiones [51].

Varios procesos relacionados con la rotura de las emulsiones pueden ocurrir dependiendo de:

- La distribución del tamaño de partícula y la diferencia de densidad entre el material de las gotas y el medio.
- La diferencia entre las fuerzas atractivas y repulsivas las cuales determinan la floculación.
- La solubilidad de las gotas dispersas y la distribución del tamaño de partícula, lo que a su vez determina la maduración de Ostwald.
- La estabilidad de la película de líquido existente entre las gotas, lo cual determina la coalescencia.

Los diferentes procesos de rotura de la emulsión se muestran en la siguiente figura:

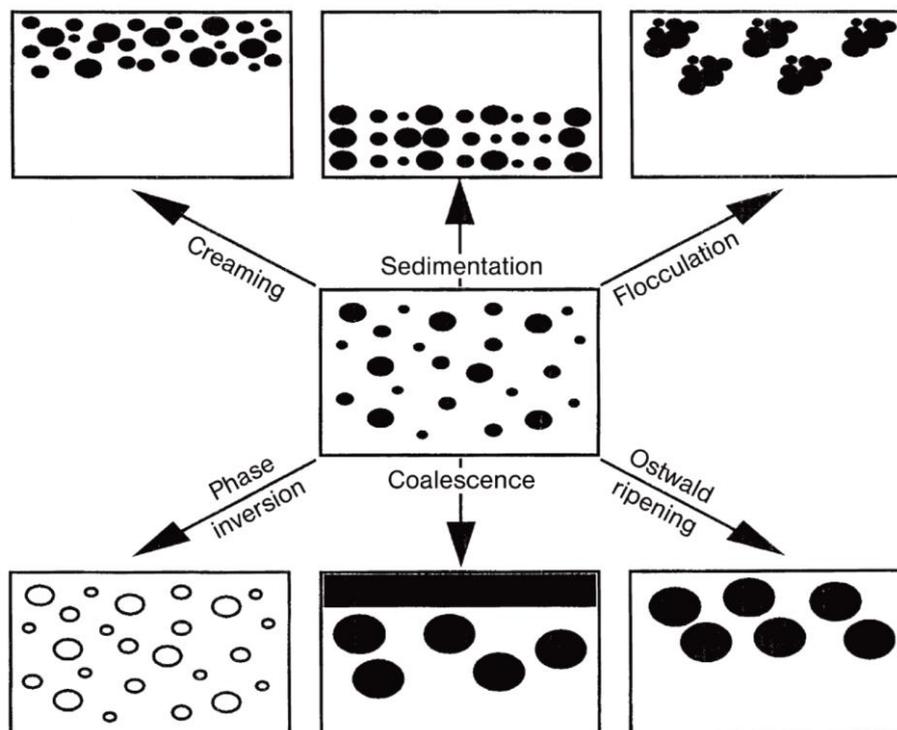


Figura 5. Representación esquemática de varios procesos de rotura de emulsión [51].

Los fenómenos físicos que están involucrados en cada proceso de rotura de emulsión no son simples, y requieren el análisis de todas las fuerzas superficiales involucradas. Además, los procesos anteriores se pueden dar de forma simultánea y no de forma consecutiva, lo que a la vez complica su análisis. Emulsiones modelo, con gotas monodispersas, no se pueden producir fácilmente y, por lo tanto, cualquier tratamiento teórico debe tener en cuenta el efecto de la distribución del tamaño de gota. Además, las medidas de adsorción del tensioactivo y el polímero en una emulsión no son simples, y para obtenerlas, estas medidas se deben realizar en la interfase plana.

1.3.1. Mecanismo de emulsificación

Para preparar una emulsión es necesario aceite, agua, un tensioactivo y energía. Considerando que la energía necesaria para expandir la interfase es $\Delta A\gamma$ (donde ΔA es el incremento del área interfacial cuando el aceite total de área A_1 produce un gran número de gotas creando una nueva área A_2 ; $A_2 \gg A_1$, γ es la tensión interfacial). Dado que γ es positiva, la energía necesaria para incrementar la interfase es alta y positiva; este término de energía no puede ser compensada por la pequeña entropía de la dispersión $T\Delta S$ (la cual también es positiva) por lo que la energía libre total de la formación de una emulsión, ΔG es positiva. Por tanto, la formación de una emulsión no es espontánea requiere de la aportación de energía.

$$\Delta G^{form} = \Delta A\gamma_{12} - T\Delta S^{conf} \quad \text{Ecuación 1}$$

La formación de gotas de pocas micras, como en el caso de las macroemulsiones, es fácil de conseguir y, por lo tanto, agitadores de alta velocidad como los Ultra-Turrax o Silverson son suficientes para producir estas emulsiones. Por el contrario, la formación de pequeñas gotas (nanoemulsiones) requiere el uso de tensioactivos y/o energía.

La elevada energía requerida para la formación de nanoemulsiones puede ser entendida partiendo de la Ley de Laplace donde Δp (la diferencia de presión entre el interior y el exterior de la gota). Para conseguir la rotura de una gota en gotas más pequeñas, ésta debe ser fuertemente deformada, y esta deformación incrementa Δp .

Los tensioactivos juegan el rol más importante en la formación de emulsiones. Debido a la reducción de la tensión interfacial, p se reduce y, por ello, el estrés requerido para romper una gota también. Los tensioactivos, a su vez, previenen la coalescencia de las nuevas gotas formadas.

Varios procesos se producen durante la emulsificación, la rotura de las gotas debido a la agitación, la adsorción del tensioactivo y las colisiones entre las diferentes gotas formadas (las cuales pueden acabar o no en coalescencia). Cada uno de estos procesos se repiten numerosas veces durante la

emulsificación y la escala de tiempo de cada uno de ellos es muy corta, normalmente un microsegundo. Esto demuestra que el proceso de emulsión es un proceso dinámico y que los sucesos que ocurren dentro del periodo de un microsegundo pueden ser muy importantes.

Para describir la formación de la emulsión, se deben considerar principalmente dos factores, llamados hidrodinámicos y ciencia de las interfases. Para evaluar la formación de la emulsión, el enfoque habitual es medir la distribución del tamaño de gota. Un diámetro promedio útil d es,

$$d_{nm} = \left(\frac{S_m}{S_n} \right)^{1/(n-m)} \quad \text{Ecuación 2}$$

En la mayoría de los casos, d_{32} (volumen/superficie promedio o “Sauter mean”) es usado. Una manera alternativa de describir la calidad de las emulsiones es usar el área superficial específica A (el área superficial de todas las gotas emulsionadas por unidad de volumen de la emulsión).

$$A = \pi S^2 = \frac{6\Phi}{d_{32}} \quad \text{Ecuación 3}$$

1.3.2. Tensioactivos

Los tensioactivos son moléculas muy exóticas debido a su comportamiento anfifílico, lo que significa que una molécula de tensioactivo contiene una parte hidrófoba y una hidrofílica. La parte hidrófoba, comúnmente llamada cola, suele estar compuesta por una o varias cadenas hidrocarbonadas, mientras que la parte hidrofílica (cabeza) puede presentar grupos con carga o no.

Los tensioactivos existen en formas muy variadas en la naturaleza [52][53][54]; Normalmente, estas moléculas se clasifican de acuerdo a la naturaleza química de los grupos polares de su cabeza, por ejemplo, los tensioactivos con carga negativa en su grupo de cabeza se conocen como aniónicos, mientras que los catiónicos están cargados positivamente, a los que no presentan carga se les denomina no iónicos. Por último, los denominados zwitteriónicos, son compuestos eléctricamente neutros pero que tienen cargas formales positivas y negativas sobre átomos diferentes.

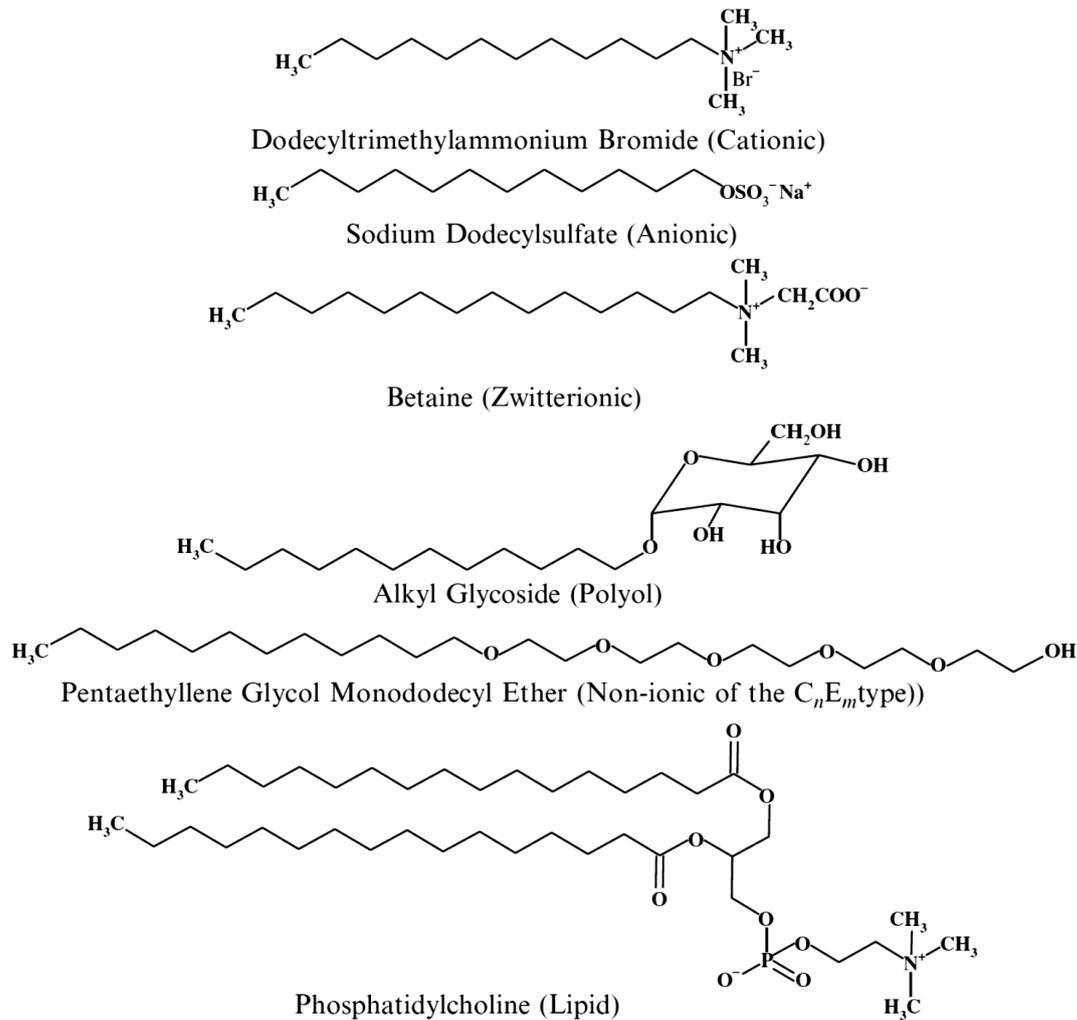


Figura 6. Ejemplos de moléculas de tensioactivos [55].

1.3.2.1. Balance hidrofílico-lipofílico (HLB)

La selección de diferentes tensioactivos en la preparación de emulsiones O/W o W/O suele basarse en bases empíricas. En tal escala semi-empírica se utiliza el parámetro HLB desarrollado por Griffin [56]. Este valor se basa en el porcentaje relativo de grupos hidrofílicos y lipofílicos en la(s) molécula(s) de tensioactivo. En una emulsión O/W la cadena hidrófoba del tensioactivo reside en la gota de aceite mientras que la parte hidrofílica se ubica en la fase acuosa. Por el contrario, en las emulsiones W/O el/los grupo/s hidrofílicos residen en las gotas de agua formadas mientras que los grupos lipofílicos se sitúan en la fase hidrocarbonada.

Una guía para la selección de tensioactivos para aplicaciones determinadas se muestra en la Tabla 3. Aquí, se ve rango del parámetro HLB y cuál es el valor óptimo en función de objetivo para el cual se quiere utilizar el tensioactivo. Por otro lado, en la Tabla 4 se muestra el HLB requerido para la emulsión en función del tipo de aceite que se quiera emulsionar.

Rango HLB	Aplicación
3-6	Emulsión W/O
7-9	Agente humectante
8-18	Emulsión O/W
13-15	Detergente
15-18	Solubilizante

Tabla 3. Resumen de los rangos de HLB de los tensioactivos y sus aplicaciones [51].

Aceite	Emulsión W/O	Emulsión O/W
Aceite de parafina	4	10
Beeswax	5	9
Linolin	8	12
Ciclohexano	-	15
Tolueno	-	15

Tabla 4. Número de HLB requerido para la emulsificación de varios aceites [51].

La importancia relativa de los grupos hidrofílicos y lipofílicos fue reconocida por primera vez cuando usando mezclas de tensioactivos de bajo y alto HLB en diferentes porciones. Se determinó que la eficiencia de cualquier combinación (en función de la separación de fases) se maximiza cuando la mezcla contiene una proporción determinada de tensioactivo con el mayor número de HLB. Esto se ilustra en la Figura 7, que muestra la variación de la estabilidad de la emulsión, el tamaño de la gota y la tensión interfacial con relación al porcentaje de tensioactivo con un alto número de HLB.

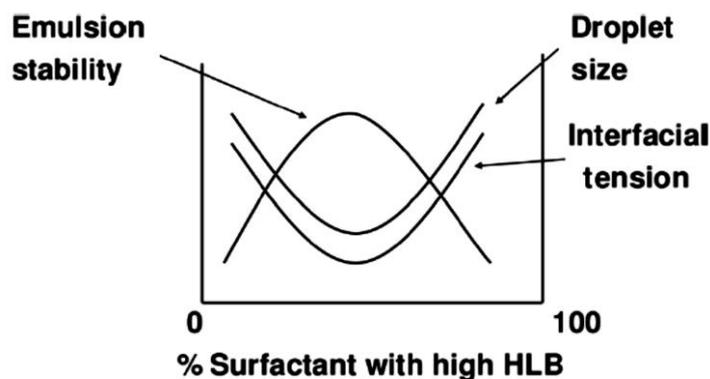


Figura 7. Variación de la estabilidad de una emulsión, el tamaño de gota y la tensión interfacial con relación al porcentaje de tensioactivo con mayor HLB [51].

1.3.3. Agregaciones y comportamiento de fase

Debido a la naturaleza anfifílica, los tensioactivos presentan dos propiedades muy interesantes y útiles: reducen la tensión superficial cuando son adsorbidos en una interfase específica (por ejemplo, aire-agua o aceite-agua) y tienen la habilidad de autoasociarse y autoorganizarse (*Self-Assembly*).

A bajas temperaturas, la solubilidad de las moléculas de tensioactivo se reduce en la solución. Hay un punto crítico, conocido como la temperatura de Krafft, por encima de la cual la solubilidad parece incrementarse rápidamente y la solución presenta a su vez agregados de tensioactivo y moléculas individuales. Por debajo de la temperatura de Krafft, no se forman agregados de tensioactivo.

Cuando a una solución (acuosa, por ejemplo) se le añade cada vez más tensioactivo, este comienza a adsorberse a las interfases disponibles, por tanto, su concentración en forma monomolecular aumenta hasta que se forman las primeras micelas.

En solución acuosa la fuerza motriz principal que favorece la formación de micelas es el efecto hidrófobo (que aumenta con el tamaño de la cadena hidrocarbonada del tensioactivo), es decir, la sustracción de la parte apolar del tensioactivo del contacto con las moléculas del agua orientándose para crear un contacto más favorable, desde el punto de vista energético, con las partes apolares de otras moléculas de tensioactivo. Por otra parte, existen efectos que tienden a oponerse a la formación de una micela como, por ejemplo, la repulsión de los grupos hidrofílicos, principalmente en el caso de tensioactivos iónicos. La presencia de alcohol que se intercala entre las moléculas de tensioactivo en la interfase, o la adición de electrolitos que producen un efecto pantalla que reduce el campo eléctrico intermolecular, reduce las fuerzas repulsivas favoreciendo la micelación. Los efectos que favorecen la micelación producen un descenso de la CMC y viceversa. Las micelas son las responsables de una propiedad fundamental de las soluciones de tensioactivos: su poder solubilizante.

Generalmente, muchas moléculas de tensioactivo se agregan de forma espontánea en medios acuosos comenzando a formar micelas con números de agregación (número de moléculas que constituyen el agregado) que varían de 50 a 100. Estas micelas son en la mayoría de los casos unidades esféricas, lo que resulta en una solución isotrópica de baja viscosidad.

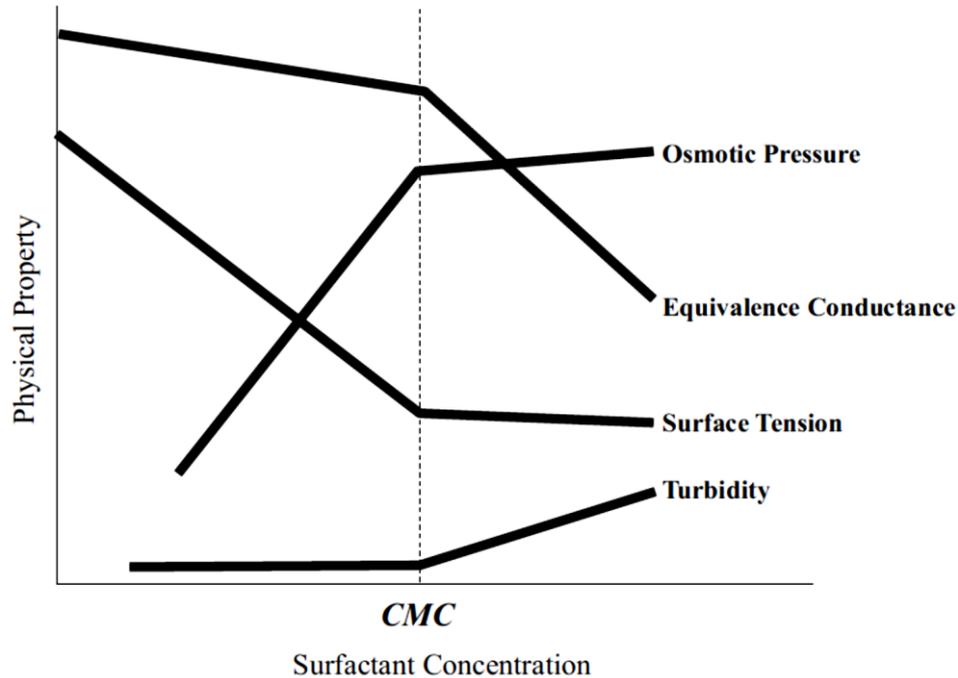


Figura 8. Variación de las diferentes propiedades físicas de un tensioactivo en solución antes y después de la CMC [55].

La micelización es un proceso de autoagregación fuertemente cooperativo que se produce a una concentración específica, la concentración micelar crítica (CMC). Por lo tanto, la CMC es un parámetro importante para caracterizar la autoagregación y puede depender de la naturaleza química del tensioactivo y el disolvente, así como de otros factores como el número y tamaño de las colas hidrófobas. En la CMC, la fracción de moléculas libres en la solución es la misma que la fracción de moléculas que forman el agregado. Un aumento adicional de la concentración da como resultado un aumento del número de moléculas en el agregado, mientras que la concentración de tensioactivo en la solución permanece sin cambios. El proceso es dinámico y, por lo tanto, hay un intercambio constante de moléculas entre los agregados y la solución [57].

Mediciones de la tensión superficial se usan comúnmente para la determinación de la CMC. La Figura 8 muestra que a medida que la concentración de tensioactivo en la solución aumenta, la tensión superficial disminuye. Esto sucede debido a una adsorción creciente de moléculas de tensioactivo en la interfase agua-aire, los grupos hidrofílicos están solvatados en el agua, mientras que los grupos hidrófobos se alejan de ella ordenándose en la superficie del agua formando una monocapa. Así las fuerzas intermoleculares (puentes de hidrógeno), que normalmente dan al agua una alta tensión superficial, quedan superadas; la tensión superficial disminuye. En la CMC, la pendiente de la curva de tensión superficial disminuye a casi cero. Existen otras propiedades físicas que se pueden usar para monitorear la formación de micelas y la determinación de CMC. Por ejemplo, en la CMC, el incremento de la presión osmótica cae hasta casi mantenerse constante. Un fuerte aumento de la turbidez también se observa mediante técnicas de dispersión

de luz. En las mediciones de conductancia, se observa una marcada disminución en la pendiente después de cruzar la CMC, lo que indica que hay muchas menos unidades móviles cargadas que las esperadas por las moléculas de tensioactivo individuales.

Un delicado equilibrio entre fuerzas opuestas es el aspecto clave en la autoagregación del tensioactivo el cual se ve afectado por una variedad de factores, como el tamaño del grupo hidrófobo, la concentración de tensioactivo, la naturaleza del grupo de cabeza polar y del contraión, la concentración de sal, el pH, la temperatura y la presencia de co-solutos [58][59].

Una simple micela esférica puede crecer formando estructuras cilíndricas que son anisotrópicas y muestran características de escala macroscópica. Incluso en estos casos, la solución se presenta como una sola fase. A medida que aumenta la concentración del tensioactivo, el crecimiento lineal también puede conducir a estructuras ramificadas que pueden llevar incluso a estructuras interconectadas (normalmente denominadas bicontinuas). A medida que aumenta la concentración, los anfifilos se pueden autoagregar para formar una gran variedad de estructuras.

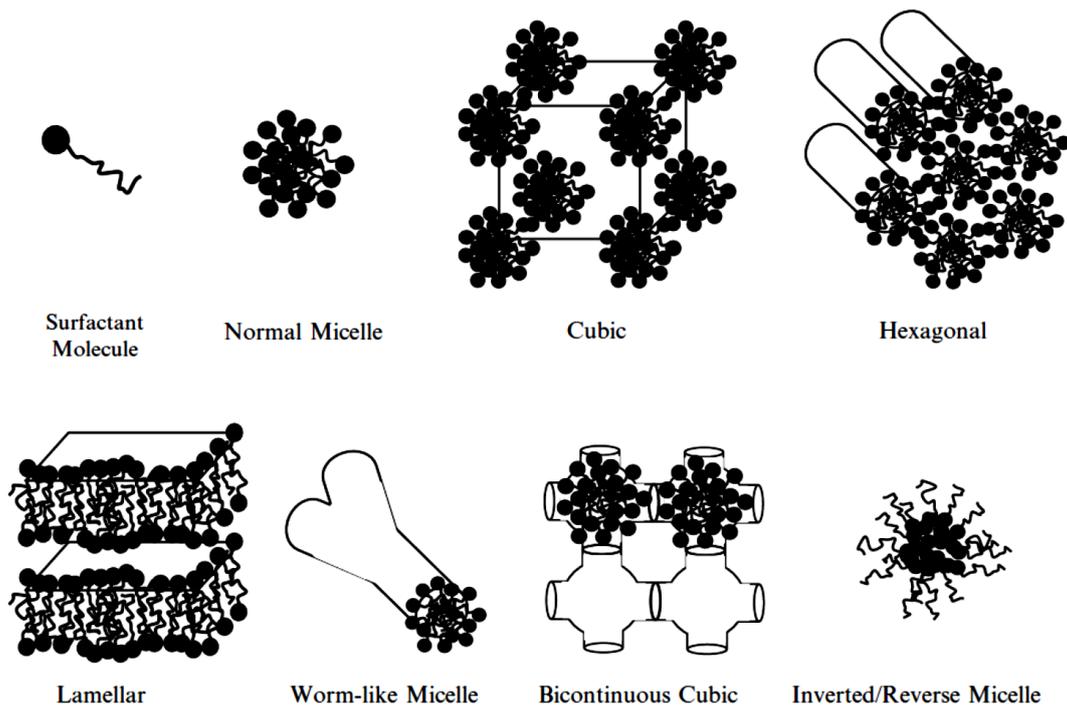


Figura 9. Ejemplos de diferentes estructuras de tensioactivos autoagregados [55].

Los agregados de tensioactivo se pueden dividir principalmente en dos grupos: los que se construyen a partir de ensamblajes limitados o discretos, que se pueden definir como aproximadamente esféricos, prolatos o cilíndricos; y autoagregados infinitos o ilimitados, en los que los agregados se conectan a través de distancias macroscópicas en una, dos o tres dimensiones. La estructura hexagonal es un ejemplo de continuidad unidimensional. Esta fase está formada por micelas cilíndricas (infinitamente largas) dispuestas en un patrón hexagonal, con

cada micela rodeada por otras seis micelas. El radio de la sección transversal circular (que puede estar algo deformada) es próxima a la longitud de la molécula de tensioactivo. Por otro lado, las lamelas planas muestran continuidad bidimensional. Esta estructura está formada por capas de moléculas de tensioactivo que se alternan con las capas de agua. El grosor de las bicapas es algo menor que el doble de la longitud de la molécula de tensioactivo. El grosor de la capa de agua puede variar considerablemente dependiendo de la naturaleza del tensioactivo. Las estructuras cúbicas son ejemplos de continuidad tridimensional.

1.3.4. Mezclas polímero-polímero y polímero-tensioactivo

El gran número de estudios realizados en mezclas acuosas de polímero-polímero y tensioactivo-polímero son la consecuencia de su importancia en muchos campos diferentes, desde la ciencia fundamental hasta las aplicaciones industriales. Se pueden encontrar mezclas de polímeros o polímeros y tensioactivos en productos de limpieza, en materiales de construcción, en papel, en alimentos, en productos farmacéuticos, etc. [60][61][62][63][64][65]. Los primeros estudios sobre sistemas de polímero-tensioactivo se relacionaron con el interés de comprender las interacciones entre el tensioactivo y las proteínas u otros polielectrolitos biológicos, con el objetivo de comprender los procesos biológicos [66][67]. Además, utilizando mezclas de polímeros o polímero y tensioactivo se pueden lograr diferentes efectos como estabilidad coloidal, floculación, emulsificación, estructuración o control reológico. En particular, polímeros y tensioactivos son muy utilizados como agentes reológicos o agentes gelificantes, y las mezclas de estos muestran comportamientos reológicos muy interesantes y diferentes a los obtenidos con ellos por separado [61][68][69][70][71][72][73][74].

1.3.4.1. Comportamiento de la fase

La tendencia de los agregados de polímero y tensioactivo a separarse en dos fases es mucho mayor que en mezclas de moléculas más pequeñas debido a la menor entropía de las mezclas de moléculas más grandes. Pero el comportamiento de las mezclas también está dictado por las interacciones entre las macromoléculas y entre éstas y el solvente [75]. Dos comportamientos de fase pueden ser claramente distinguidos considerando la distribución de las macromoléculas: asociativo y segregativo. En el primer caso, las macromoléculas se asocian en una fase concentrada común en equilibrio con una fase diluida y, en el segundo caso, las macromoléculas se segregan en diferentes fases de concentración total similar.

Los dos tipos de comportamiento se observaron por primera vez en soluciones de polímeros mixtos, pero, sin embargo, esto también se observa en sistemas polímero-tensioactivo [58][76]. La siguiente figura muestra diagramas de fase esquemáticos para ambos casos.

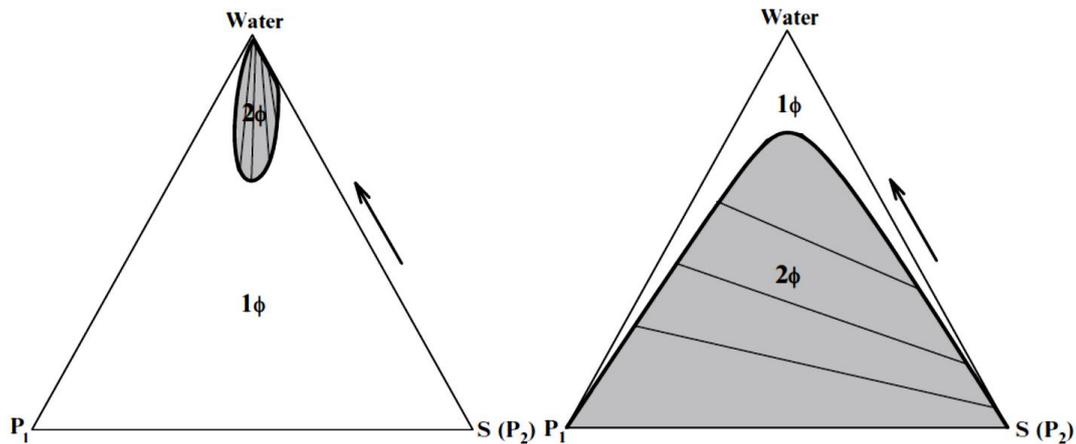


Figura 10. Diagramas de fase para comportamientos de fase asociativo (izquierda) y segregativo (derecha). 1ϕ y 2ϕ representan una y dos fases respectivamente [55].

Fuera de la región 2ϕ del diagrama asociativo, se encuentra la región 1ϕ que indica que la mezcla de los dos componentes presentes en la fase puede conducir a formación de complejos solubles o insolubles dependiendo de la composición o proporción de los dos componentes mezclados [76][77]. Este tipo de asociación es bastante típica para mezclas de carga opuesta o no iónicas [78][79][80][81][82]. El tamaño de la región de la separación en dos fases aumenta con el peso molecular del polímero, el tamaño micelar, la longitud de la cadena alquilo del tensioactivo y la densidad de carga del polielectrolito, mientras que disminuye con la adición de sal que apantalla las interacciones electrostáticas. La extensión de cada una de las fases en los sistemas no iónicos puede verse claramente afectada por la temperatura, además, una separación de fase asociativa se ve claramente favorecida por una disminución de la hidrofiliicidad de uno o ambos solutos.

La separación de fase segregativa ocurre cuando no hay atracción neta (hidrofóbica o electrostática) entre las macromoléculas. Se espera que la extensión de la separación de fases dependa de las interacciones de corto alcance entre los diversos componentes del sistema, incluyendo al disolvente, y a la entropía de la mezcla. Las diferencias en las interacciones de corto alcance generalmente favorecen la separación de fases y la entropía de la mezcla favorece la miscibilidad [77]. Como se explicó anteriormente, la entropía de la mezcla depende en gran medida del número de moléculas y agregados presentes en una composición determinada. Para mezclas no iónicas, esta viene dada por el número de moléculas de polímero y el número de agregación de los agregados de tensioactivo. Para las macromoléculas cargadas, numerosos iones pequeños, los contraiones, están presentes y la entropía de la mezcla es más grande en comparación con los no iónicos.

El comportamiento segregativo puede verse fuertemente afectado por la introducción de pequeñas fracciones iónicas. Este comportamiento de fase puede ser útil cuando, en una mezcla o formulación, ciertos componentes no deben asociarse sino mantenerse separados (por ejemplo,

para prevenir la desnaturalización o precipitación de proteínas en una mezcla). Para algunos sistemas, a una concentración de sal muy alta, el comportamiento puede cambiar de asociativo a segregativo.

1.3.4.2. CAC y fenómenos de redisolución

Los polímeros no cargados ligeramente hidrófobos y los polímeros cargados presentan importantes similitudes en sus interacciones con tensioactivos iónicos [77]. En ambos casos, se puede observar la unión del tensioactivo a la cadena del polímero, dando como resultado agregados de tipo micelar de moléculas de tensioactivo adsorbidas en la cadena de polímero. La unión del tensioactivo normalmente comienza a una concentración bastante bien definida, la llamada concentración de agregación crítica (CAC) [83], que es siempre más baja que la CMC del tensioactivo. La CAC puede considerarse simplemente como la CMC del tensioactivo en una disolución de polímero. En la CAC hay una fuerte unión cooperativa. Para aclarar el término unión cooperativa, éste representa una situación donde el tensioactivo prefiere unirse a una zona ocupada por otra molécula de tensioactivo. Una unión no cooperativa indica que la molécula no tiene preferencia por ningún dominio; y la unión anticooperativa indica la preferencia por un dominio no ocupado.

La unión de tensioactivos se caracteriza normalmente por su marcada cooperatividad debido a la interacción hidrófoba entre las cadenas de tensioactivo (la unión es en realidad una formación de micelas en la superficie del polímero). Pero hay otros comportamientos, por ejemplo, en el caso de los HMP (*hydrophobic modified wáter-soluble polymers*) el escenario es bastante diferente, ya que los grupos hidrófobos tienen la capacidad de asociarse y las moléculas individuales de tensioactivo se solubilizan en las micelas de polímero [77].

Al igual que la CMC, la CAC disminuye con el incremento de la longitud de cadena del tensioactivo, pero a diferencia de la CMC para sistemas con cargas, la CAC se incrementa con la concentración de polímero o de sal. La naturaleza química del grupo de cabeza del tensioactivo también puede afectar a la fuerza de interacción polímero-tensioactivo. Los tensioactivos aniónicos muestran una marcada interacción con la mayoría de homopolímeros, mientras que los tensioactivos aniónicos muestran una interacción más débil pero significativa [58][77]. Los tensioactivos no iónicos y los tensioactivos zwitteriónicos rara vez muestran una interacción notable [58][77]. Cuando se alcanza la CAC, se observa un estancamiento de la tensión superficial hasta que todos los polímeros se saturan con moléculas de tensioactivo. Este estancamiento de la tensión superficial aumenta su valor linealmente con la concentración de polímero [58].

Hay diferentes escenarios para la micelación de tensioactivos interactuando con las cadenas de polímero, incluyendo diferentes tipos de unión. Para los tensioactivos iónicos y los

homopolímeros hidrofílicos, la micelación ocurre en las inmediaciones de la cadena de polímero. Si la interacción atractiva entre el polímero y el tensioactivo es fuerte como en el caso de sistemas cargados opuestamente, habrá una unión cooperativa pronunciada de las moléculas de tensioactivo a las cadenas de polímero. Los tamaños de las micelas son similares con y sin polímero, de igual modo que el número de agregación [58].

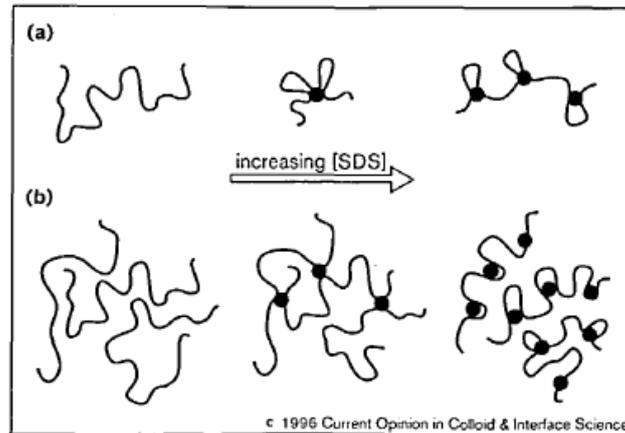


Figura 11. Efecto de un tensioactivo iónico en las interacciones intra e interpoliméricas (a) en el régimen diluido y (b) en el régimen semidiluido. La concentración de tensioactivo aumenta al ir a la derecha en la figura. A concentraciones intermedias de tensioactivo (es decir, un número bajo de micelas por cadena de polímero), hay una contracción de la cadena de polímero en soluciones de polímero diluido y un efecto de reticulación en las soluciones semidiluidas. A medida que aumenta el número de micelas por cadena de polímero, los polímeros se hinchan en el régimen diluido debido a la repulsión electrostática entre las micelas. En el régimen semidiluido, la red se descompone a medida que las interacciones intrapoliméricas toman el control [84].

Para los polímeros modificados hidrófobamente el escenario es más complejo. Hay una interacción hidrófoba entre estos polímeros y las moléculas de tensioactivo. A bajas concentraciones de tensioactivo, hay una cantidad reducida de uniones no cooperativas de moléculas individuales de tensioactivo. A concentraciones intermedias, aparece un número determinado de uniones anti-cooperativas independiente a la concentración de moléculas de tensioactivo en el sistema y, finalmente, como la concentración de tensioactivo es igual al CAC, uniones típicamente cooperativas pueden observarse [58]. Una representación esquemática de estos fenómenos puede verse en la siguiente figura:

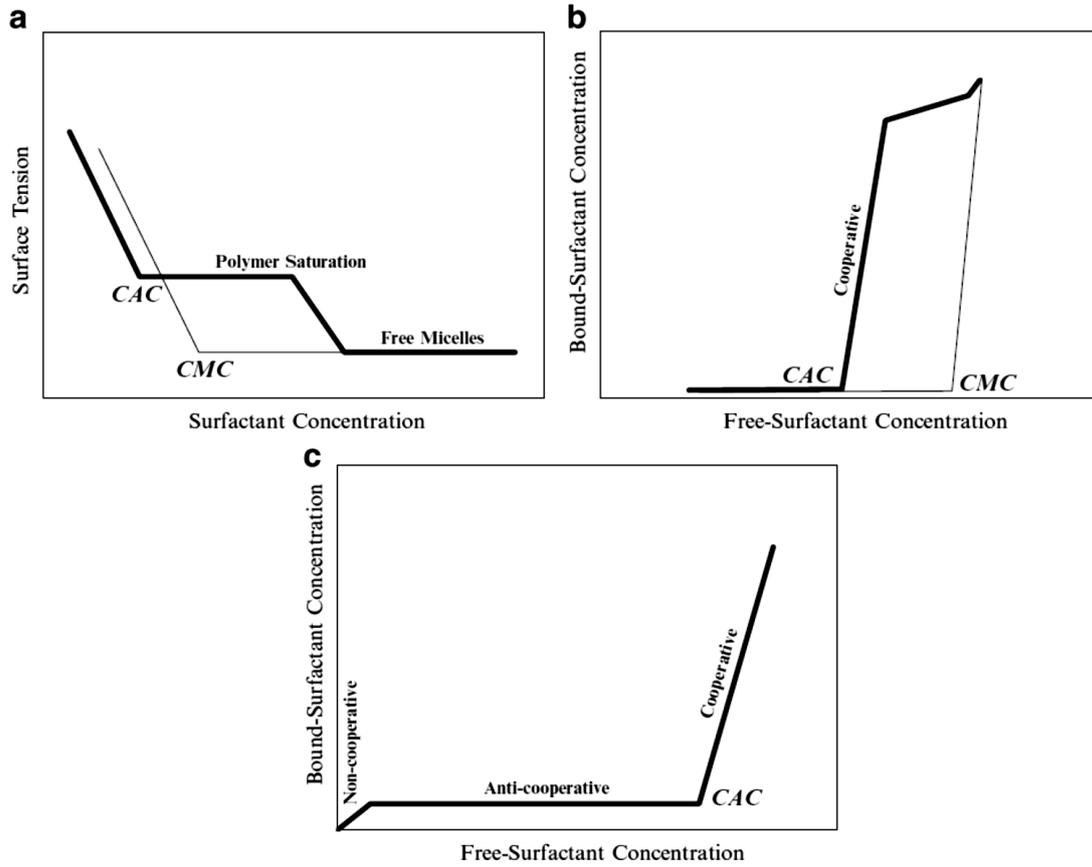


Figura 12. Tendencia de la tensión superficial en función de la concentración de tensioactivo en presencia y ausencia de un homopolímero (a) unión del tensioactivo en presencia o ausencia de polímero (b) y unión de la asociación entre un tensioactivo iónico y un polímero modificado hidrófobamente [55].

Los poliiones se asocian fuertemente con iones tensioactivos de carga opuesta debido a la fuerte atracción electrostática entre las dos especies y a la gran ganancia entrópica (liberación de contraiones).

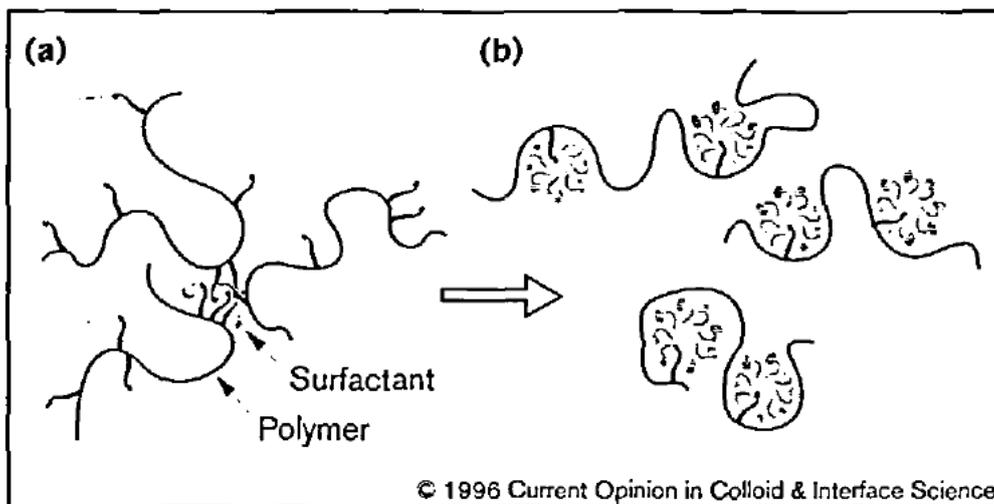


Figura 13. Ilustración esquemática de la interacción entre polímeros anfifílicos y tensioactivos. Los grupos laterales hidrófobos injertados en el polímero se asocian en ausencia del tensioactivo. Las primeras moléculas de tensioactivo añadido se disuelven en estos dominios (a) para formar micelas mixtas. Para tensioactivos iónicos, una unión inicialmente no cooperativa va seguida de una unión no cooperativa a medida que aumenta la ratio de tensioactivo/agregado. A concentraciones más altas de tensioactivo (b) el tensioactivo forma micelas (unión cooperativa), disolviendo así los grupos hidrófobos del polímero. Cuando el número de micelas es igual al número de zonas hidrofóbicas del polímero, la reticulación del polímero es despreciable [84].

La separación de fases ocurre a menudo, lo que resulta en una fase concentrada en polímeros y agregados de iones tensioactivo en equilibrio con una fase diluida [58][76][85]. La separación de fases de los complejos de iones de polímero (tensioactivo) aparece ya sea en la CAC o en concentraciones ligeramente por encima de CAC, dependiendo de la concentración de polímeros y las características del sistema [85][86]; en otras palabras, en algunos sistemas, es posible unir una cantidad considerable de iones tensioactivos al polímero antes de que se produzca la separación de fases, mientras que en otras mezclas se observa una separación de fases a concentraciones muy bajas de tensioactivos [87][88][89]. Por otro lado, podría ocurrir una redisolución de la fase concentrada. Ocurre cuando los complejos no estequiométricos se vuelven a disolver en una sola fase. La redisolución se puede lograr mediante la adición de un exceso de tensioactivo o polielectrolito, pero los mecanismos que hay detrás de este fenómeno aún no se conocen completamente. Un posible escenario es el siguiente: cuando el tensioactivo adicional se une al polímero (por encima de la equivalencia de carga), los complejos se sobrecargan. En algunos sistemas, puede producirse una segunda unión cooperativa de iones tensioactivo en la llamada CAC (2), que a veces se denomina CAC hidrofóbica, porque la unión cooperativa ocurre debido a una asociación hidrofóbica del exceso de iones tensioactivo al neutro complejo [90]. Esto puede llevar a la redisolución. La Figura 14 muestra una representación hipotética del tipo de isoterma de unión CAC (2).

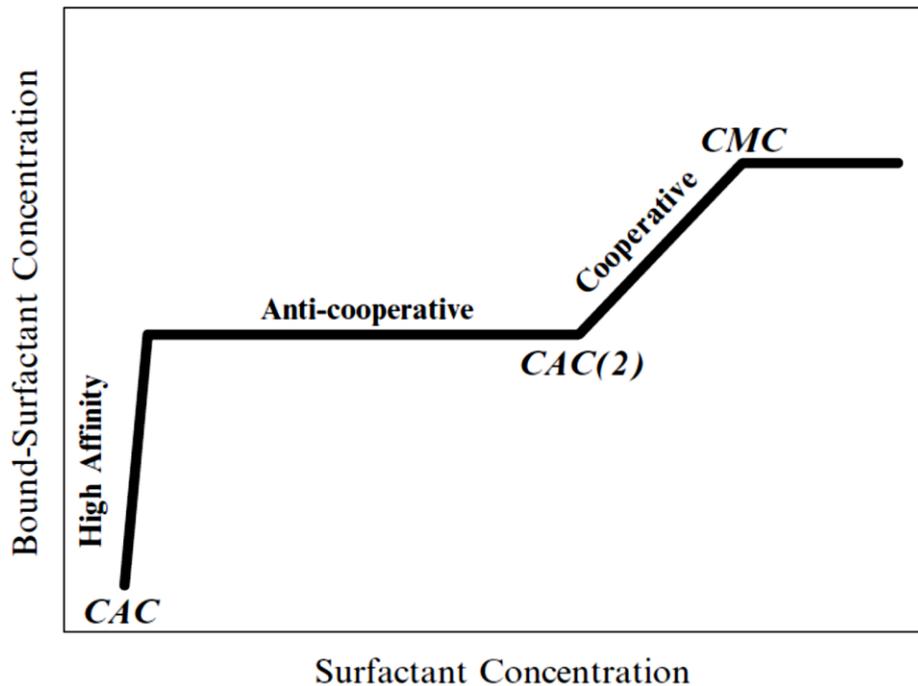


Figura 14. Tendencia de la unión cuando CAC(2) está presente [90].

En conclusión, en algunos sistemas se produce una redisolución eficiente; sin embargo, hay otros sistemas en los que la redisolución eficiente no se logra al agregar exceso de tensioactivo o polielectrolito. Esto también es válido para sistemas polímero-polímero.

1.3.5. Interacciones proteína-tensioactivo

Ya que las proteínas y los tensioactivos son ambos anfifílicos, es natural que interactúen. Estas interacciones muestran similitudes a otros sistemas tensioactivo-macromoléculas, en particular a sistemas con polímeros anfifílicos, tales como polímeros solubles en agua hidrofólicamente modificados. Los sistemas que contienen proteínas difieren de otros polímeros en que son monodispersas y en que son compactas y con falta de libertad conformacional. Las proteínas son polímeros anfifílicos con una densidad de carga variable. Además, las proteínas se diferencian mucho entre unas y otras, por tanto, consideraciones generales son difíciles de obtener. Es por ello que los estudios en referencia a proteínas con tensioactivos son limitados y muy pocos modelos generales han sido construidos [58][77].

Las proteínas y los tensioactivos no solo interactúan porque probablemente tengan cargas opuestas sino también porque ambos son anfifílicos. Estas uniones pueden conducir a la desnaturalización de la proteína y, en consecuencia, la proteína se puede encontrar en diferentes estados conformacionales en la mezcla. Los complejos proteína-tensioactivo que involucran proteínas desnaturalizadas encuentran algunas analogías con los complejos de tensioactivos y polímeros parcialmente hidrófobos y flexibles.

1.3.5.1. Tensión superficial y solubilización como evidencia de las interacciones entre tensioactivos y proteínas

La curva normal que surge de representar la tensión superficial frente a la concentración de tensioactivo se ve modificada por las proteínas de una manera similar a la observada en homopolímeros ligeramente polares. Así, la Figura 15, muestra la tensión superficial de una solución de dodecil sulfato de sodio en presencia de gelatina. La pendiente de la curva de la tensión superficial sufre una reducción justo antes de la CMC, concentración a partir de la cual el valor de la tensión superficial casi se mantiene constante en un rango de concentraciones de tensioactivo. Posteriormente a esta región, una disminución de los valores de esta tensión hasta aproximarlos a los de la disolución que únicamente contiene tensioactivo. En el caso de tensioactivos no iónicos, no se observa influencia de la proteína, como se puede ver en la Figura 15. Sin embargo, para otros casos, una clara interacción se observa entre la proteína y el tensioactivo no iónicos a partir de la tensión superficial Figura 16. La mayoría de los polímeros no se asocian con tensioactivos no iónicos, con la excepción general de ser polímeros fuertemente anfifílicos, como los polímeros solubles en agua hidrófobamente modificados.

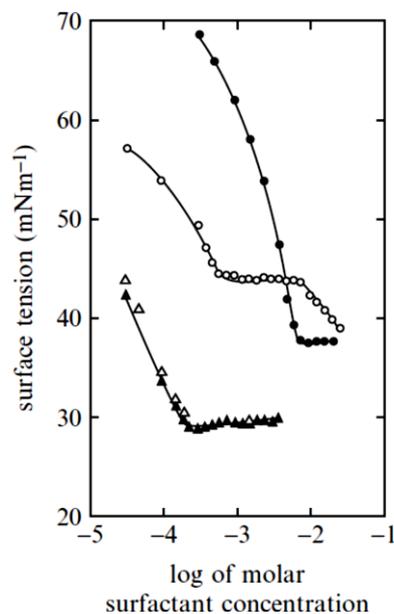


Figura 15. Efecto de la gelatina en la tensión superficial de soluciones de dodecil sulfato de sodio (círculos) y Triton X-100 (octil fenol etoxilato) (triángulos): símbolos rellenos, sin proteína; símbolos sin relleno, en presencia de proteína [91].

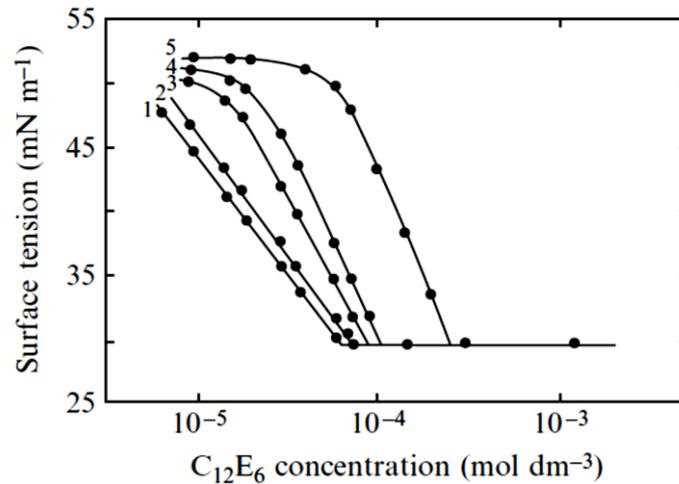


Figura 16. Curva de la tensión superficial de C₁₂E₆ en presencia de albúmina de suero bovino, de las siguientes concentraciones: (1) 0; (2) 10⁻⁶; (3) 5x10⁻⁶; (4) 1x10⁻⁵; (5) 5x10⁻⁵ [92].

La solubilidad de una sustancia no polar no soluble en agua, como un tinte, empieza a ser importante sobre la CMC para una solución de tensioactivo. En presencia de un polímero, la solubilización comienza a una concentración más baja, lo que manifiesta una micelización de tensioactivo inducida por polímeros. Se observa un efecto análogo para muchas soluciones de proteínas, como se ilustra en la Figura 17. Esto indica que una proteína soluble en agua también puede inducir a la autoagregación de un tensioactivo y la formación de microdominios hidrófobos. Sin embargo, este comportamiento no es claro como para muchos sistemas de homopolímeros, y es difícil identificar una concentración de asociación crítica.

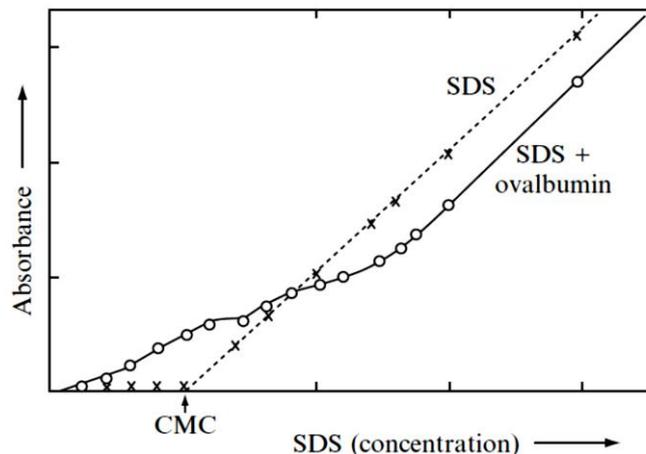


Figura 17. La solubilización (medida por el incremento de la absorbancia de UV) del (dimetilamino) azobenceno por los complejos de ovoalbúmina-dodecil sulfato de sodio [92].

1.4. RETICULACIÓN

La reticulación es un proceso donde las largas cadenas que forman los polímeros se unen entre sí mediante enlaces covalentes, aumentando así la masa molecular del polímero como resultado de

esta unión. Es una etapa muy importante en el proceso de fabricación de microcápsulas ya que las uniones que forman estos enlaces covalentes son estables mecánica y térmicamente, es decir que una vez formadas son difíciles de romper. Si se consigue una buena reticulación de las microcápsulas se puede conseguir que estas tengan una buena estabilidad y no se rompan fácilmente. Además, regulan la compacidad de la pared de la microcápsula dando lugar a cambios en el transporte másico de los componentes del núcleo de la cápsula hacia el exterior de esta a través de la pared.

Cuando las cadenas del polímero están unidas entre sí por enlaces cruzados, pierden la capacidad de moverse como un polímero con cadenas individuales. Por ejemplo, un polímero líquido (tal como una resina) se puede convertir en un "sólido" o "gel" por reticulación de las cadenas.

Dependiendo del polímero se pueden utilizar diferentes técnicas para provocar la reticulación, pero, en todos los casos, la estructura química del polímero se altera debido al proceso. La modificación resultante de las propiedades mecánicas depende fuertemente de la densidad de reticulación. Si la densidad de reticulación es baja, la viscosidad de polímeros fundidos se reduce. Si la densidad de reticulación es intermedia, los polímeros gomosos se transforman en materiales con propiedades elastoméricas y con una gran resistencia. Cuando la densidad de reticulación es elevada puede dar lugar a materiales muy rígidos.

Las propiedades de los polímeros que se pueden mejorar mediante este proceso son amplias. Entre ellas se encuentran:

- Propiedades mecánicas, tales como la resistencia a la tracción
- Resistencia al rayado
- Rendimiento a altas temperaturas más altas
- Resistencia a productos químicos
- Memoria de forma

Los enlaces cruzados se pueden formar por reacciones químicas que se inician por la temperatura, la presión, el cambio en el pH, o la radiación. Para facilitar que se produzcan estos enlaces entre dos polímeros se añaden agentes reticulantes al proceso. Cada agente reticulante contiene extremos que reaccionan con grupos funcionales específicos, como por ejemplo las aminas primarias, sobre las proteínas u otras moléculas. La propiedad más importante de un agente reticulante es el grupo químico reactivo ya que de este depende el método y el mecanismo con los que se modificarán las propiedades del polímero o polímeros que estén siendo reticulados. Estos agentes contienen al menos dos grupos reactivos. Entre estos grupos destacan las aminas primarias, los sulfhidrilos, carbonilos, hidratos de carbono y ácidos carboxílicos.

Los agentes reticulantes se seleccionan sobre la base de sus reactividades químicas (es decir, la especificidad para los grupos funcionales particulares) y compatibilidad de la reacción con la aplicación. El mejor agente de reticulación a utilizar para una aplicación específica debe ser determinado empíricamente. Los agentes reticulantes son elegidos en base a las siguientes características:

- Especificidad química
- Longitud de la cadena
- Solubilidad en agua y permeabilidad de la membrana celular
- Mismo (homobifuncional) o diferente (heterobifuncional) grupo reactivo
- Grupos que son espontáneamente reactivos

1.4.1. Cinética de reacción

La cinética química es un área de la fisicoquímica que se encarga del estudio de la rapidez de reacción, cómo cambia la rapidez de reacción bajo condiciones variables y qué eventos moleculares se efectúan mediante la reacción general (difusión, ciencia de superficies, catálisis). El objeto de la cinética química es medir la rapidez de las reacciones químicas y encontrar ecuaciones que relacionen la rapidez de una reacción con variables experimentales. Experimentalmente la velocidad de una reacción puede ser descrita a partir de la concentración o concentraciones de las especies involucradas en la reacción y una constante k , sin embargo, esta puede depender de numerosos factores (el solvente utilizado, el uso de catalizadores, fenómenos de transporte, material del reactor, etc...), haciendo muy complejo el proceso de determinación de velocidades de reacción.

Se pueden clasificar las reacciones en simples o complejas dependiendo del número de pasos o de estados de transición que deban producirse para describir la reacción química. Si solo es necesario un paso (un estado de transición) se dice que la velocidad de reacción es simple y el orden de la reacción corresponde a la suma de coeficientes estequiométricos de la ecuación. Si no es así, se debe proponer una serie de pasos (cada uno con un estado de transición) denominados mecanismos de la reacción que correspondan a la velocidad de reacción encontrada. Las reacciones también se pueden clasificar cinéticamente en homogéneas y heterogéneas. La primera ocurre en una fase y la segunda en más de una fase. La reacción heterogénea depende del área de una superficie ya sea la de las paredes del vaso o de un catalizador sólido.

La velocidad de reacción es la rapidez con que se modifica la concentración de un producto o un reactivo al transcurrir el tiempo.

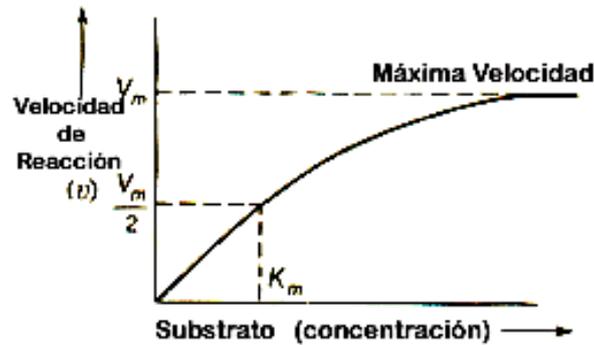


Figura 18. Velocidad de reacción vs Sustrato en cinética enzimática [93].

La medida de la velocidad de reacción implica la medida de la concentración de uno de los reactivos o productos a lo largo del tiempo, esto es, para medir la rapidez de una reacción necesitamos medir, o bien la cantidad de reactivo que desaparece por unidad de tiempo, o bien la cantidad de producto que aparece por unidad de tiempo. La rapidez de reacción se mide en unidades de concentración/tiempo, esto es, en (mol/l)/s, es decir, moles/(l·s).

Para una reacción de la forma:



La ley de la velocidad de formación es la siguiente:

$$v_R = -\frac{dc_A}{dt} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde v_R es la velocidad de la reacción y $(-dc_A)$ la disminución de la concentración del reactivo A en un tiempo dt . Esta velocidad es la rapidez media de la reacción, pues todas las moléculas necesitan tiempos distintos para reaccionar.

La velocidad con la que aparece el producto es igual a la velocidad de desaparición del reactivo. De este modo, la ley de la velocidad se puede escribir de la siguiente forma:

$$v_R = -\frac{dc_A}{dt} = \frac{dc_B}{dt} = \frac{dc_C}{dt} \quad \text{Ecuación 6}$$

Esta velocidad no es constante y depende de varios factores:

- **Concentración de los reactivos:** Uno de los factores más importantes es la concentración de los reactivos. Cuantas más partículas existan en un volumen, más colisiones hay entre las partículas por unidad de tiempo. Al principio, cuando la concentración de reactivos es mayor, también es mayor la probabilidad de que se den colisiones entre las moléculas, y la rapidez es mayor. A medida que la reacción avanza, al ir disminuyendo la concentración de los reactivos, disminuye la probabilidad de colisión y con ella la rapidez de la reacción.

- **Temperatura:** Un incremento de la temperatura provoca un incremento en la energía cinética de las moléculas, lo que hace que sea mayor el número de moléculas que alcanza la energía de activación.
- **Catalizadores:** Los catalizadores cambian la energía de activación de una determinada reacción, y por lo tanto varían la velocidad de reacción.

Cuando la reacción que se estudia es de tipo enzimática, es decir, cuando las reacciones químicas son catalizadas mediante enzimas, su cinética de reacción tiene un comportamiento diferente.

La cinética enzimática estudia la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas. Estos estudios proporcionan información directa acerca del mecanismo de la reacción catalítica y de la especificidad del enzima. La velocidad de una reacción catalizada por un enzima puede medirse con relativa facilidad, ya que en muchos casos no es necesario purificar o aislar el enzima. La medida se realiza siempre en las condiciones óptimas de pH, temperatura, presencia de cofactores, etc, y se utilizan concentraciones saturantes de sustrato. En estas condiciones, la velocidad de reacción observada es la velocidad máxima ($v_{m\acute{a}x}$). La velocidad puede determinarse bien midiendo la aparición de los productos o la desaparición de los reactivos Figura 18.

Al seguir la velocidad de aparición de producto [93][94] (o de desaparición del sustrato) en función del tiempo se obtiene la llamada curva de avance de la reacción, o simplemente, la cinética de la reacción. A medida que la reacción transcurre, la velocidad de acumulación del producto va disminuyendo porque se va consumiendo el sustrato de la reacción. Para evitar esta complicación se procede a medir la velocidad inicial de la reacción (v_0). La velocidad inicial de la reacción es igual a la pendiente de la curva de avance a tiempo cero (Figura 19). De esta forma, la medida de v_0 se realiza antes de que se consuma el 10% del total del sustrato, de forma que pueda considerarse la concentración de sustrato [S] como esencialmente constante a lo largo del experimento. Además, en estas condiciones no es necesario considerar la reacción inversa, ya que la cantidad de producto formada es tan pequeña que la reacción inversa apenas ocurre. De esta forma se simplifican enormemente las ecuaciones de velocidad.

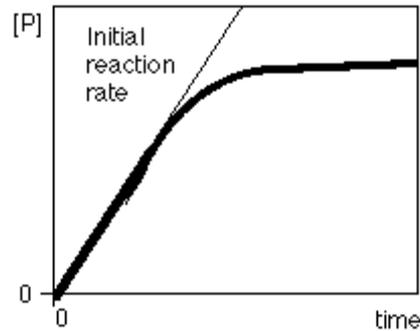


Figura 19. Velocidad de acumulación del producto [93].

Para estudiar la cinética enzimática se mide el efecto de la concentración inicial de sustrato ($[S]_0$) sobre la velocidad inicial de la reacción (v_0), manteniendo la cantidad de enzima constante. Si representamos v_0 frente a $[S]_0$ obtenemos una gráfica como la de la Figura 20. Cuando $[S]_0$ es pequeña, la velocidad inicial es directamente proporcional a la concentración de sustrato, y por tanto, la reacción es de primer orden. A altas $[S]_0$, la enzima se encuentra saturada por el sustrato, y la velocidad ya no depende de $[S]_0$. En este punto, la reacción es de orden cero y la velocidad es máxima ($v_{m\acute{a}x}$).

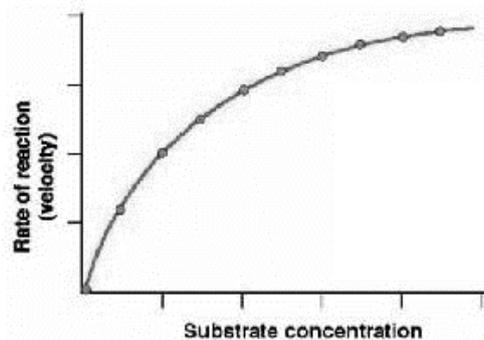


Figura 20. Velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato [S] [93].

Para poder estudiar el comportamiento cinético de las enzimas se utiliza el método cinético de Michaelis-Menten. Como las reacciones catalizadas por enzimas son saturables, la velocidad de catálisis no muestra un comportamiento lineal en una gráfica al aumentar la concentración de sustrato. Si la velocidad inicial de la reacción se mide a una determinada concentración de sustrato ($[S]$), la velocidad de la reacción (v) aumenta linealmente con el aumento de la $[S]$. Sin embargo, cuando aumentamos la $[S]$, la enzima se satura de sustrato y alcanza su velocidad máxima ($v_{m\acute{a}x}$), que no sobrepasará en ningún caso, independientemente de la $[S]$.

Siguiendo el modelo de cinética michaeliana para una reacción de único sustrato, inicialmente, tiene lugar una reacción química bimolecular entre la enzima E y el sustrato S, formándose el complejo enzima-sustrato ES. Aunque el mecanismo enzimático para una reacción unimolecular

$E + S \xrightarrow{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$, donde P es el producto, puede ser bastante complejo, existe una etapa enzimática limitante que permite que el mecanismo sea simplificado como una etapa cinética única cuya constante es k_2 .

$$v = k_2[ES] \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde k_2 también llamado k_{cat} o número de recambio, hace referencia al máximo número de reacciones enzimáticas catalizadas por segundo.

A bajas concentraciones de sustrato, la enzima permanece en un equilibrio constante entre la forma libre E y el complejo enzima-sustrato ES. Aumentando la [S] también se aumenta la [ES] a expensas de la [E], desplazando el equilibrio de la reacción hacia la derecha. Puesto que la velocidad de reacción depende de la [ES], la velocidad es sensible a pequeños cambios en la [S]. Sin embargo, a altas [S], la enzima se satura y solo queda la forma unida al sustrato ES. Bajo estas condiciones, la velocidad de la reacción $v \approx k_2[E]_{tot} = V_{m\acute{a}x}$ deja de ser sensible a pequeños cambios en la [S]. En este caso, la concentración total de enzima ($[E]_{tot}$) es aproximadamente igual a la concentración del complejo ES:

$$[E]_{tot} \stackrel{\text{def}}{=} [E] + [ES] \quad \text{Ecuación 8}$$

La ecuación de Michaelis-Menten⁸ describe cómo la velocidad de la reacción depende del equilibrio entre la [S] y la constante k_2 . Leonor Michaelis y Maud Menten demostraron que si k_2 es mucho menor que k_1 (aproximación del equilibrio) se puede deducir la siguiente ecuación:

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_m + [S]} \quad \text{Ecuación 9}$$

Esta famosa ecuación es la base de la mayoría de las cinéticas enzimáticas de sustrato único[93].

1.4.1.1. Representación de la ecuación de Michaelis-Menten

La gráfica que representa v frente a [S] (Figura 20) mostrada anteriormente no es lineal. Aunque a bajas concentraciones de sustrato se mantenga lineal, se va curvando a medida que aumenta la concentración de sustrato. Antes de la llegada de los ordenadores, que permiten ajustar regresiones no lineales de forma sencilla, podía llegar a ser realmente difícil estimar los valores de K_m y la $v_{m\acute{a}x}$ en las gráficas no lineales. Esto dio lugar a que varios investigadores concentraran sus esfuerzos en desarrollar linealizaciones de la ecuación de Michaelis-Menten, dando como resultado la gráfica de Lineweaver-Burke y el diagrama de Eadie-Hofstee.

La gráfica de Lineweaver-Burk o representación de doble recíproco es la forma más común de mostrar los datos cinéticos. Para ello, se toman los valores inversos a ambos lados de la ecuación

de Michaelis-Menten. Como se puede apreciar en la Figura 21, el resultado de este tipo de representación es una línea recta cuya ecuación es $y = mx + c$, siendo el punto de corte entre la recta y el eje de ordenadas equivalente a $1/V_{m\acute{a}x}$, y el punto de corte entre la recta y el eje de abscisas equivalente a $-1/K_m$.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad \text{Ecuaci3n 10}$$

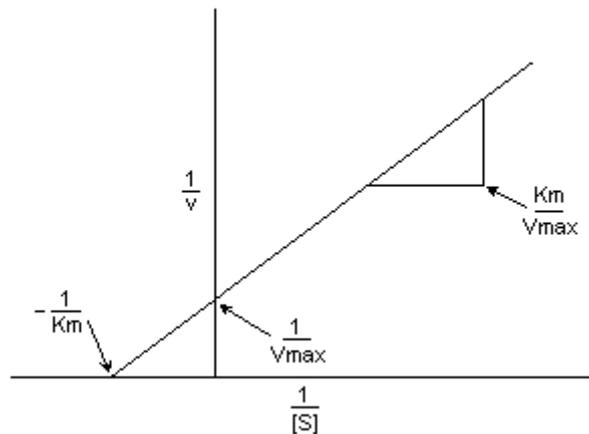


Figura 21. Gráfica de Lineweaver-Burke [93].

1.4.2. Cinética de reticulaci3n

Anteriormente se ha explicado en que consiste la cinética de cualquier reacci3n. En este apartado se desarrollará el comportamiento químico específico que se produce en la reacci3n de reticulaci3n que es un sistema heterogéneo por lo que suelen tratarse de reacciones limitadas por difusi3n.

1.4.2.1. Difusi3n

El reticulante es absorbido por las microcápsulas que se van formando, por tanto, se produce un transporte másico entre los elementos, es decir, la reacci3n que se produce está limitada por difusi3n. La difusi3n corresponde al movimiento microscópico de átomos y moléculas. Esta está presente en todos los estados de agregaci3n de la materia y ocurre debido a un gradiente en el potencial químico. La difusi3n, en ausencia de un campo externo, es un proceso espontáneo, por lo tanto, siempre ocurre por una reducci3n en la energía libre de Gibbs (en direcci3n al equilibrio).

La ley de Fick es una ley cuantitativa en forma de ecuaci3n diferencial que describe diversos casos de difusi3n de materia o energía en un medio en el que inicialmente no existe equilibrio químico o térmico. En situaciones en las que existen gradientes de concentraci3n de una sustancia, o de temperatura, se produce un flujo de partículas o de calor que tiende a homogeneizar la

disolución y uniformizar la concentración o la temperatura. El flujo homogeneizador es una consecuencia estadística del movimiento random de las partículas que da lugar al segundo principio de la termodinámica, conocido también como movimiento térmico casual de las partículas. Así los procesos físicos de difusión pueden ser vistos como procesos físicos o termodinámicos irreversibles.

La ley de Difusión de Fick toma en cuenta ciertos parámetros para determinar el nivel de difusión de una especie dada:

- Magnitud de gradiente
- Superficie de difusión
- Difusividad másica entre A y B, definida para una especie A difundiendo en una especie B.

1.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. Bakry *et al.*, “Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications,” *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 15, pp. 143–182, 2015.
- [2] N. Agnihotri, R. Mishra, C. Goda, and M. Arora, “Microencapsulation – A Novel Approach in Drug Delivery: A Review,” *Indo Glob. J Pharm Sci*, vol. 2, pp. 1–20, 2012.
- [3] H. G. de Jong and H. R. Kruyt, “Complex colloid systems,” *Colloid Sci.*, vol. 2, pp. 335–432, 1949.
- [4] S. Boral and H. B. Bohidar, “Effect of Ionic Strength on Surface-Selective Patch Binding-Induced Phase Separation and Coacervation in Similarly Charged Gelatin–Agar Molecular Systems,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 114, no. 37, pp. 12027–12035, Sep. 2010.
- [5] D. Klassen, “Associative phase separation in admixtures of pea protein isolates with gum Arabic and a canola protein isolate with κ -carrageenan and alginate.” pp. 6–11, 2010.
- [6] J. T. G. Overbeek and M. J. Voorn, “Phase separation in polyelectrolyte solutions. Theory of complex coacervation,” *J. Cell. Comp. Physiol.*, vol. 49, no. S1, pp. 7–26, 1957.
- [7] A. Veis, “PHASE SEPARATION IN POLYELECTROLYTE SOLUTIONS. II. INTERACTION EFFECTS,” *J. Phys. Chem.*, vol. 65, no. 10, pp. 1798–1803, Oct. 1961.
- [8] A. Nakajima and H. Sato, “Phase relationships of an equivalent mixture of sulfated

- polyvinyl alcohol and aminoacetylated polyvinyl alcohol in microsalt aqueous solution,” *Biopolymers*, vol. 11, no. 7, pp. 1345–1355, 1972.
- [9] K.-I. Tainaka, “Effect of counterions on complex coacervation,” *Biopolymers*, vol. 19, no. 7, pp. 1289–1298, 1980.
- [10] A. Gupta and H. B. Bohidar, “Kinetics of phase separation in systems exhibiting simple coacervation,” *Phys. Rev. E*, vol. 72, no. 1, p. 11507, Jul. 2005.
- [11] J.-L. Doublier, C. Garnier, D. Renard, and C. Sanchez, *Protein–polysaccharide interactions*, vol. 5. 2000.
- [12] S. Gouin, “Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 15, no. 7–8, pp. 330–347, Jul. 2004.
- [13] J. Helman, *Farmacotécnia Teórica y Práctica*. Continental, 1980.
- [14] V. Jack R. Lorraine, Newport News, “United States Patent (19,” vol. 19, no. 54, 1985.
- [15] C. Y. G. Lemetter, F. M. Meeuse, and N. J. Zuidam, “Control of the morphology and the size of complex coacervate microcapsules during scale-up,” *AIChE J.*, vol. 55, no. 6, pp. 1487–1496, 2009.
- [16] Z. Xiao, W. Liu, G. Zhu, R. Zhou, and Y. Niu, “A review of the preparation and application of flavour and essential oils microcapsules based on complex coacervation technology,” *J. Sci. Food Agric.*, vol. 94, no. 8, pp. 1482–1494, 2014.
- [17] F. Weinbreck, M. Minor, and C. G. de Kruif, “Microencapsulation of oils using whey protein/gum arabic coacervates,” *J. Microencapsul.*, vol. 21, no. 6, pp. 667–679, Sep. 2004.
- [18] X. Jun-xia, Y. Hai-yan, and Y. Jian, “Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic,” *Food Chem.*, vol. 125, no. 4, pp. 1267–1272, 2011.
- [19] L. A. C. Zuanon, C. R. Malacrida, and V. R. N. Telis, “Production of Turmeric Oleoresin Microcapsules by Complex Coacervation with Gelatin–Gum Arabic,” *J. Food Process Eng.*, vol. 36, no. 3, pp. 364–373, 2010.
- [20] Z. J. Dong, A. Toure, C. S. Jia, X. M. Zhang, and S. Y. Xu, “Effect of processing parameters on the formation of spherical multinuclear microcapsules encapsulating

- peppermint oil by coacervation.” *J. Microencapsul.*, vol. 24, no. 7, pp. 634–646, Nov. 2007.
- [21] Z.-J. Dong, S.-Q. Xia, S. Hua, K. Hayat, X.-M. Zhang, and S.-Y. Xu, “Optimization of cross-linking parameters during production of transglutaminase-hardened spherical multinuclear microcapsules by complex coacervation,” *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 63, no. 1, p. 41–47, May 2008.
- [22] Z. Dong, Y. Ma, K. Hayat, C. Jia, S. Xia, and X. Zhang, *Morphology and release profile of microcapsules encapsulating peppermint oil by complex coacervation*, vol. 104. 2011.
- [23] Z.-Q. Zhang, C.-H. Pan, and D. Chung, “Tannic acid cross-linked gelatin–gum arabic coacervate microspheres for sustained release of allyl isothiocyanate: Characterization and in vitro release study,” *Food Res. Int.*, vol. 44, no. 4, pp. 1000–1007, 2011.
- [24] Y. Yeo, E. Bellas, W. Firestone, R. Langer, and D. S. Kohane, “Complex coacervates for thermally sensitive controlled release of flavor compounds,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 19, pp. 7518–7525, Sep. 2005.
- [25] S. Leclercq, C. Milo, and G. A. Reineccius, “Effects of cross-linking, capsule wall thickness, and compound hydrophobicity on aroma release from complex coacervate microcapsules,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 57, no. 4, pp. 1426–1432, Feb. 2009.
- [26] X. Z. Kong, X. Gu, X. Zhu, and Z. Zhang, “Spreadable dispersion of insect sex pheromone capsules, preparation via complex coacervation and release control of the encapsulated pheromone component molecule,” *Biomed. Microdevices*, vol. 11, no. 1, pp. 275–285, Feb. 2009.
- [27] X.-L. Gu, X. Zhu, X.-Z. Kong, and Y. Tan, “Comparisons of simple and complex coacervations for preparation of sprayable insect sex pheromone microcapsules and release control of the encapsulated pheromone molecule,” *J. Microencapsul.*, vol. 27, no. 4, pp. 355–364, 2010.
- [28] Y. T. Yu, L. N. Liu, X. L. Zhu, and X. Z. Kong, “Microencapsulation of dodecyl acetate by complex coacervation of whey protein with acacia gum and its release behavior,” *Chinese Chem. Lett.*, vol. 23, no. 7, pp. 847–850, 2012.
- [29] D. Wang and D. F. Chi, “Morphology and Release Profile of Microcapsules Encapsulated Alpha-Pinene by Complex Coacervation,” in *Progress in Materials and Processes*, 2013, vol. 602, pp. 1285–1288.

- [30] N. Devi and T. K. Maji, "Study of Complex Coacervation of Gelatin A with Sodium Carboxymethyl Cellulose: Microencapsulation of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) Seed Oil (NSO)," *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, vol. 60, no. 13, pp. 1091–1105, Dec. 2011.
- [31] N. Devi and T. K. Maji, "Genipin crosslinked microcapsules of gelatin a and κ -carrageenan polyelectrolyte complex for encapsulation of neem (*azadirachta indica* a.juss.) seed oil," *Polym. Bull.*, vol. 65, no. 4, pp. 347–362, 2010.
- [32] N. Devi and T. K. Maji, "Effect of Crosslinking Agent on Neem (*Azadirachta Indica* A. Juss.) Seed Oil (NSO) Encapsulated Microcapsules of κ -Carrageenan and Chitosan Polyelectrolyte Complex," *J. Macromol. Sci. Part A*, vol. 46, no. 11, pp. 1114–1121, Sep. 2009.
- [33] T. K. Maji and M. R. Hussain, "Microencapsulation of *Zanthoxylum limonella* oil (ZLO) in genipin crosslinked chitosan–gelatin complex for mosquito repellent application," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 111, no. 2, pp. 779–785, 2009.
- [34] Z. M. Yang *et al.*, "Preparation of Antibacterial Cotton Fabric Containing Patchouli Oil Microcapsules by Chemical Crosslinking Method," in *Advanced Polymer Science and Engineering*, 2011, vol. 221, pp. 308–315.
- [35] J. Liu, C. Liu, Y. Liu, M. Chen, Y. Hu, and Z. Yang, "Study on the grafting of chitosan-gelatin microcapsules onto cotton fabrics and its antibacterial effect.," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 109, pp. 103–108, Sep. 2013.
- [36] G. T. Han *et al.*, "Preparation and Properties Analysis of Slow-Release Microcapsules Containing Patchouli Oil," in *Biotechnology, Chemical and Materials Engineering II*, 2013, vol. 641, pp. 935–938.
- [37] Y. Hu, Z. Ming Yang, J. Yi Liu, J. Hua Cheng, and Z. Yang, "Preparation and Controlled Release Analysis of Patchouli Oil Complex Microcapsules," *Adv. Mater. Res.*, vol. 236–238, pp. 2669–2672, 2011.
- [38] M. M. M. Specos, G. Escobar, P. Marino, C. Puggia, M. V. D. Tesoriero, and L. Hermida, "Aroma Finishing of Cotton Fabrics by Means of Microencapsulation Techniques," *J. Ind. Text.*, vol. 40, no. 1, pp. 13–32, 2010.
- [39] M. M. M. Specos *et al.*, "Microencapsulated citronella oil for mosquito repellent finishing of cotton textiles.," *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 104, no. 10, pp. 653–658, Oct.

- 2010.
- [40] B. Ocak, “Complex coacervation of collagen hydrolysate extracted from leather solid wastes and chitosan for controlled release of lavender oil.,” *J. Environ. Manage.*, vol. 100, pp. 22–28, Jun. 2012.
- [41] G. Ru He, L. Li, W. Man, T. K. S. Wong, Z. Yang, and Q. Ling Jiang, *The Study of Cotton Finishing by Artemisia Argyi Oil Microcapsules*, vol. 654–656. 2010.
- [42] L. Li, L. Song, T. Hua, W. M. Au, and K. S. Wong, “Characteristics of weaving parameters in microcapsule fabrics and their influence on loading capability,” *Text. Res. J.*, vol. 83, no. 2, pp. 113–121, 2013.
- [43] A. S. Prata, M. H. A. Zanin, M. I. Re, and C. R. F. Grosso, “Release properties of chemical and enzymatic crosslinked gelatin-gum Arabic microparticles containing a fluorescent probe plus vetiver essential oil.,” *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 67, no. 2, pp. 171–178, Dec. 2008.
- [44] A. S. Prata, C. Menut, A. Leydet, J. R. Trigo, and C. R. F. Grosso, “Encapsulation and release of a fluorescent probe, khusimyl dansylate, obtained from vetiver oil by complex coacervation,” *Flavour Fragr. J.*, vol. 23, no. 1, pp. 7–15, 2008.
- [45] L.-F. Siow, “Effect of pH on Garlic Oil Encapsulation by Complex Coacervation,” *J. Food Process. Technol.*, vol. 04, no. 01, pp. 1–5, 2012.
- [46] Y. Lv, X. Zhang, S. Abbas, and E. Karangwa, “Simplified optimization for microcapsule preparation by complex coacervation based on the correlation between coacervates and the corresponding microcapsule,” *J. Food Eng.*, vol. 111, no. 2, pp. 225–233, 2012.
- [47] S. Leclercq, K. R. Harlander, and G. A. Reineccius, “Formation and characterization of microcapsules by complex coacervation with liquid or solid aroma cores,” *Flavour Fragr. J.*, vol. 24, no. 1, pp. 17–24.
- [48] C.-P. Chang, T.-K. Leung, S.-M. Lin, and C.-C. Hsu, “Release properties on gelatin-gum arabic microcapsules containing camphor oil with added polystyrene.,” *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 50, no. 2, pp. 136–140, Jul. 2006.
- [49] D. V Mendanha, S. E. M. Ortiz, C. S. Favaro-Trindade, A. Mauri, E. S. Monterrey-Quintero, and M. Thomazini, “Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin,” *Food Res. Int.*, vol. 42, no. 8, pp. 1099–1104, 2009.

- [50] M. Pozippe Nori, C. Favaro-Trindade, S. Alencar, M. Thomazini, J. Balieiro, and C. J. Contreras Castillo, *Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation*, vol. 44. 2011.
- [51] T. F. Tadros, *Emulsion Science and Technology*. 2009.
- [52] L. L. Schramm, *Surfactants: Fundamentals and Applications in the Petroleum Industry*. 2000.
- [53] J. W. Goodwin, *Colloids and Interfaces with Surfactants and Polymers – An Introduction*. 2004.
- [54] R. J. Farn, *Chemistry and Technology of Surfactants*, Ltd, Black. Ltd, Blackwell Publishing, 2006.
- [55] S. Santos, B. Medronho, T. Santos, and F. E. Antunes, *Drug Delivery Systems: Advanced Technologies Potentially Applicable in Personalised Treatment*, vol. 4. 2013.
- [56] W. C. Griffin, “Classification of Surface-Active Agents by ‘HLB,’” *J. Soc. Cosmet. Chem.*, vol. 1, pp. 311–326.
- [57] W. Pfeiffer, T. Henkel, E. Sackmann, W. Knoll, and D. Richter, “Local Dynamics of Lipid Bilayers Studied by Incoherent Quasi-Elastic Neutron Scattering,” *Europhys. Lett.*, vol. 8, no. 2, pp. 201–206, Jan. 1989.
- [58] K. Holmberg, J. Bo, and B. Kronberg, *SOLUTION AND POLYMERS IN AQUEOUS*. 2003.
- [59] T. F. Tadros, *Applied Surfactants - principles and applications*. 2005.
- [60] “Dye solubilization by a cationic polymer/ anionic surfactant system.,” *J Colloid Interface*, vol. 60, pp. 214–215, 1977.
- [61] P. S. Leung, E. D. Goddard, C. Han, and C. J. Glinka, “A study of polycation—anionic-surfactant systems,” *Colloids and Surfaces*, vol. 13, pp. 47–62, 1985.
- [62] P. S. Leung and E. D. Goddard, “Gels from dilute polymer/surfactant solutions,” *Langmuir*, vol. 7, no. 3, pp. 608–609, Mar. 1991.
- [63] B. H. Lee, S. D. Christian, E. E. Tucker, and J. F. Scamehorn, “Effects of an anionic polyelectrolyte on the solubilization of mono- and dichlorophenols by aqueous solutions of N-hexadecylpyridinium chloride,” *Langmuir*, vol. 7, no. 7, pp. 1332–1335, Jul. 1991.

- [64] B. Magny, I. Iliopoulos, R. Zana, and R. Audebert, "Mixed Micelles Formed by Cationic Surfactants and Anionic Hydrophobically Modified Polyelectrolytes," *Langmuir*, vol. 10, no. 9, pp. 3180–3187, Sep. 1994.
- [65] I. Iliopoulos, "Association between hydrophobic polyelectrolytes and surfactants," *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 3, no. 5, pp. 493–498, 1998.
- [66] E. D. Goddard and B. A. Pethica, "590. On detergent–protein interactions," *J. Chem. Soc.*, no. 0, pp. 2659–2663, 1951.
- [67] T. C. LAURENT and J. E. SCOTT, "MOLECULAR WEIGHT FRACTIONATION OF POLYANIONS BY CETYLPYRIDINIUM CHLORIDE IN SALT SOLUTIONS.," *Nature*, vol. 202, pp. 661–662, May 1964.
- [68] A. J. Dualeh and C. A. Steiner, "Hydrophobic microphase formation in surfactant solutions containing an amphiphilic graft copolymer," *Macromolecules*, vol. 23, no. 1, pp. 251–255, Jan. 1990.
- [69] F. Guillemet and L. Piculell, "Interactions in Aqueous Mixtures of Hydrophobically Modified Polyelectrolyte and Oppositely Charged Surfactant. Mixed Micelle Formation and Associative Phase Separation," *J. Phys. Chem.*, vol. 99, no. 22, pp. 9201–9209, Jun. 1995.
- [70] K. Thuresson, S. Nilsson, and B. Lindman, "Effect of Hydrophobic Modification on Phase Behavior and Rheology in Mixtures of Oppositely Charged Polyelectrolytes," *Langmuir*, vol. 12, no. 2, pp. 530–537, Jan. 1996.
- [71] K. Thuresson and B. Lindman, "Effect of Hydrophobic Modification of a Nonionic Cellulose Derivative on the Interaction with Surfactants. Phase Behavior and Association," *J. Phys. Chem. B*, vol. 101, no. 33, pp. 6460–6468, Aug. 1997.
- [72] M. Karlberg, K. Thuresson, L. Piculell, and B. Lindman, "Mixed solutions of hydrophobically modified graft and block copolymers," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 236, no. 1, pp. 159–164, 2004.
- [73] F. E. Antunes, E. F. Marques, M. G. Miguel, and B. Lindman, "Polymer-vesicle association.," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 147–148, pp. 18–35, 2009.
- [74] F. E. Antunes, B. Lindman, and M. G. Miguel, "Mixed systems of hydrophobically modified polyelectrolytes: controlling rheology by charge and hydrophobe stoichiometry

- and interaction strength,” *Langmuir*, vol. 21, no. 22, pp. 10188–10196, Oct. 2005.
- [75] K. Bergfeldt, L. Piculell, and P. Linse, “Segregation and Association in Mixed Polymer Solutions from Flory–Huggins Model Calculations,” *J. Phys. Chem.*, vol. 100, no. 9, pp. 3680–3687, Jan. 1996.
- [76] L. Piculell and B. Lindman, “Association and segregation in aqueous polymer/polymer, polymer/surfactant, and surfactant/surfactant mixtures: similarities and differences,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 41, pp. 149–178, 1992.
- [77] K. JCT, *Polymer-surfactant systems*. 1998.
- [78] R. J. Hefford, “Polymer mixing in aqueous solution,” *Polymer (Guildf)*, vol. 25, no. 7, pp. 979–984, 1984.
- [79] T. C. Dubin P, Bock J, Davis R, Schulz ND, *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*. 1994.
- [80] S. Shenkov and V. Y. Baranovsky, “Complex formation between poly(methacrylic acid) and poly(propylene glycol) in aqueous solutions,” *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 32, no. 7, pp. 1385–1387, 1994.
- [81] M. L. Cole and T. L. Whateley, “Interaction of Nonionic Block Copolymeric (Poloxamer) Surfactants with Poly (Acrylic Acid), Studied by Photon Correlation Spectroscopy,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 180, no. 2, pp. 421–427, 1996.
- [82] Y. Wang, E. J. Goethals, and F. E. Du Prez, “Association Behavior between End-Functionalized Block Copolymers PEO-PPO-PEO and Poly(acrylic acid),” *Macromol. Chem. Phys.*, vol. 205, no. 13, pp. 1774–1781, 2004.
- [83] D. Y. Chu and J. K. Thomas, “Effect of cationic surfactants on the conformation transition of poly(methacrylic acid),” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 108, no. 20, pp. 6270–6276, Oct. 1986.
- [84] P. Hansson and B. Lindman, “Surfactant-polymer interactions,” pp. 604–613, 1996.
- [85] S. E. Friberg, “Interactions of Surfactants with Polymers and Proteins. E.D.Goddard and K.P. Ananthapadmanabhan (eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, 1993, pp. 1-427, \$169.95,” *J. Dispers. Sci. Technol.*, vol. 15, no. 3, p. 399, 1994.
- [86] E. D. Goddard, “Polymer—surfactant interaction part II. Polymer and surfactant of opposite charge,” *Colloids and Surfaces*, vol. 19, no. 2, pp. 301–329, 1986.

- [87] K. Thalberg and B. Lindman, "Interaction between hyaluronan and cationic surfactants," *J. Phys. Chem.*, vol. 93, 1989.
- [88] K. Thalberg, B. Lindman, and K. Bergfeldt, "Phase behavior of systems of polyacrylate and cationic surfactants," *Langmuir*, vol. 7, no. 12, pp. 2893–2898, Dec. 1991.
- [89] R. Dias, S. Mel'nikov, B. Lindman, and M. G. Miguel, "DNA Phase Behavior in the Presence of Oppositely Charged Surfactants," *Langmuir*, vol. 16, no. 24, pp. 9577–9583, Nov. 2000.
- [90] I. Lynch, J. Sjöström, and L. Piculell, "Reswelling of Polyelectrolyte Hydrogels by Oppositely Charged Surfactants," *J. Phys. Chem. B*, vol. 109, no. 9, pp. 4258–4262, Mar. 2005.
- [91] W. J. Knox and T. O. Parshall, "The interaction of sodium dodecyl sulfate with gelatin," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 33, no. 1, pp. 16–23, 1970.
- [92] N. Nishikido, "Interaction between hydrophilic proteins and nonionic detergents studied by surface tension measurements," *Chem. Soc. Japan*, vol. 55, pp. 3085–3088, 1982.
- [93] J. . Gonzalez, "Cinética Enzimática." EHU.
- [94] H. Puel, F; Briancon. S; Fessi, "Industrial Technologies and Scale-Up," in *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications, Second Edition*, S. Benita, Ed. 2006, pp. 149–182.

CAPÍTULO 2:
Enfoque de la investigación

2. ENFOQUE DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. OBJETIVOS

Los objetivos de la presente tesis tienen como punto de partida el estado actual de la investigación en el campo de estudio. Conocer la influencia de los diferentes parámetros involucrados en la microencapsulación mediante coacervación compleja.

Los principales objetivos son:

- Adquirir los conocimientos necesarios acerca de la técnica de microencapsulación mediante coacervación compleja de aromas utilizando como material de pared gelatina y goma arábica. Desarrollar a partir de la información obtenida un protocolo de microencapsulación que servirá como inicio del estudio.
- Obtener microcápsulas de aromas con una morfología típica (aproximadamente esférica).
- Optimizar las microcápsulas reduciendo el diámetro, la distribución de tamaño y aumentando la cantidad de aroma encapsulado.
- Determinar la influencia de variables de proceso, tales como el tipo y la concentración de emulsionante, y la agitación.
- Obtener microcápsulas totalmente inocuas sustituyendo el reticulante tóxico (formaldehído o glutaraldehído) por la enzima transglutaminasa.
- Determinar la cinética de reticulación del proceso de microencapsulación en función del tipo de agente reticulante.

2.2. ESTRUCTURA EXPERIMENTAL Y JUSTIFICACION

La presente tesis se divide en cuatro partes bien diferenciadas, con el objetivo determinar la influencia de las diferentes variables de proceso y composición involucradas en la microencapsulación de aromas mediante coacervación compleja.

2.2.1. Estudio bibliográfico de la microencapsulación mediante coacervación compleja

- **Objetivo:** Adquirir los conocimientos necesarios acerca de la técnica de encapsulación mediante coacervación compleja. Conocimientos que serán el punto de partida de la presente tesis.

- **Descripción:** Búsqueda bibliográfica de artículos y publicaciones relacionadas con la microencapsulación de aromas mediante coacervación compleja utilizando como material de pared gelatina y goma arábiga. A partir de la información obtenida desarrollar un protocolo de microencapsulación que sirva como inicio del estudio.
- **Resultados esperados:** Disponer de un protocolo detallado dónde queden determinados los reactivos necesarios, los tiempos de adición y las condiciones de proceso.

2.2.2. Desarrollo de microcápsulas

- **Objetivo:** Obtener microcápsulas de aromas con una morfología típica (aproximadamente esférica).
- **Descripción:** A partir del protocolo de microencapsulación determinado en la primera parte de la tesis realizar una producción de microcápsulas, en función del resultado realizar diferentes ensayos variando los componentes y las condiciones de proceso hasta obtener microcápsulas con aceite en su interior y con una morfología aproximadamente esférica. Para la caracterización de las microcápsulas obtenidas, se analizan mediante microscopía óptica (MO) y microscopía electrónica de barrido (SEM: scanning electron microscope), técnicas que permiten evaluar la morfología de la microcápsula y si en su interior hay aceite encapsulado.
- **Resultados esperados:** Obtener un protocolo de encapsulación suficiente para producir microcápsulas que servirán como referencia para el estudio de esta tesis.

2.2.3. Rol de la concentración micelar crítica (cmc) de los tensioactivos y la agitación en el proceso de microencapsulación

- **Objetivo:** Optimizar las microcápsulas obtenidas en el capítulo anterior, reduciendo el diámetro, la distribución de tamaño, y aumentando la cantidad de aroma encapsulado a partir del estudio de la influencia de los tensioactivos y la agitación en el sistema de microencapsulación.
- **Descripción:** La estabilidad y distribución del tamaño de partícula de las emulsiones depende de las características de los tensioactivos. La concentración de este tensioactivo en la fase continua determina la capacidad de los diferentes polímeros para dirigirse a la interfase y formar la pared de la microcápsula. Esta concentración está estrechamente relacionada con la concentración micelar crítica (CMC) de cada tensioactivo determinada mediante tensión superficial. La interacción entre los grupos funcionales del polímero y el tensioactivo limitarán las propiedades finales de la pared y la eficiencia de encapsulado.

Además, la agitación tiene un rol importante en la microemulsión y, por tanto, en la formación de la microcápsula.

Se estudia el efecto de tres variables de la emulsión: el tipo de tensioactivo (tres tensioactivos diferentes: estireno anhídrido maleico (SMA), copolímero de óxido de etileno y óxido de propileno (Kolliphor®) y dodecil sulfato de sodio (SDS)), el efecto de la concentración en la emulsión habiendo determinado previamente su CMC mediante tensión superficial y, por último, la velocidad de agitación utilizada (300rpm, 600rpm, 900 rpm).

Las muestras obtenidas se analizan mediante TGA para conocer la eficiencia de microencapsulado y las posibles diferencias estructurales de la pared de la microcápsula, microscopía óptica y SEM para identificar diferencias morfológicas debidas a interacciones entre la gelatina y la goma con los diferentes tensioactivos o sus concentraciones y, por supuesto, a la energía introducida al sistema a través de la agitación.

- **Resultados esperados:** Optimizar las microcápsulas obtenidas en el apartado anterior de la tesis, además de conocer la influencia de los diferentes parámetros y fenómenos que intervienen en la etapa de emulsión.

2.2.4. Estudio de los mecanismos de reticulación en la obtención de microcápsulas gelatina-goma arábica

- **Objetivo:** Obtener microcápsulas totalmente inocuas sustituyendo el reticulante tóxico glutaraldehído o formaldehído por la enzima transglutaminasa. Además, obtener las ecuaciones que rigen el proceso de reticulación en función del agente reticulante.
- **Descripción:** Para el estudio de la cinética de reticulación en el proceso de microencapsulación de fragancias utilizando gelatina y goma arábica como materiales de pared, se pretende controlar la evolución en el tiempo de la concentración de reticulante en la fase continua para así obtener las ecuaciones que permitan realizar este estudio. El equipo seleccionado para la determinación de la concentración de agente reticulante en la fase acuosa es el espectrofotómetro UV-VIS, el cual permite realizar a partir de la absorbancia, una recta de calibrado con la que obtener la cantidad de agente reticulante a lo largo del tiempo. Se extraen 6 muestras de cada reactor en diferentes tiempos durante los primeros 90 minutos y una séptima muestra al día siguiente, abarcando de esta forma todo el tiempo de reacción.

El estudio de la cinética tiene en cuenta 3 reticulantes diferentes: glutaraldehído, formaldehído y la enzima transglutaminasa.

Se realizan ensayos para modificar el protocolo de producción de microcápsulas con el objetivo de poder utilizar la enzima transglutaminasa como agente reticulante en el proceso de microencapsulación. Se intenta determinar la cinética de reticulación de las microcápsulas en función del tipo de reticulante y de su concentración. Para el seguimiento de la disminución de la concentración de reticulante en la fase acuosa se utiliza un espectrofotómetro UV-VIS. Además, mediante la técnica de TGA se realiza un estudio de la cinética de reacción de esta enzima con la gelatina (material de pared).

- **Resultados esperados:** Obtener microcápsulas de características similares a la obtenidas con glutaraldehído o formaldehído, pero utilizando para ello reactivos inocuos. Además, se espera determinar las ecuaciones que rigen el proceso de reticulación para cada uno de los agentes reticulantes estudiados.

2.3. MATERIALES

La siguiente tabla muestra los diferentes productos químicos utilizados para la realización de la presente tesis:

Producto	Proveedor	Tipo o Grado	Uso específico
Gelatina	Sigma-Aldrich	Tipo A	Material de pared
Goma Arábica	Sigma-Aldrich	Acacia tree	Material de pared
Kolliphor®	Sigma-Aldrich	Poloxamer 188	Tensioactivo
SDS	Panreac	-	Tensioactivo
SMA	Sigma-Aldrich	Mw 65000	Tensioactivo
Glutaraldehído	Panreac	50%	Agente reticulante
Formaldehído	Panreac	37%	Agente reticulante
Transglutaminasa	BDF ingredients	TXo	Agente para la reticulación
Aroma de limón	Dallant	18L3	Aceite a encapsular

Tabla 5. Listado de los materiales utilizados en la presente tesis.

2.4. CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE MICROENCAPSULACIÓN

El proceso de producción de microcápsulas mediante coacervación compleja se ha analizado y caracterizado mediante diferentes técnicas en función del parámetro a determinar. A continuación, se hace una breve descripción de las técnicas y su uso específico en la presente tesis.

2.4.1. Microcopía óptica

La microcopía óptica resulta un método rápido y eficaz para determinar la morfología de las microcápsulas. Además, debido a las opciones ópticas y de luminosidad que presenta, permite

determinar si, en el caso de la presente tesis, estas microcápsulas formadas contienen aceite en su interior.

La fácil y rápida preparación de la muestra a visualizar hace que, en la presente tesis, este equipo se haya utilizado para determinar el tamaño y la estabilidad relativa de las microgotas formadas en la microemulsión, su evolución durante el proceso de encapsulación y la morfología final de las microcápsulas, además de poder visualizar si queda aceite libre al final del proceso.



Figura 22. Microscopio óptico (OLYMPUS BX43F).

2.4.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El microscopio de barrido de electrones es la mejor técnica, actualmente, para estudiar la morfología y la forma de las microcápsulas.

Permite generar imágenes de una superficie, con una alta resolución y un aspecto tridimensional, consiguiendo resoluciones de hasta un nanómetro, aspecto que facilita el estudio de la topografía de la muestra, determinando las características de la superficie, el tamaño y la distribución de las microcápsulas.

A diferencia del microscopio óptico que utiliza haces de luz, la imagen proporcionada por el SEM se genera por la interacción de un haz de electrones que recorre la superficie de la muestra y de detectores que transforman las señales en corrientes eléctricas que se utilizan para formar la imagen mostrada mediante un monitor.

Las muestras se pueden observar en un ambiente de vacío alto, bajo y en SEMS ambientales en condiciones húmedas. Las muestras se tienen que preparar previamente, ya que la mayoría de SEMS requieren que sean conductoras. Generalmente el recubrimiento se realiza mediante una capa de metal, en este caso oro.



Figura 23. Microscopio electrónico de barrido (Phenom Standard) y equipo de recubrimiento (SC7620, Quorum technologies).

2.4.3. Termogravimetría

El análisis termogravimétrico (TGA) teniendo como componentes principales una microbalanza y un horno, permite determinar los cambios de peso de una muestra en función del tiempo y de la temperatura. El equipo permite realizar análisis a temperatura constante (régimen isotérmico) o con rampas de temperatura (régimen dinámico).

El equipo utilizado es un Mettler Toledo TGA/SDTA851e y ha permitido determinar de forma relativa la eficiencia de encapsulación, la cinética de reticulación y la temperatura liberación del aroma desde el interior de la microcápsula.

Para ello se realiza un pretratamiento de las muestras secándolas a 50°C durante 4 horas para eliminar el agua que contienen. El ensayo se lleva a cabo de temperatura ambiente a 800°C con una rampa de 10°C /min.



Figura 24. Termogravímetro (TGA/SDTA851e, Mettler Toledo).

Las especificaciones del equipo se resumen en la siguiente Tabla:

TGA	
Temperatura máxima	1600°C
Precisión	± 0,25°C
Peso máximo balanza	5 g
Resolución balanza	± 1 µg
Material horno	Alúmina
Refrigeración	Agua

Tabla 6. Especificaciones TGA.

2.4.4. Espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-VIS)

El espectrofotómetro UV-Vis mide la intensidad de luz que pasa a través de una muestra (I), y la compara con la intensidad de luz antes de pasar a través de la muestra (I_o). La relación I / I_o se llama transmitancia, y se expresa habitualmente como un porcentaje (%T). La absorbancia (A) se basa en la transmisión:

$$A = -\log(\%T) \quad \text{Ecuación 11}$$

El espectrofotómetro se ha utilizado de forma cuantitativa para determinar las concentraciones de formaldehído, glutaraldehído y transglutaminasa en solución usando la Ley de Beer-Lambert.

En la espectrofotometría se aprovecha la absorción de radiación electromagnética en la zona del ultravioleta y visible del espectro. La muestra absorbe parte de la radiación incidente en este espectro y promueve la transición del analito hacia un estado excitado, transmitiendo un haz de menor energía radiante. En esta técnica se mide la cantidad de luz absorbida como función de la longitud de onda utilizada. La absorción de las radiaciones ultravioletas, visibles e infrarrojas depende de la estructura de las moléculas, y es característica de cada sustancia química.

La espectrofotometría ultravioleta-visible utiliza haces de radiación del espectro electromagnético, en el rango UV de 180 a 380 nm, y en el de la luz visible de 380 a 780 nm.

Mediante esta técnica, en la presente tesis, se ha podido determinar la cinética de reticulación de las microcápsulas para tres tipos de agentes reticulantes a diferentes concentraciones.



Figura 25. Espectrofotómetro UV-Visible (Shimadzu, UV-2401 PC).

2.4.5. Tensión superficial

La evolución de la tensión superficial en función de la concentración de tensioactivo, permite determinar la concentración crítica micelar de este. En la presente tesis esta tensión superficial será determinada mediante un equipo Krüss modelo DSA100.



Figura 26. Analizador de forma de gota (Krüss, DSA100).

Para la determinación de la tensión superficial se ha utilizado un tensiómetro óptico, la tensión superficial del agua a 25°C y 1 atm es de 72,8 mN/m. Se preparan diversas disoluciones compuestas por diferentes cantidades del tensioactivo a analizar y agua destilada, y se mide la tensión superficial de cada una mediante el ángulo de contacto de la gota con una superficie plana. A medida que la cantidad de tensioactivo en la disolución aumenta, el ángulo de contacto de la gota a partir del cual el software del equipo determina la tensión superficial irá disminuyendo. Una vez recopilados los datos de tensión superficial proporcionados por el software del equipo,

estos se representan en forma de gráfico apreciando dos pendientes cuyo punto de inflexión determina la CMC.

CAPÍTULO 3:

Estudio bibliográfico de la microencapsulación mediante
coacervación compleja

3. ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO DE LA MICROENCAPSULACIÓN MEDIANTE COACERVACIÓN COMPLEJA

3.1. INTRODUCCIÓN

Con el objetivo de diseñar un protocolo de fabricación de microcápsulas con aroma de limón como material de núcleo, se ha realizado una extensa búsqueda bibliográfica sobre este proceso de encapsulación, teniendo en cuenta diferentes autores y diferentes aplicaciones finales.

3.2. REFERENCIAS UTILIZADAS COMO BASE DEL DISEÑO

En la tabla siguiente se muestra el material revisado para el diseño del protocolo que será punto de partida de esta tesis:

Núcleo	Pared	Reticulante	Eficien. (%)	Diámetro (µm)	Aplicación	Ref
Aceite de naranja, aroma de limón	Proteína de suero - GA	Glutaraldehído o sin reticulante	80-90	5-1000	Queso Gouda	[17]
Aceite dulce de naranja	SPI-GA	Sin reticulante	80	8	Conservación de alimentos	[18]
Oleoresina de cúrcuma	GE-GA	Sin reticulante	49-73	45*	Ingrediente de comida	[19]
Aceite de Menta	GE-GA	Formaldehído o transglutaminasa	90	50	Ingrediente de comida	[20] [21] [22]
Isocianato de alilo	GE-GA	Ácido tánico	84	117	Comida	[23]
Saborizante	GE-GA	Sin reticulante	NR	67-92	Comida	[24]
Triglicérido de cadena media	GE-GA	Glutaraldehído	NR	9-50	Comida horneada	[25]
Dodecanol	GE-GA	Formaldehído o glutaraldehído	16-96	1-2	Control de plagas de insectos	[26] [27]

Dodecil acetato	Proteína de suero - GA	Sin reticulante	41-86	5*	Control de plagas de insectos	[28]
α -Pino	CS-GA	Glutaraldehído	52	5	Control de plagas de insectos	[29]
Aceite de semilla de Neem	GE-CMC	Glutaraldehído	72-97	10*-100	Control de plagas	[30]
Aceite de Zanthoxy-lum	GE-CS	Genipina	30-60	3*	Repelente de mosquitos	[33]
Aceite de Pachuli	GE-GA	Glutaraldehído	NR	5-10	Tejidos de algodón	[34]
	GE-CS		51	13-18		[35]
	CS-GA		67	10*	Tratamiento médico	[36]
Aceite de limón	GE-GA	Glutaraldehído o formaldehído	NR	28-76	Tejidos funcionales	[38]
Aceite de Citronela	GE-GA	Glutaraldehído	NR	25-100	Tejidos de algodón	[39]
Aceite de <i>Artemisia argyi</i>	GE-GA	Formaldehído	NR	10-25	Tejidos de algodón	[41]
Aceite de Moxa	GE-GA	Glutaraldehído	NR	1-10	Tejidos de algodón	[42]
Aceite de Vertiver	GE-GA	Glutaraldehído o transglutaminasa	NR	20-60	Liberación controlada	[43]
					[44]	
Aceite de Ajo	GE-GA	Formaldehído	63-99	90-120	Liberación controlada	[45]
Aceite de Jazmín	GE-GA, GE-CMC	Transglutaminasa	76-81	1-50	NR	[46]
Limoneno	GE-GA	Glutaraldehído	70-86	219-325	NR	[47]
Aceite de Alcanfor	GE-GA	Glutaraldehído	99	86-295	Tratamiento médico	[48]

*Los valores han sido estimados a partir de las imágenes de SEM presentes en las publicaciones.
NR: Esta información no aparece en la publicación; GE: Gelatina; GA: Goma Arábiga; CMC: Carboximetilcelulosa; CS: Chitosan; SPI: Proteína de soja aislada.

Tabla 7. Bibliografía analizada para el diseño del protocolo de microencapsulación que se utilizará como punto de partida.

3.3. HIPÓTESIS DE PARTIDA

Analizando las diferentes metodologías de microencapsulación descritas en las diferentes referencias indicadas en la Tabla 7 se seleccionaron los mecanismos que podrían explicar mejor el fenómeno de la coacervación compleja y los factores que podrían influir en la correcta formación y en la eficiencia de este tipo de microcápsulas. A partir de este análisis se desarrollaron las siguientes hipótesis a partir de las cuales elaborar el protocolo de fabricación de microcápsulas que servirá como punto de partida de este estudio y que se optimizará en el capítulo siguiente de la presente tesis.

- 1) Inicialmente es necesario preparar una disolución de los dos polímeros: gelatina (proteína) y goma arábiga (polisacárido). Para ello será necesario aumentar la temperatura del agua por encima del punto de gelación de la gelatina, tener un pH por encima del punto isoeléctrico de la gelatina para evitar la interacción con la goma durante el proceso de disolución y utilizar concentraciones de los dos polímeros por debajo de su límite de saturación.
- 2) El segundo paso será reducir el pH de la disolución de polímeros por debajo del punto isoeléctrico de la gelatina para esta quede cargada positivamente e interactúe con la goma formando coacervados. El carácter anfifílico de la gelatina y la goma podría hacer que al interactuar formen micelas combinadas [1.3.4. Mezclas polímero-polímero y polímero-tensioactivo; 1.3.5. Interacciones proteína-tensioactivo] con centros hidrófobos donde se sentirán atraídas las gotas de aceite una vez entren en el sistema.
- 3) La adición del aceite lentamente hará que este se pueda ir ubicando parcialmente en los complejos Gelatina-Goma ayudado por la agitación del sistema.
- 4) Un descenso controlado de la temperatura del sistema por debajo del punto de gelación del polímero, formará la pared de las microcápsulas.
- 5) Finalmente, un nuevo incremento del pH del sistema hará que la gelatina que no haya interactuado con la goma quede cargada positivamente permitiendo la reticulación mediante un agente reticulante aniónico.

3.4. DEFINICIÓN DEL PROTOCOLO DE PARTIDA

Teniendo en cuenta y analizando las referencias mostradas en la Tabla 7 se determinó el siguiente protocolo de microencapsulación:

Se prepara una disolución de Gelatina (3,5 g) y Goma Arábica (1,5 g) en 200 ml de agua utilizando un ULTRATURRAX (IKA) a una agitación de 10000 rpm durante 10 min y a una temperatura de 45°C (Disolución A).

La Disolución A se vierte en un reactor termostatzado mediante un baño a una temperatura de 45°C. El contenido del reactor se mantendrá agitado mediante un agitador Heildolph equipado con una pala de tipo hélice a una velocidad de 300 rpm.

A la Disolución A se le añade, gota a gota, una disolución de HCl al 37% hasta alcanzar un pH de 4,0-4,5.

Una vez alcanzado el pH, se añaden, gota a gota durante 30 min, 5 g de fragancia manteniendo una temperatura de 45°C y variando la agitación a 350 rpm. Se mantiene esta agitación proporcionada por el agitador Heildolph durante 15 min más.

Pasados los 15min se reduce la temperatura en el reactor a 33°C, aumentando la agitación a 600 rpm. Al alcanzar la temperatura de 33°C, se adicionan 100 ml de agua al reactor y se continúa disminuyendo la temperatura hasta 25°C, temperatura a la que se mantiene el sistema durante 2 horas.

Posteriormente se vuelve a reducir la temperatura hasta alcanzar los 12°C y se mantiene durante 90 min más a 600 rpm. Una vez finalizado este tiempo el pH se incrementa hasta 9 añadiendo, gota a gota, una disolución de NaOH 0,5 M. Una vez alcanzado este valor de pH, se calienta la disolución existente en el reactor hasta 25°C y mantiene durante 18 h a una agitación de 700 rpm.

Finalmente, el sistema se neutraliza añadiendo, gota a gota, la disolución de HCl al 37% hasta alcanzar un pH de 7,0-7,5.

3.5. BIBLIOGRAFÍA

- [17] F. Weinbreck, M. Minor, and C. G. de Kruijff, "Microencapsulation of oils using whey protein/gum arabic coacervates," *J. Microencapsul.*, vol. 21, no. 6, pp. 667–679, Sep. 2004.
- [18] X. Jun-xia, Y. Hai-yan, and Y. Jian, "Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic," *Food Chem.*, vol. 125, no. 4, pp.

1267–1272, 2011.

- [19] L. A. C. Zuanon, C. R. Malacrida, and V. R. N. Telis, “Production of Turmeric Oleoresin Microcapsules by Complex Coacervation with Gelatin–Gum Arabic,” *J. Food Process Eng.*, vol. 36, no. 3, pp. 364–373, 2010.
- [20] Z. J. Dong, A. Toure, C. S. Jia, X. M. Zhang, and S. Y. Xu, “Effect of processing parameters on the formation of spherical multinuclear microcapsules encapsulating peppermint oil by coacervation,” *J. Microencapsul.*, vol. 24, no. 7, pp. 634–646, Nov. 2007.
- [21] Z.-J. Dong, S.-Q. Xia, S. Hua, K. Hayat, X.-M. Zhang, and S.-Y. Xu, “Optimization of cross-linking parameters during production of transglutaminase-hardened spherical multinuclear microcapsules by complex coacervation,” *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 63, no. 1, p. 41–47, May 2008.
- [22] Z. Dong, Y. Ma, K. Hayat, C. Jia, S. Xia, and X. Zhang, *Morphology and release profile of microcapsules encapsulating peppermint oil by complex coacervation*, vol. 104. 2011.
- [23] Z.-Q. Zhang, C.-H. Pan, and D. Chung, “Tannic acid cross-linked gelatin–gum arabic coacervate microspheres for sustained release of allyl isothiocyanate: Characterization and in vitro release study,” *Food Res. Int.*, vol. 44, no. 4, pp. 1000–1007, 2011.
- [24] Y. Yeo, E. Bellas, W. Firestone, R. Langer, and D. S. Kohane, “Complex coacervates for thermally sensitive controlled release of flavor compounds,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 19, pp. 7518–7525, Sep. 2005.
- [25] S. Leclercq, C. Milo, and G. A. Reineccius, “Effects of cross-linking, capsule wall thickness, and compound hydrophobicity on aroma release from complex coacervate microcapsules,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 57, no. 4, pp. 1426–1432, Feb. 2009.
- [26] X. Z. Kong, X. Gu, X. Zhu, and Z. Zhang, “Spreadable dispersion of insect sex pheromone capsules, preparation via complex coacervation and release control of the encapsulated pheromone component molecule,” *Biomed. Microdevices*, vol. 11, no. 1, pp. 275–285, Feb. 2009.
- [27] X.-L. Gu, X. Zhu, X.-Z. Kong, and Y. Tan, “Comparisons of simple and complex coacervations for preparation of sprayable insect sex pheromone microcapsules and release control of the encapsulated pheromone molecule,” *J. Microencapsul.*, vol. 27, no. 4, pp. 355–364, 2010.

- [28] Y. T. Yu, L. N. Liu, X. L. Zhu, and X. Z. Kong, "Microencapsulation of dodecyl acetate by complex coacervation of whey protein with acacia gum and its release behavior," *Chinese Chem. Lett.*, vol. 23, no. 7, pp. 847–850, 2012.
- [29] D. Wang and D. F. Chi, "Morphology and Release Profile of Microcapsules Encapsulated Alpha-Pinene by Complex Coacervation," in *Progress in Materials and Processes*, 2013, vol. 602, pp. 1285–1288.
- [30] N. Devi and T. K. Maji, "Study of Complex Coacervation of Gelatin A with Sodium Carboxymethyl Cellulose: Microencapsulation of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) Seed Oil (NSO)," *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, vol. 60, no. 13, pp. 1091–1105, Dec. 2011.
- [33] T. K. Maji and M. R. Hussain, "Microencapsulation of *Zanthoxylum limonella* oil (ZLO) in genipin crosslinked chitosan–gelatin complex for mosquito repellent application," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 111, no. 2, pp. 779–785, 2009.
- [34] Z. M. Yang *et al.*, "Preparation of Antibacterial Cotton Fabric Containing Patchouli Oil Microcapsules by Chemical Crosslinking Method," in *Advanced Polymer Science and Engineering*, 2011, vol. 221, pp. 308–315.
- [35] J. Liu, C. Liu, Y. Liu, M. Chen, Y. Hu, and Z. Yang, "Study on the grafting of chitosan-gelatin microcapsules onto cotton fabrics and its antibacterial effect.," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 109, pp. 103–108, Sep. 2013.
- [36] G. T. Han *et al.*, "Preparation and Properties Analysis of Slow-Release Microcapsules Containing Patchouli Oil," in *Biotechnology, Chemical and Materials Engineering II*, 2013, vol. 641, pp. 935–938.
- [37] Y. Hu, Z. Ming Yang, J. Yi Liu, J. Hua Cheng, and Z. Yang, "Preparation and Controlled Release Analysis of Patchouli Oil Complex Microcapsules," *Adv. Mater. Res.*, vol. 236–238, pp. 2669–2672, 2011.
- [38] M. M. M. Specos, G. Escobar, P. Marino, C. Puggia, M. V. D. Tesoriero, and L. Hermida, "Aroma Finishing of Cotton Fabrics by Means of Microencapsulation Techniques," *J. Ind. Text.*, vol. 40, no. 1, pp. 13–32, 2010.
- [39] M. M. M. Specos *et al.*, "Microencapsulated citronella oil for mosquito repellent finishing of cotton textiles.," *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 104, no. 10, pp. 653–658, Oct. 2010.

- [41] G. Ru He, L. Li, W. Man, T. K. S. Wong, Z. Yang, and Q. Ling Jiang, *The Study of Cotton Finishing by Artemisia Argyi Oil Microcapsules*, vol. 654–656. 2010.
- [42] L. Li, L. Song, T. Hua, W. M. Au, and K. S. Wong, “Characteristics of weaving parameters in microcapsule fabrics and their influence on loading capability,” *Text. Res. J.*, vol. 83, no. 2, pp. 113–121, 2013.
- [43] A. S. Prata, M. H. A. Zanin, M. I. Re, and C. R. F. Grosso, “Release properties of chemical and enzymatic crosslinked gelatin-gum Arabic microparticles containing a fluorescent probe plus vetiver essential oil,” *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 67, no. 2, pp. 171–178, Dec. 2008.
- [44] A. S. Prata, C. Menut, A. Leydet, J. R. Trigo, and C. R. F. Grosso, “Encapsulation and release of a fluorescent probe, khusimyl dansylate, obtained from vetiver oil by complex coacervation,” *Flavour Fragr. J.*, vol. 23, no. 1, pp. 7–15, 2008.
- [45] L.-F. Siow, “Effect of pH on Garlic Oil Encapsulation by Complex Coacervation,” *J. Food Process. Technol.*, vol. 04, no. 01, pp. 1–5, 2012.
- [46] Y. Lv, X. Zhang, S. Abbas, and E. Karangwa, “Simplified optimization for microcapsule preparation by complex coacervation based on the correlation between coacervates and the corresponding microcapsule,” *J. Food Eng.*, vol. 111, no. 2, pp. 225–233, 2012.
- [47] S. Leclercq, K. R. Harlander, and G. A. Reineccius, “Formation and characterization of microcapsules by complex coacervation with liquid or solid aroma cores,” *Flavour Fragr. J.*, vol. 24, no. 1, pp. 17–24.
- [48] C.-P. Chang, T.-K. Leung, S.-M. Lin, and C.-C. Hsu, “Release properties on gelatin-gum arabic microcapsules containing camphor oil with added polystyrene,” *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 50, no. 2, pp. 136–140, Jul. 2006.

CAPÍTULO 4:
Desarrollo de microcápsulas

4. DESARROLLO DE MICROCÁPSULAS

4.1. INTRODUCCIÓN

A partir del protocolo de microencapsulación determinado en [3. ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO DE LA MICROENCAPSULACIÓN MEDIANTE COACERVACIÓN COMPLEJA] se realizará una producción de microcápsulas. El resultado obtenido se optimizará variando los componentes y las condiciones de proceso hasta obtener microcápsulas con aceite en su interior y con una morfología aproximadamente esférica. Partiendo de las referencias indicadas en la Tabla 7 se seleccionaron las siguientes variables de estudio para determinar su influencia en el proceso de microencapsulación y optimizarlo: relación entre la gelatina y la goma arábiga, tipo de reticulante, concentración de componentes, concentración del reticulante seleccionado y orden de adición de los reactivos. Para la caracterización de las microcápsulas obtenidas en cada ensayo, estas se analizarán mediante un microscopio óptico (MO) y un microscopio electrónico de barrido (SEM *Scanning Electron Microscope*), técnicas que permiten evaluar la morfología de las microcápsulas y conocer si en su interior hay aceite contenido.

Se espera obtener un protocolo de encapsulación suficiente para producir microcápsulas que servirán como referencia para el estudio de esta tesis.

4.2. ESTUDIO DE LAS DIFERENTES VARIABLES

4.2.1. Influencia de la relación gelatina:goma arábiga (G:GA)

El primer método para la producción de microcápsulas [3.4. DEFINICIÓN DEL PROTOCOLO DE PARTIDA] como se explica en el apartado [3.3. HIPÓTESIS DE PARTIDA] se basa en la idea de que una vez la gelatina y la goma están en el medio, estas interactúan formando micelas hacia donde se sentirán atraídas las gotas de fragancia una vez entren en el sistema. Al protocolo mencionado, en este primer estudio no se ha añadido reticulante con lo que después del proceso de gelación se ha procedido a neutralizar la disolución sin reticular.

Para ello se proponen 3 ensayos con 3 relaciones:

- Ensayo 1: G:GA 2,3:1
- Ensayo 2: G:GA 1,75:1
- Ensayo 3: G:GA 1:1

4.2.1.1. Diseño de ensayos

Ensayo	1	2	3
Gelatina (g)	3,5	3,5	3,5
Goma (g)	1,5	2,0	3,5
H ₂ O (ml)	350	350	350
Aroma (ml)	5	5	5
Formaldehído (ml)	--	--	--
Glutaraldehído (ml)	--	--	--

Tabla 8. Diseño de ensayos para el estudio de la relación G:GA.

4.2.1.2. Resultados

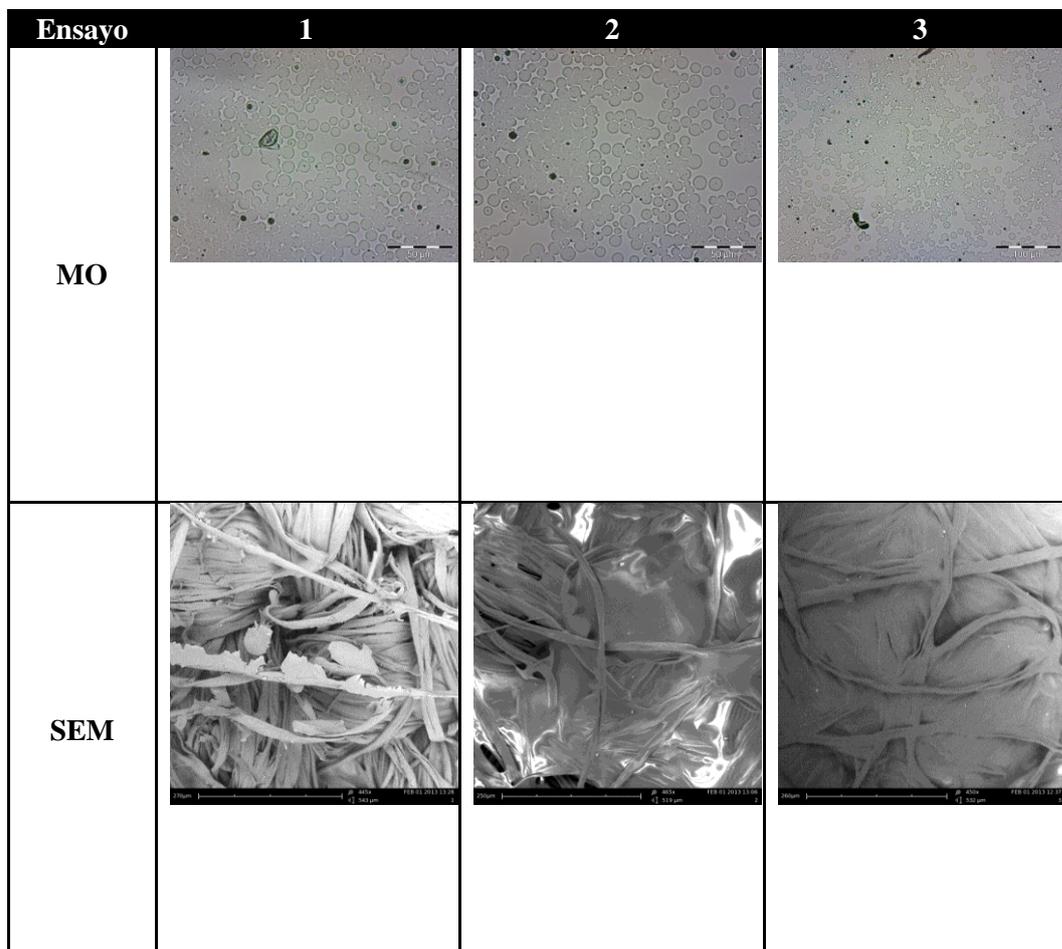


Tabla 9. Estudio de la relación Gelatina:Goma mediante MO y SEM.

4.2.1.3. Discusión

Las imágenes obtenidas mediante SEM y microscopía óptica reflejan que con la metodología utilizada no se pueden observar microcápsulas al final del proceso. La fragancia queda totalmente libre, aunque emulsionada una vez finalizada la fabricación. Esto podría ser por dos factores, el primero de ellos es que el protocolo de microencapsulación utilizado no permite formar

microcápsulas independientemente del ratio G:GA utilizado, ya que en ninguno de los ensayos se observan microcápsulas. Otro factor que se podría producir es que al aumentar el pH del contenido del reactor al final del proceso para neutralizarlo, se supera el punto isoeléctrico de la gelatina quedando ésta cargada de forma negativa, misma carga que presenta la goma y provocando, por tanto, una repulsión entre los dos polímeros conduciendo a la rotura de la estructura de la microcápsula quedando el aceite liberado en el sistema. Con el objetivo de evaluar esta segunda opción se diseñan los ensayos del siguiente apartado.

4.2.2. Influencia del reticulante

La reticulación final de la estructura G-GA debería evitar que la fragancia, una vez atrapada, salga con facilidad de la estructura. Los reticulantes utilizados en este caso serán el formaldehído y el glutaraldehído, suponiendo que el grado de reticulación es mayor en el caso del glutaraldehído puesto que en su estructura posee dos grupos aldehídos, mientras que el formaldehído solo uno.

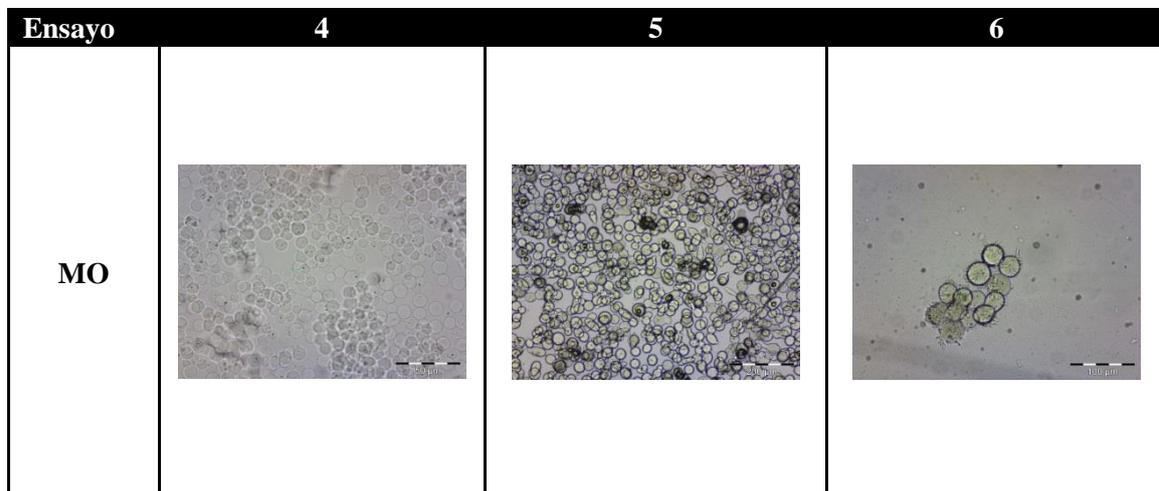
Para comprobar esta hipótesis se repiten los ensayos del apartado [4.2.1. Influencia de la relación gelatina:goma arábica (G:GA)] añadiendo en cada caso la misma cantidad de reticulante.

4.2.2.1. Diseño de ensayos

Ensayo	4	5	6	7	8	9
Gelatina (g)	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Goma (g)	1,5	2,0	3,5	1,5	2,0	3,5
H ₂ O (ml)	350	350	350	350	350	350
Aroma (ml)	5	5	5	5	5	5
Formaldehído (ml)	12	12	12	--	--	--
Glutaraldehído (ml)	--	--	--	12	12	12

Tabla 10. Diseño de ensayos para el estudio de la influencia de reticulante.

4.2.2.2. Resultados



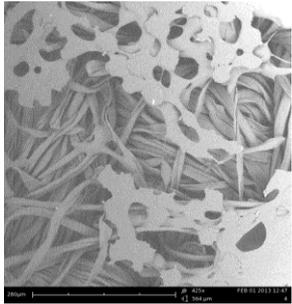
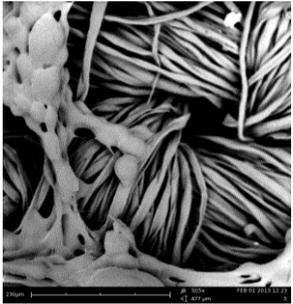
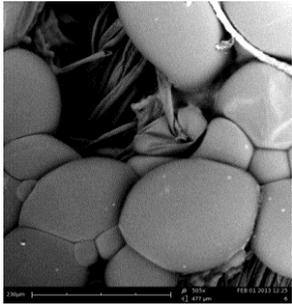
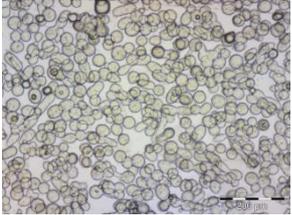
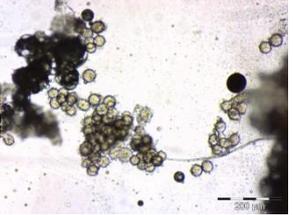
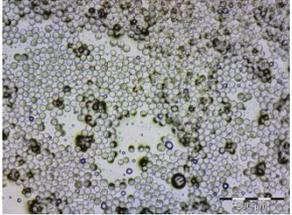
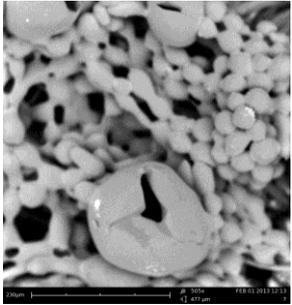
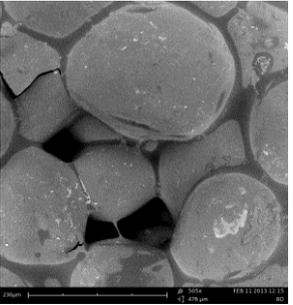
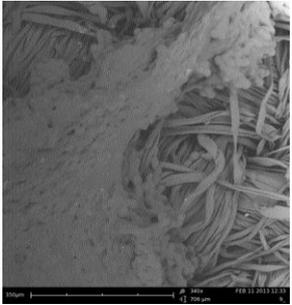
SEM			
Ensayo	7	8	9
MO			
SEM			

Tabla 11. Estudio de la influencia del reticulante mediante MO y SEM.

4.2.2.3. Discusión

La incorporación de reticulante en el sistema permite la microencapsulación del aroma. Comparando las imágenes mostradas en la Tabla 11 se puede apreciar que el ensayo 9 presenta una estrecha distribución de tamaño, el tamaño de partícula más reducido y una morfología uniforme y esférica. Este lote es el producido con una relación G:GA de 1:1 utilizando

glutaraldehído como reticulante, por ello, en el siguiente estudio, influencia de la concentración en el medio, se usará esta relación entre G:GA y glutaraldehído como reticulante.

4.2.3. Influencia de la concentración en el medio

Una vez determinada la relación G:GA que optimiza el proceso de encapsulación y el reticulante, se pretende encontrar la concentración máxima de polímero y fragancia en el medio que permita obtener resultados similares, en cuanto a morfología, mejorando así la eficiencia del proceso.

Para ello se producen cuatro lotes teniendo en cuenta que en el apartado [4.2.2 Influencia del reticulante] se utiliza una concentración de polímero del 2% ((3,5 g gelatina + 3,5 g goma) / 350 ml agua) y de aroma del 1,4% en agua.

4.2.3.1. Diseño de ensayos

Ensayo	10	11	13	14
Gelatina (g)	16,5	12,0	6,0	10,0
Goma (g)	16,5	12,0	6,0	10,0
H ₂ O (ml)	280	280	350	350
Aroma (ml)	27	50	10	20
Formaldehído (ml)	--	--	--	--
Glutaraldehído (ml)	--	--	20	25

Tabla 12. Diseño de ensayos para el estudio de la influencia de la concentración en el medio.

4.2.3.2. Resultados

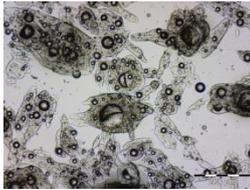
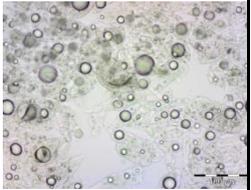
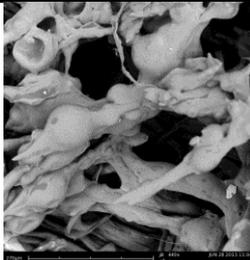
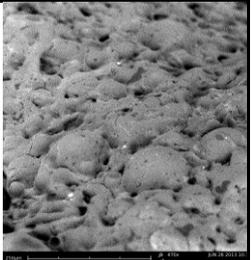
Ensayo	10	11	13	14
MO	--	--		
SEM	--	--		

Tabla 13. Estudio de la influencia de la concentración en el medio mediante MO y SEM.

4.2.3.3. Discusión

No se pudieron obtener imágenes de los ensayos 10 y 11 puesto que los lotes gelificaron durante el proceso. Para estos ensayos se utilizaron las concentraciones más altas de polímero en agua 11,8% ((16,5 g gelatina + 16,5 g goma) / 280 ml agua) y 8,6% lo que indica que con el método de encapsulación seguido no se pueden utilizar concentraciones tan altas.

Por otro lado, los ensayos 13 y 14 con concentraciones de polímero 3,4% y 5,7% respectivamente, sí han permitido la encapsulación, aunque como se ve en las imágenes de la Tabla 13, no se forman microcápsulas morfológicamente esféricas y bien definidas, sino aglomerados o masas de polímero que en su interior contienen gotas de aroma. Además, algunas gotas de fragancia aparecen dispersas en el medio.

4.2.4. Influencia de la concentración de glutaraldehído

El ensayo 14 permitió encontrar la concentración máxima de polímero a la que el sistema no colapsa y ni gelifica. Con el objetivo de mejorar la eficiencia del proceso en este apartado se intentará modificar algunos parámetros para mejorar la morfología conseguida.

Para la selección de estos parámetros se parte de diferentes hipótesis. Se cree que el ácido utilizado para lograr que la gelatina se encuentre por debajo de su punto isoeléctrico puede tener influencia en el sistema, por ello, en el ensayo 15 se cambiará el ácido clorhídrico por ácido acético manteniendo el mismo pH.

Por otro lado, en el ensayo 16 se pretende evaluar la cantidad de glutaraldehído utilizada, ya que este podría provocar que el proceso colapsara formando una especie de gel debido al entrecruzamiento de las cadenas de polímero de diferentes microcápsulas por estar presente el glutaraldehído en el sistema a una concentración muy elevada.

Por último, en el ensayo 17 se repetirá el ensayo 14 para comprobar la reproducibilidad de este.

4.2.4.1. Diseño de ensayos

Ensayo	15	16	17
Gelatina (g)	10,0	10,0	10,0
Goma (g)	10,0	10,0	10,0
H ₂ O (ml)	350	350	350
Aroma (ml)	20	20	20
Formaldehído (ml)	--	--	--
Glutaraldehído (ml)	25	3	25

Tabla 14. Diseño de ensayos para el estudio de la influencia de la concentración de glutaraldehído.

4.2.4.2. Resultados

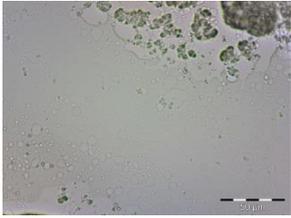
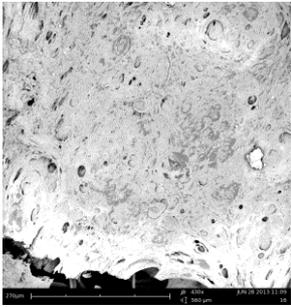
Ensayo	15	16	17
MO	--		--
SEM	--		--

Tabla 15. Estudio de la influencia de la concentración de glutaraldehído mediante MO y SEM.

4.2.4.3. Discusión

No se han podido reproducir los resultados obtenidos en el ensayo 14 aun repitiendo las mismas condiciones de ensayo, lo que indica que la concentración de polímero utilizada está justo en el umbral de máxima eficiencia del sistema. El aspecto final del ensayo 14 presentaba un medio fluido mientras que su réplica (ensayo 17) formó un gel. El cambio de ácido no ha servido para mejorar el comportamiento del sistema, mientras que la reducción del reticulante provoca que no forme un gel. Este resultado demuestra la hipótesis de partida: la capacidad del glutaraldehído para unir las cadenas de gelatina de diferentes microcápsulas hace que cuando la concentración de polímero es alta, este no esté lo suficientemente dispersado como para evitar que se formen aglomeraciones del mismo, provocando que el sistema forme un gel por la unión de las diferentes microcápsulas.

4.2.5. Influencia del orden de adición de los reactivos

Manteniendo el mismo objetivo que en el apartado anterior, [4.2.4. Influencia de la concentración de glutaraldehído], mejorar la eficiencia del proceso de microencapsulación, y teniendo en cuenta los resultados no favorables obtenidos en dicho apartado, se llevarán a cabo pruebas cambiando el orden de adición de los diferentes componentes que participan en el proceso reduciendo levemente la concentración de polímero del ensayo 14 considerada la frontera de colapso del sistema bien por el exceso de polímero o bien por la concentración de reticulante en el sistema.

En el ensayo 14 (punto de partida de este apartado) se supuso que el mecanismo de formación de la microcápsula se basaba en formar inicialmente una micela de polímero G-GA por la que el aroma se sentiría atraído al entrar en el sistema, introduciéndose en esta para que posteriormente el polímero reticule con la adición del glutaraldehído, en unas determinadas condiciones de pH y temperatura. Como alternativa a este posible mecanismo, se diseña el ensayo 24 en el cual inicialmente se disuelve la gelatina y posteriormente se añade la fragancia y se emulsiona comprobando la capacidad del medio formado por agua y gelatina para mantener el aroma emulsionado. Una vez creada la emulsión, la disolución de GA se añade al sistema para que interactúe con la gelatina presente en el medio.

En el ensayo 25 se mantiene el orden de adición utilizado en el ensayo 14, pero se reduce levemente la concentración de polímero en el sistema para ver su influencia y así poder comparar con el resto de resultados de este apartado.

Por último, con el ensayo 27 se intenta mejorar los resultados obtenidos en el ensayo 24 añadiendo glutaraldehído para reticular la estructura obtenida.

4.2.5.1. Diseño de ensayos

Ensayo	24	25	27
Gelatina (g)	9,0	9,0	7,5
Goma (g)	9,0	9,0	7,5
H ₂ O (ml)	350	350	300
Aroma (ml)	30	30	30
Formaldehído (ml)	--	--	--
Glutaraldehído (ml)	--	--	1

Tabla 16. Diseño de ensayos para el estudio de la influencia del orden de adición.

4.2.5.2. Resultados

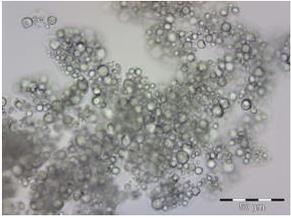
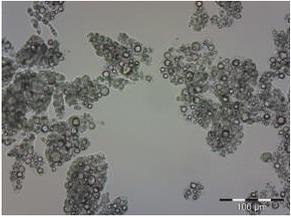
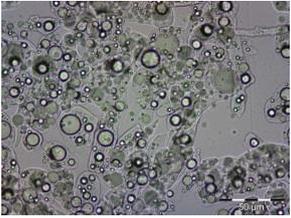
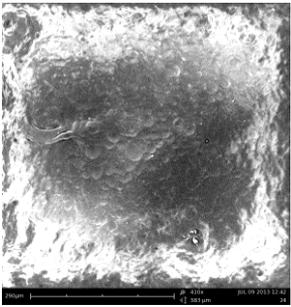
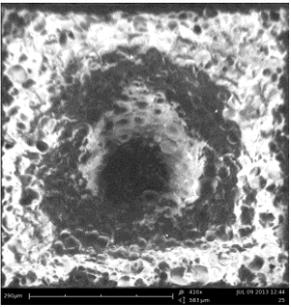
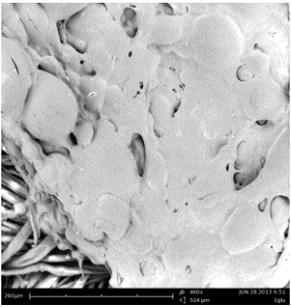
Ensayo	24	25	27
MO			
SEM			

Tabla 17. Estudio de la influencia del orden de adición mediante MO y SEM.

4.2.5.3. Discusión

Los resultados del ensayo 24 mostrados en la Tabla 17 demuestran que el nuevo orden de adición de los reactivos favorece la formación de microcápsulas, ya que las producidas en este ensayo presentan una morfología esférica y sin apenas aglomeraciones en comparación con el ensayo 25 que sigue la metodología con la que se inició este estudio. El hecho de que la formación del polímero G-GA se produzca una vez el aroma emulsionado se encuentra en el medio, favorece que esta formación se sitúe en la interfase aceite-agua y que el polímero se reparta de forma más equitativa sobre esta minimizando la formación de aglomeraciones. Esto coincide con el mecanismo descrito en apartado [1.2. COACERVACIÓN COMPLEJA] y referenciado en [14], [15] donde posteriormente a la formación de la emulsión de la fragancia se procede a la reducción del pH por debajo del punto isoeléctrico de la gelatina, formando entonces los coacervados de G:GA.

4.2.6. Selección del método de microencapsulación óptimo

Finalmente, una vez analizados los resultados obtenidos en el apartado [4.2.5. Influencia del orden de adición de los reactivos] se seleccionó el método de ensayo seguido en el ensayo 24 reduciendo ligeramente la concentración de polímero y de fragancia en el sistema, con el objetivo de mantener la morfología esférica y eliminar las aglomeraciones.

Ensayo 29

Reactivos: H₂O, gelatina tipo A, GA, disolución de HCl 37%, disolución de glutaraldehído al 50%.

Etapas:

- 1) Disolución 1. Peso de reactivos:
 - i. $M_{\text{gelatina}} = 4 \text{ g}$
 - ii. $V_{\text{H}_2\text{O}} = 100 \text{ ml}$
 - iii. $T_{\text{H}_2\text{O}} = 50^\circ\text{C}$
 - iv. Se añaden 10 g de fragancia a esta solución.
- 2) Disolución 2. Peso de reactivos:
 - i. $M_{\text{GA}} = 4 \text{ g}$
 - ii. $V_{\text{H}_2\text{O}} = 100 \text{ ml}$
 - iii. $T_{\text{H}_2\text{O}} = 25^\circ\text{C}$
- 3) Agitación de la mezcla a 900 rpm hasta la disolución visible de reactivos (por separado).
- 4) Adición de la disolución al reactor con una temperatura de baño de 50°C, 600 rpm (Agitador de pala).
- 5) Ajuste de pH con HCl hasta 3,92.
- 6) Pasados 90min, disminución hasta $T = 5^\circ\text{C}$.
- 7) Ajuste con NaOH hasta pH = 8.
- 8) Adición de 1g de glutaraldehído gota a gota.
- 9) Agitación a 600 rpm, $T = 20^\circ\text{C}$, $t = 12 \text{ h}$.

4.2.6.1. Diseño de ensayos

Ensayo	29
Gelatina (g)	4,0
Goma (g)	4,0
H ₂ O (ml)	200
Aroma (ml)	10
Formaldehído (ml)	--
Glutaraldehído (ml)	1

Tabla 18. Descripción del método óptimo.

4.2.6.2. Resultados

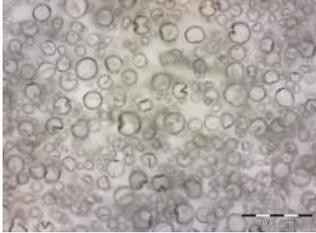
Ensayo 29	
MO	
SEM	

Tabla 19. Resultados de MO y SEM para el método óptimo.

4.2.6.3. Discusión

Tanto la microscopía óptica como el SEM demuestran que el método y las concentraciones utilizadas optimizan la formación microcápsulas en referencia a su morfología.

4.3. CONCLUSIÓN

Los ensayos llevados a cabo en este capítulo han permitido conocer las limitaciones del proceso de microencapsulación mediante coacervación compleja utilizando como material de pared gelatina y goma arábica. En primer lugar, se ha demostrado que existe una limitación importante en cuanto a la concentración de polímero en el sistema. La gran capacidad de la gelatina para absorber agua en su estructura hace que a concentraciones elevadas se forme un gel, a temperaturas por debajo de 35°C, cuando se reduce su solubilidad.

Por otro lado, se ha demostrado que el orden de adición de los diferentes componentes del proceso tiene una influencia importante en la morfología final de las microcápsulas. La emulsión previa

del aceite a encapsular mediante el uso de gelatina como emulsionante para la posterior adición de la goma arábiga favorece la obtención de microcápsulas reduciendo las aglomeraciones. La proporción entre gelatina y goma que permite obtener los mejores resultados a nivel morfológico es la relación 1:1 y, por último, la adición del reticulante en bajas concentraciones permite obtener microcápsulas mejor definidas, sin aglomeraciones. El orden de adición, la relación entre polímeros y las cantidades reducidas de reticulante son similares a las utilizadas por autores como Izabela Dutra Alvim y Carlos Raimundo Ferreira Grosso [95] o A. Lamprecht, U.F. Schäfer, C.-M. Lehr [96].

Con la conclusión de este capítulo se establece que el protocolo de ensayo 29 será la base de estudio para el resto de los capítulos de esta tesis.

4.4. BIBLIOGRAFÍA

- [14] V. Jack R. Lorraine, Newport News, “United States Patent (19,” vol. 19, no. 54, 1985.
- [15] C. Y. G. Lemetter, F. M. Meeuse, and N. J. Zuidam, “Control of the morphology and the size of complex coacervate microcapsules during scale-up,” *AIChE J.*, vol. 55, no. 6, pp. 1487–1496, 2009.
- [95] I. D. Alvim and C. R. F. Grosso, “Microparticles obtained by complex coacervation: influence of the type of reticulation and the drying process on the release of the core material,” *Food Sci. Technol.*, vol. 30, pp. 1069–1076, 2010.
- [96] A. Lamprecht, U. F. Schäfer, and C.-M. Lehr, “Characterization of microcapsules by confocal laser scanning microscopy: structure, capsule wall composition and encapsulation rate,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 49, no. 1, pp. 1–9, 2000.

CAPÍTULO 5:

Rol de la concentración micelar crítica (CMC) de los tensioactivos
en el proceso de microencapsulación

5. ROL DE LA CONCENTRACIÓN MICELAR CRÍTICA (CMC) DE LOS TENSIOSACTIVOS EN EL PROCESO DE MICROENCAPSULACIÓN

5.1. INTRODUCCIÓN

La estabilidad y la distribución del tamaño de partícula de las emulsiones dependen de las características de los tensioactivos. La concentración de este tensioactivo en la fase continua determina la capacidad de los diferentes polímeros para dirigirse a la interfase y formar la pared de la microcápsula. Esta concentración está estrechamente relacionada con la concentración micelar crítica (CMC) de cada tensioactivo y esta puede ser determinada por medio de la tensión superficial. La interacción entre los grupos funcionales del polímero y el tensioactivo limitará las propiedades pared final y la eficiencia de la microencapsulación. Además, la agitación tiene un rol importante en la microemulsión y, por tanto, en la formación de la microcápsula. Con el objetivo de demostrar la influencia de los tensioactivos y la agitación en el proceso de microencapsulación, tres tensioactivos diferentes (SMA, Kolliphor® and SDS) y tres agitaciones diferentes (300 rpm, 600 rpm, 900 rpm) han sido estudiadas y evaluadas.

5.2. DESCRIPCIÓN DE LOS TENSIOSACTIVOS ESTUDIADOS

Los tensioactivos son especies químicas con una naturaleza o estructura polar-no polar dentro de la misma molécula, con tendencia a situarse en la interfase hidrófila e hidrofóbica formando una capa monomolecular que cambia el valor de la tensión superficial. Esta localización impide el movimiento de moléculas desde la superficie hasta el interior del líquido en busca de un estado de menor energía, disminuyendo el fenómeno de tensión superficial.

Las propiedades generales y el comportamiento de los tensioactivos se deben al carácter dual de sus moléculas (grupo hidrófilo y lipófilo); el antagonismo entre estas dos secciones de su estructura y el equilibrio entre ellas es lo que le da al compuesto sus propiedades superficiales activas. El grupo hidrófilo ejerce un efecto solubilizante y tiende a conducir a la molécula a completar la disolución. El grupo hidrófobo, por otro lado, debido a su insolubilidad tiende a contrarrestar esta tendencia. Si se logra el equilibrio adecuado entre los dos grupos, la sustancia no se disuelve por completo, ni permanece sin disolverse totalmente, concentrándose en la interfaz las moléculas orientadas de tal forma que los grupos hidrófilos están orientados hacia la fase acuosa, mientras que los hidrófobos lo están hacia la fase no acuosa o de vapor.

La clasificación de los tensioactivos se basa en el poder de disociación de éstos en presencia de un electrolito y de sus propiedades fisicoquímicas:

Iónico

Tienen una gran afinidad por el agua, motivados por su atracción electrostática a los dipolos de agua pueden arrastrar con ellos a las soluciones de cadenas de hidrocarburos. El grupo hidrofílico contiene un grupo anfifílico catiónico o aniónico. La elección del contraión es importante porque afectará a las propiedades fisicoquímicas, en el caso de los catiónicos suelen ser haluros o metilsulfatos y en el caso de los metales alcalinos aniónicos.

Entre los que se ionizan en el agua se encuentran:

- Aniónico: en solución se ionizan, pero considerando el comportamiento de sus grupos en solución, el grupo hidrófobo queda cargado negativamente.

- Catiónico: en solución forman iones, quedando cargado positivamente el grupo hidrófobo de la molécula.

- Anfóteros: actúan según el medio en el que se encuentran, en un medio básico son aniónicos y en un medio ácido son catiónicos. El grupo hidrófilo combina una parte catiónica y una aniónica al mismo tiempo. La ionización en medios acuosos en estos casos puede ser dependiente del pH o no.

No iónico

Son ionizables y solubilizados por un efecto combinado de varios grupos solubles (hidrófilos) tales como enlaces de tipo éter o grupos hidroxilo.

Además de los tipos de tensioactivos mencionados, también existen los tensioactivos poliméricos, que consisten en bloques hidrófilos e hidrófobos copolimerizados. Por otro lado, las cadenas de hidrocarburos pueden ser reemplazadas por otros grupos hidrófobos tales como cadenas de silicona o cadenas floradas.

Los tensioactivos en solución, particularmente en medio acuoso, a una determinada concentración y temperatura, debido a su estructura anfifílica, tienen la habilidad de autoagregarse espontáneamente formando micelas o cristales líquidos, quedando adsorbidos en las interfases, reduciendo la tensión superficial, ya que modifican las interacciones moleculares interfaciales. Debido a las propiedades mencionadas, las aplicaciones de los tensioactivos son muy variadas ya que pueden actuar como emulsionantes, dispersantes, detergentes, humectantes, agentes espumantes o solubilizantes, y pueden ser usados en campos tan variados como el farmacéutico, cosmético, alimentación u otros.

Para conocer la afinidad relativa de los tensioactivos no iónicos a las fases acuosas y oleosas, el parámetro empírico llamado balance hidrófilo lipófilo (HLB) fue establecido. Este valor es una relación cuantitativa entre la parte hidrófila e hidrofóbica de una molécula de tensioactivo sin

tener en cuenta el resto de componentes del sistema. Para tensioactivos no iónicos, y en general etoxilados (con grupos de óxido de etileno) la fórmula generalmente usada es:

$$HLB = \frac{H}{(H+L)} \cdot 20 \quad \text{Ecuación 12}$$

Dónde H y L representan la masa molecular de los grupos hidrófilos y lipófilos de la molécula respectivamente. Su valor está comprendido entre 0 y 20.

Para valores bajos de HLB se considera que el tensioactivo es soluble en la fase oleosa, mientras que para valores altos se considera soluble en agua. A través del valor de HLB de un tensioactivo determinado, sus posibles usos pueden ser establecidos. Debido a su alta utilidad para predecir el comportamiento de los tensioactivos, el concepto de HLB ha sido extendido a otros tensioactivos tales como iónicos y anfóteros siendo este calculado mediante la siguiente ecuación:

$$HLB = 7 + \sum_{i=1}^m H_i - n \times 0.475 \quad \text{Ecuación 13}$$

Dónde m es el número de grupos hidrófilos en la molécula, H_i es el valor de los i grupos hidrófilos y n es el número de grupos lipófilos en la molécula.

Tensioactivos usados

Los tres tensioactivos usados para el estudio son: SDS, Kolliphor® y SMA.

1. Kolliphor® (Poloxamero 188)

Los poloxameros son copolímeros tribloque no iónicos compuestos de una cadena central hidrofóbica de polioxipropileno y dos cadenas laterales de hidrófilas de polioxietileno.

Este poloxámero es un tensioactivo que utiliza el impedimento estérico como mecanismo para lograr formar emulsiones. Para lograr este impedimento estérico es necesario que la cadena tenga grades radicales, para que retengan las micelas entre ellos, en este caso hay únicamente un radical metilo.

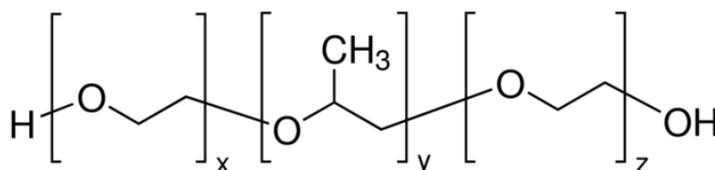


Figura 27. Kolliphor® estructura [97].

2. SMA

Es un polímero sintético formado por monómeros de estireno y anhídrido maleico. Los monómeros están ordenados casi perfectamente, resultando en un copolímero alternado, aunque una copilimerización aleatoria puede ocurrir con menos del 50% de anhídrido maleico.

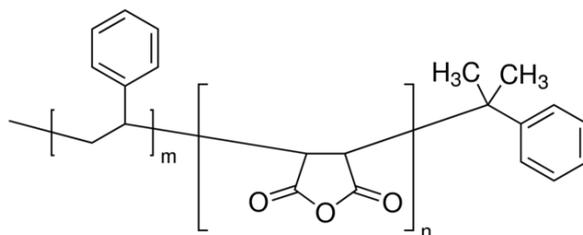


Figura 28. Estructura del SMA [98].

Es un tensioactivo no iónico, por tanto, actuará mediante impedimento estérico.

3. SDS

El dodecilsulfato sódico (SDS o NaDS) es un tensioactivo aniónico usado en varios productos de cuidado personal, tales como, champú y geles de baño. La molécula tiene una cadena de 12 átomos de carbono unidos a un grupo sulfato, dotando a la molécula del carácter anfifílico requerido para todos los detergentes.

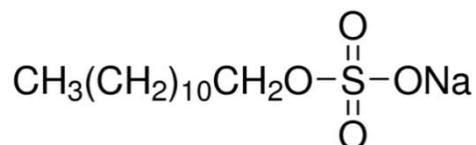


Figura 29. Estructura del SDS [99].

4. Goma arábica

La goma arábica es un agente emulsificante muy efectivo. Debido a su función de protectora de coloides es ampliamente usada en la preparación de emulsiones aceite en agua en alimentación.

Esta goma con las propiedades conferidas por su carga negativa debida a presencia del grupo -COOH en su estructura, produce emulsiones estables con la mayoría de aceites en un amplio rango de pH y en la presencia de electrolitos, sin la necesidad de un agente estabilizante secundario.

Este hetero-polisacárido forma un film visible en la interfase del aceite, pero el mecanismo de emulsificación no está aún clarificado. Se cree que esta goma, como agente formador de película, previene la coalescencia de las gotas de aceite permitiendo un alto grado de dispersión [100].

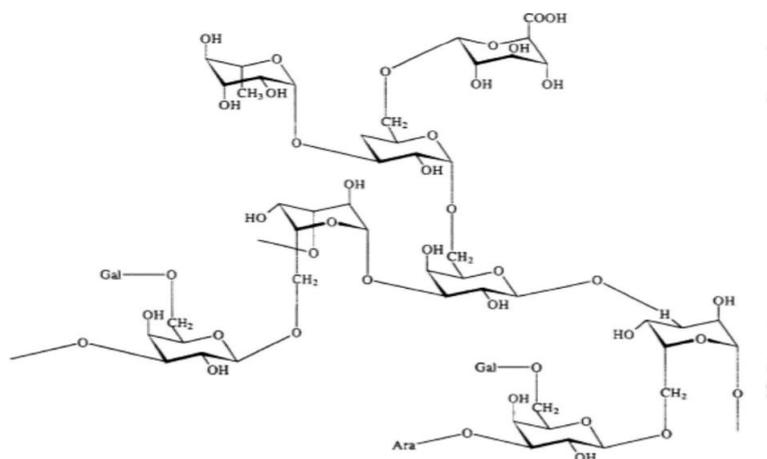


Figura 30. Goma arábica [101], en la que " Gal " es D-Galactopiranososa, " GluA " es β-D-ácido glucurónico y " R " es uno de los siguientes radicales: L-Ara- (1-; oc -D-Gal) 1-3) -L-Ara; o β-L-Arap (1-3) -L-Araf (1-3).

Tensioactivo	HLB	Mw	Carácter químico
Goma Arábica	8	250000	Aniónico
Kolliphor®	29	9500	No iónico
SMA	16	180000	No iónico
SDS	40	288	Aniónico

Tabla 20. Características de cada tensioactivo.

5.3. METODOLOGÍA DE ENCAPSULACIÓN

Se prepara una disolución de gelatina (2-6%) con un agitador Heildolph usando una hélice y agitando a 300-900 rpm durante 2 horas a 45°C. (Disolución A).

Diferentes concentraciones de tensioactivos fueron preparados usando 100 ml de agua desionizada y agitando a 300-900 rpm, usando el mismo sistema de agitación. (Disolución B).

A cada disolución B se le añade, gota a gota, aceite esencial de limón manteniendo la misma velocidad de agitación. (Disolución C).

Una vez las disoluciones A y C son completamente homogéneas, se mezclan manteniendo el sistema de agitación.

Una tercera disolución (Disolución D) se prepara mezclando goma arábica (2-6 g) en 100 ml de agua desionizada en un reactor IKA LR-2.ST de 2 L. Esta disolución se calienta hasta 45°C y, entonces, cantidades adecuadas de A y B se añaden al sistema mientras se mantiene la velocidad de agitación a 300-900 rpm y, finalmente, se ajusta el pH a 3-5. Después de un periodo de entre 60 y 120 min la temperatura se reduce drásticamente por debajo de 12°C.

Después de mantener el sistema en las condiciones mencionadas durante 45-75 min, el pH se modifica nuevamente para incrementar el entrecruzamiento y se añade el agente reticulante. El slurry final se mantiene durante 12 horas en condiciones de baja agitación.

5.4. RESULTADOS

5.4.1. Tensión superficial

Numerosos estudios [102][103] han demostrado que, como mínimo, la concentración micelar crítica debe ser alcanzada para mantener un aceite en emulsión. A partir de esta concentración, las cadenas de tensioactivo se ordenan formando micelas cuya concentración crecerá hasta un valor máximo manteniendo la tensión superficial del medio donde está disuelto. Representando la curva formada por la tensión superficial (SF) frente a la concentración de tensioactivo, el valor de la CMC se determina justo en el punto de inflexión de la curva.

A continuación, se muestra la determinación de la CMC para cada uno de los tres tensioactivos utilizados en este estudio. La Figura 31 Kolliphor® (Poloxámero (poli (etilenglicol)-bloque-poli(propilenglicol)-bloque-poli(etilenglicol))), la Figura 32 SMA (copolímero (estireno/anhídrido maleico)), la Figura 33 muestra una ampliación de la concentraciones iniciales del SMA y la Figura 34 SDS (Dodecil sulfato de sodio).

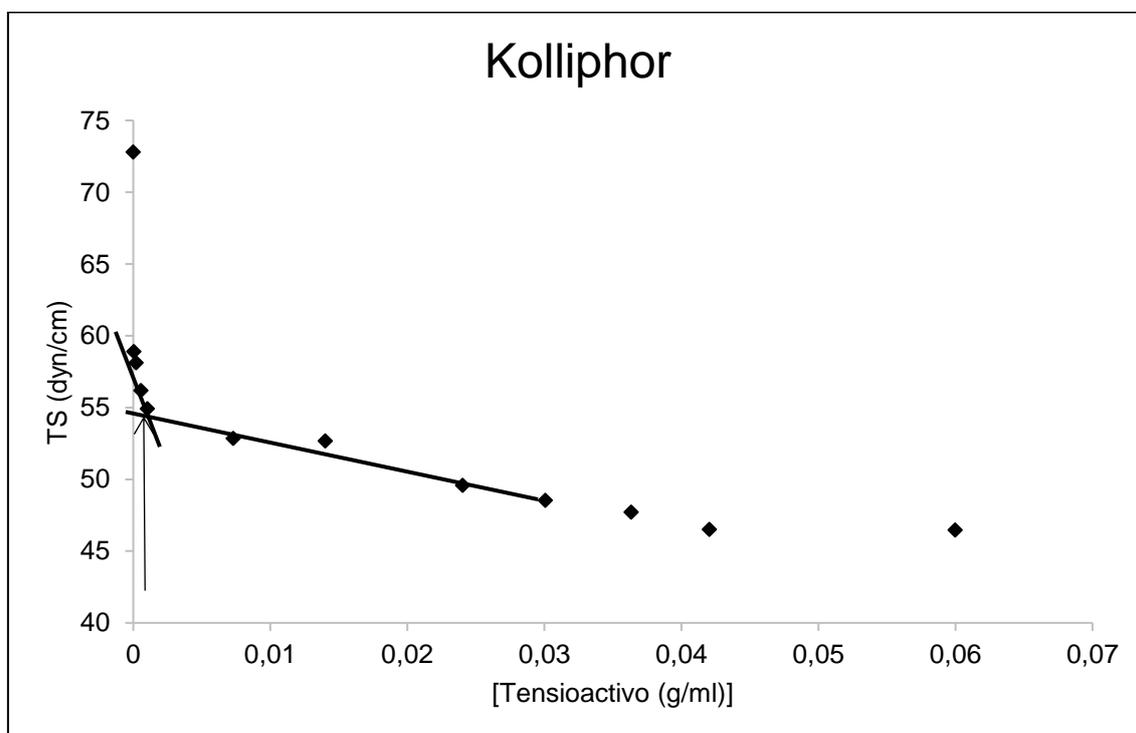


Figura 31. Determinación de la CMC del Kolliphor®.

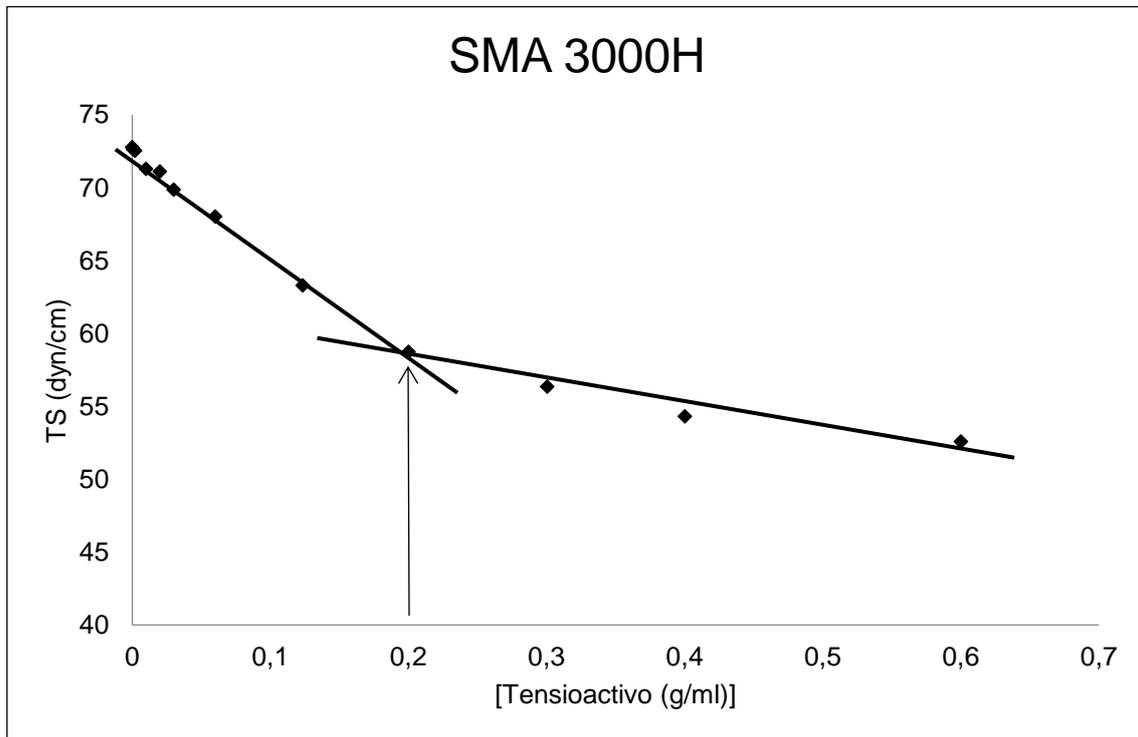


Figura 32. Determinación de la CMC del copolímero SMA.

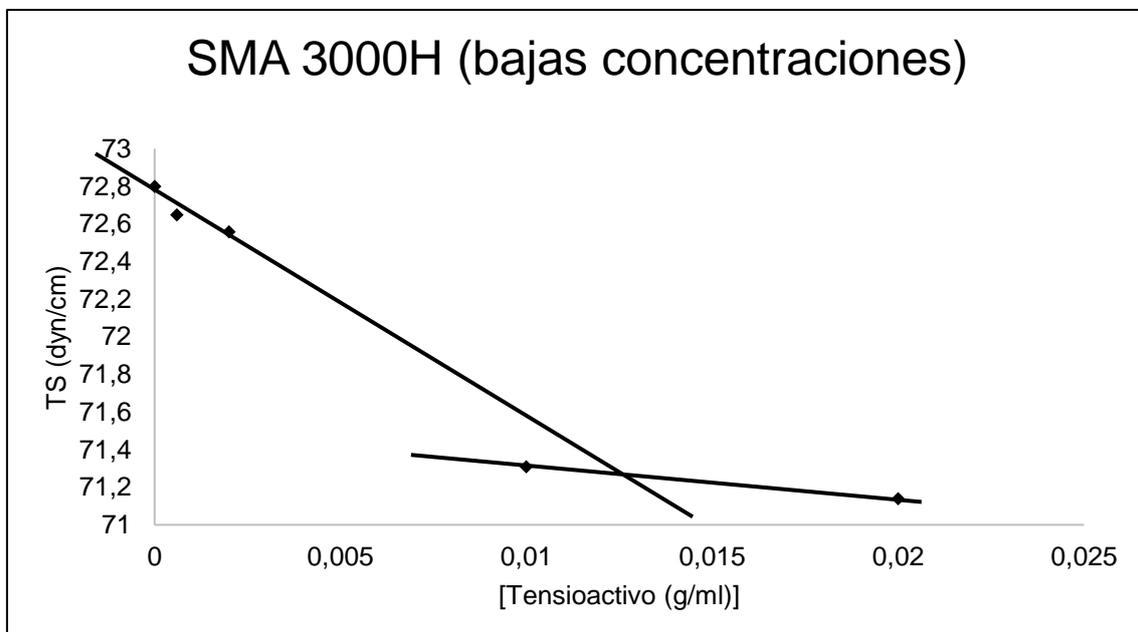


Figura 33. Posible CMC detectada a concentraciones reducidas de SMA 3000H.

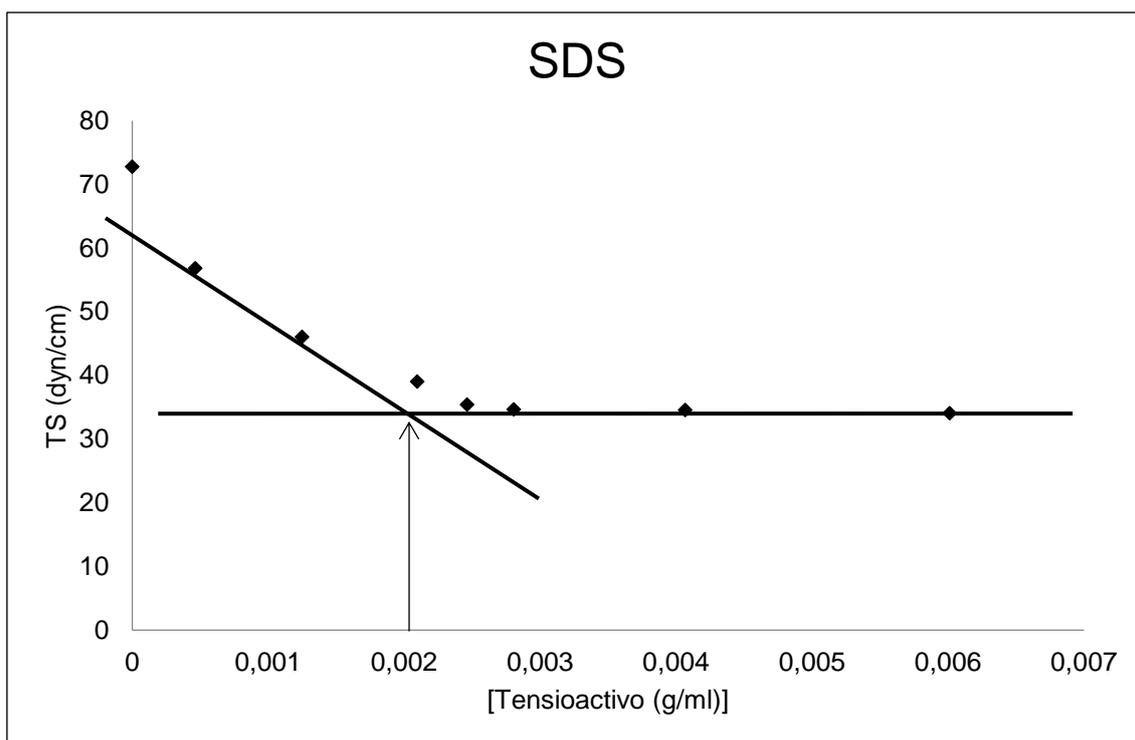


Figura 34. Determinación de la CMC del SDS.

Mientras en la Figura 31 y la Figura 34 la CMC está claramente identificada, no ocurre lo mismo en la Figura 32 donde la curva muestra dos puntos de inflexión. En el primer punto de inflexión, el cambio de pendiente no es tan significativo como en el segundo punto, sin embargo, ambos son tenidos en cuenta como CMC hasta que el valor real de la CMC sea determinado mediante otros análisis.

CMC				
Tensioactivo	(g/ml)	(mM)	Lit. (mM)	Ref
Kolliphor	0,005	0,52	0,48	[104]
SMA	0,200 // 0,013	1,11//0,08	--	--
SDS	0,002	8,13	8,0-8,4	[105][106][107]

Tabla 21. Valores de la CMC determinados experimentalmente mediante tensión superficial.

5.4.2. Microscopía óptica

Una vez determinada la CMC de cada tensioactivo, la metodología de microencapsulación indicada en el apartado 3.3 “Metodología de encapsulación” fue llevada a cabo usando concentraciones alrededor de la CMC de cada tensioactivo y diferentes velocidades de agitación. Todas las concentraciones, velocidades de agitación y resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

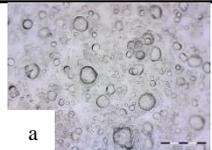
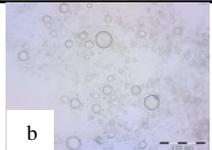
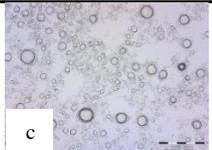
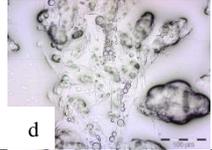
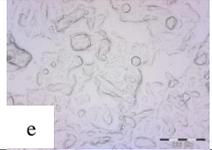
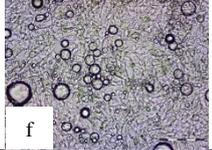
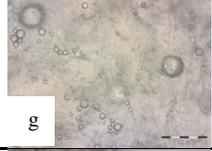
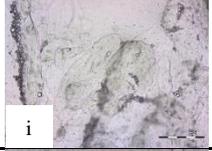
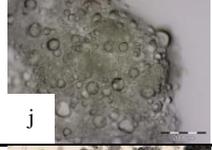
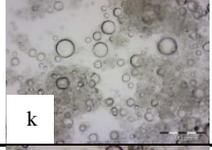
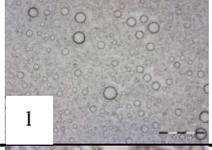
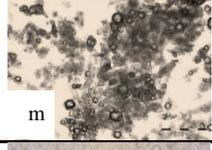
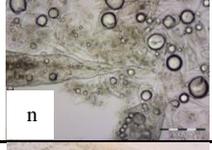
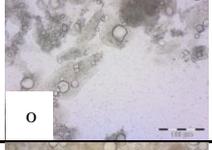
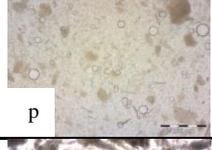
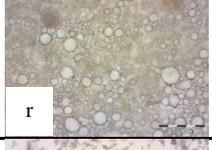
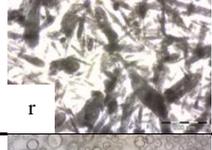
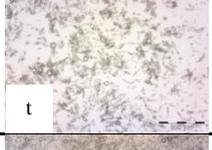
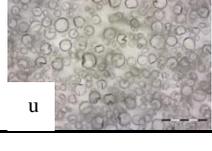
Tensioactivo	Concentración (g/ml)	Velocidad de agitación		
		300 rpm	600 rpm	900 rpm
Sin tensioactivo	0,000			
Kolliphor®	0,004			
	0,012			
SMA	0,020			
	0,050			
	0,220			
SDS	0,001			
	0,003			

Tabla 22. Efecto de la concentración de tensioactivo y de la agitación.

La Tabla 22 muestra como el tamaño de las microcápsulas se ve claramente influenciado por la velocidad de agitación. Además, el tipo y la concentración de tensioactivo afectan a la formación de la microcápsula y a la distribución y el tamaño de las mismas.

Como se puede observar en las imágenes de la Tabla 22- a,b,c, en el caso en el que no se añade tensioactivo en el sistema, es posible formar microcápsulas. La goma arábiga presente, debido a su estructura, se sitúa en la interfase aceite-agua; además, su carga negativa en todo el rango de pH hace que esta interactúe con la gelatina cuando el pH está por debajo de su punto isoeléctrico [45], formando la pared de la microcápsula. Por otro lado, a pesar de que la goma tiene ciertas

propiedades como emulsionante, no es posible reducir el tamaño ni la distribución de las microcápsulas aumentando la agitación debido a la formación de espuma que interfiere en el proceso de emulsión reduciendo su estabilidad. Por esta razón se determinó que para lograr microcápsulas con una distribución de tamaño estrecha y un diámetro adecuado se requería el uso de otros tensioactivos.

El Kolliphor® P188 también conocido como “Polaxamer P188” y “Plunioic F68” es un copolímero con una masa molecular de polioxipropileno de 8400 g/mol y un contenido de polioxietileno del 80% ($x, z = 80; y = 27$). Está clasificado como agente estabilizante con un HLB = 29, debido a su alto contenido en polioxietileno. Este poloxámero es un tensioactivo altamente polar y a concentraciones por encima de su CMC, las cadenas hidrofóbicas forman un núcleo de micelas protegidas del medio acuoso por los grupos hidrofílicos [108].

Este estabilizante muestra termosensibilidad inversa, por tanto, es soluble en soluciones acuosas a bajas temperaturas, pero gelifica a altas temperaturas; además, P188 tiene su punto de fusión alrededor de 55°C.

A pesar de ser conocido como un buen estabilizante, en todos los test que se llevaron a cabo cambiando la velocidad de agitación y su concentración, no fue posible producir microcápsulas, ya que, en todos los casos, el complejo gelatina-goma arábica interactuó fuera de la interfase aceite-agua debido al efecto del poloxámero. La termosensibilidad inversa del Kolliphor® (a pesar de que el proceso se lleva a cabo 10°C por debajo de su punto de fusión), hace que el polímero gelifique en la interfase arrastrando consigo a la gelatina y la goma arábica debido a su alto peso molecular y a la clara orientación de la parte polar de su estructura hacia la fase acuosa.

A partir de la tensión superficial SMA presentó dos posibles valores de CMC [90]. Intentado determinar la concentración de este tensioactivo a partir de la cual permite producir microcápsulas, se probaron tres concentraciones diferentes: dos ligeramente superiores a las dos CMC indicadas en la Tabla 21 y una por debajo de las dos.

Dos de las tres concentraciones escogidas estaban alrededor de 0,2 g/ml, pero en ambos casos, no se formaron microcápsulas (Tabla 22- m,n,o,p,q,r) lo que podría significar una de las siguientes cosas: o bien una de ellas no es un buen tensioactivo para el sistema estudiado y o bien la concentración de tensioactivo es demasiado elevada. Normalmente, altas concentraciones están relacionadas con una reducción del tamaño de partícula [109]. Sin embargo, en este caso, se debe tener en cuenta que la superficie hidrófila de las micelas de SMA está compuesta por los grupos carboxilos del ácido maleico, los cuales otorgan una carga negativa a las micelas, pudiendo producir una gran repulsión entre ellas, ya que están muy juntas entre sí en la fase acuosa. Este hecho podría ser suficiente para desestabilizar las micelas [110]. Además, el SMA tiene un HLB alrededor de 16 [111] lo que indica su predominante carácter hidrófobo, una vez la micela se

desestabiliza, cuando la gelatina cargada positivamente aparece en el sistema, el tensioactivo se siente muy atraído y deja la micela. El resultado es que el SMA, la gelatina y la goma arábiga interactúan unos con otros fuera de la interfase aceite-agua produciendo aglomeraciones de polímero y aceite libre (Tabla 22-m,n,o,p,q,r).

La otra posible CMC se sitúa alrededor de 0,05 g/ml (Tabla 21). Esta concentración es significativamente inferior a la otra estudiada (0,20 g/ml). Además de la repulsión creada por la parte polar de la estructura, el gran tamaño de los grupos estireno evita que haya coalescencia del aceite por impedimento estérico. Como se puede ver en la Tabla 22- 1, es necesaria una agitación de 900 rpm para obtener microcápsulas dispersadas en el medio. Probablemente, para contrarrestar la atracción existente entre la gelatina y el SMA, la cual impide que la gelatina se distribuya uniformemente en la interfase aceite-agua. Además, la goma arábiga a esta velocidad tiene en la interfase junto al SMA. De esta manera, aunque la distribución del tamaño de partícula no es muy estrecha, la gelatina puede interactuar con la goma y el SMA creando un espesor similar en toda la microcápsula.

Cuando el dodecil sulfato de sodio es usado como tensioactivo ($HLB \approx 40$) muestra claramente un carácter hidrófobo. Gracias a su carga negativa en disolución y solo para concentraciones por encima de la CMC (como puede verse en Tabla 22- u,v,w), este compuesto orgánico sintético tiene la capacidad de mantener el aceite en agua en microemulsión [112].

Cuando el aceite es añadido a la disolución de SDS en agua, las cadenas hidrocarbonadas de tensioactivo se orientan hacia el interior de la gota cargando su superficie negativamente [113].

Cuando la solución de gelatina es añadida manteniendo el pH por encima del punto isoeléctrico, esta no se siente atraída por el SDS por estar cargada también negativamente. Posteriormente se añade la goma arábiga en las micelas situándose en la interfase aceite-agua junto al SDS y creando una superficie cargada negativamente por la que la gelatina se sentirá atraída cuando esté cargada positivamente después de bajar el pH por debajo de su punto isoeléctrico [84].

5.4.3. SEM

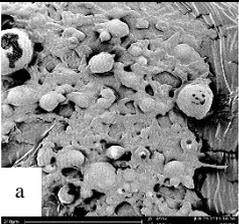
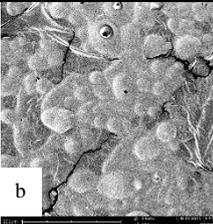
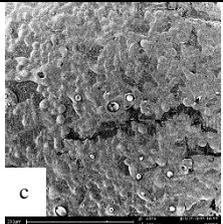
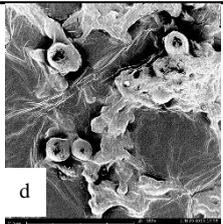
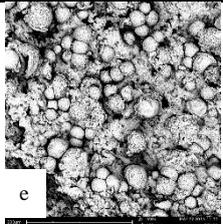
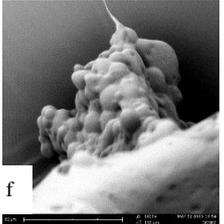
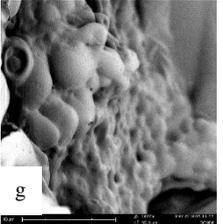
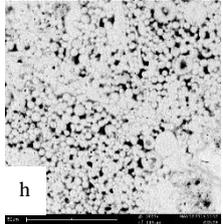
Tensioactivo	Concentración (g/ml)	Velocidad de agitación		
		300 rpm	600 rpm	900 rpm
Sin tensioactivo	0,00			
Kolliphor®	0,005	--	--	--
	0,012	--	--	--
SMA	0,02	--	--	
	0,05	--	--	--
	0,22	--	--	
SDS	0,001	--	--	--
	0,00225			

Tabla 23. Morfología de las microcápsulas formadas.

La Microscopía Electrónica de Barrido (Scanning electron microscope, SEM) permitió obtener información de la morfología de las microcápsulas. Muchas veces, es complejo identificar mediante microscopía óptica si alrededor de las gotas de aceite emulsionadas hay una pared formada o no. Además de disipar estas dudas, la tecnología SEM proporciona información acerca de las propiedades mecánicas, tales como la rigidez, de la pared de la microcápsula. La Tabla 23 muestra las imágenes de los lotes producidos. Como se podía ver mediante microscopía óptica, solo pueden producirse microcápsulas cuando la concentración de tensioactivo presente en la fase acuosa es superior a la CMC. En los lotes en los que fue usado Kolliphor como tensioactivo, no se formaron microcápsulas. Por otro lado, en el caso del SMA sí se consiguieron formar microcápsulas pero únicamente a velocidades de agitación altas (900 rpm) (Tabla 23- d),

ratificando que la CMC de este polímero se sitúa ligeramente por debajo de 0,02 g/ml. Por último, tanto las cápsulas formadas con SDS (Tabla 23- f,g,h) y sin tensioactivo (Tabla 23-a,b,c) permiten obtener microcápsulas con diferentes características dependiendo de la velocidad de agitación.

En general, todas las imágenes de microcápsulas formadas demuestran que la pared de estas es elástica, ya que después de dejarlas secar unas encima de otras durante la preparación de la muestra para el análisis de SEM, estas se van acoplado unas a otras modificando su forma sin dejar huecos entre ellas. Este comportamiento general, no se observa en el caso en el que el SMA se usó a muy altas concentraciones (Tabla 23- e). Probablemente, la cantidad de SMA modifica las propiedades típicas de una pared formada por gelatina-goma arábica, asemejándolas a las del copolímero SMA y presentando más rigidez. Sin embargo, se aprecian grandes cantidades de polímero fuera de la pared de las microcápsulas debido al exceso de este en el sistema.

5.4.4. Distribución del tamaño de partícula

Con los resultados obtenidos mediante microscopía óptica y SEM, se demuestra que la distribución del tamaño de partícula está fuertemente influenciada por el tipo de tensioactivo y la velocidad de agitación.

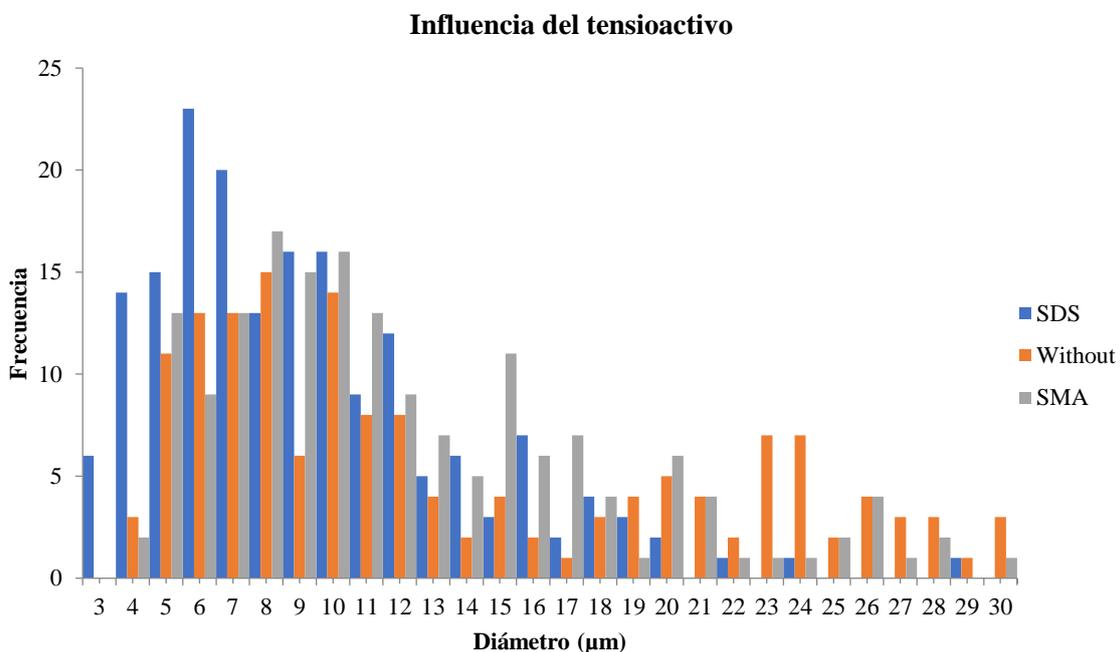


Gráfico 1. Distribución del tamaño de partículas debida a la influencia del tensioactivo a 900 rpm.

La influencia del SDS y el SMA como tensioactivos y su ausencia se evaluó. El sistema sin tensioactivo presenta una amplia distribución de tamaño, mientras que con el uso de estos se consigue estrechar esta distribución. El SDS es el tensioactivo que permite obtener una

distribución de tamaño más estrecha y un diámetro más pequeño. El Gráfico 1 demuestra que el proceso de microencapsulación llevado a cabo en este estudio mediante coacervación compleja de gelatina-goma arábiga requiere de un tensioactivo como el SDS para obtener microcápsulas con pocas diferencias en tamaño dentro del mismo lote.

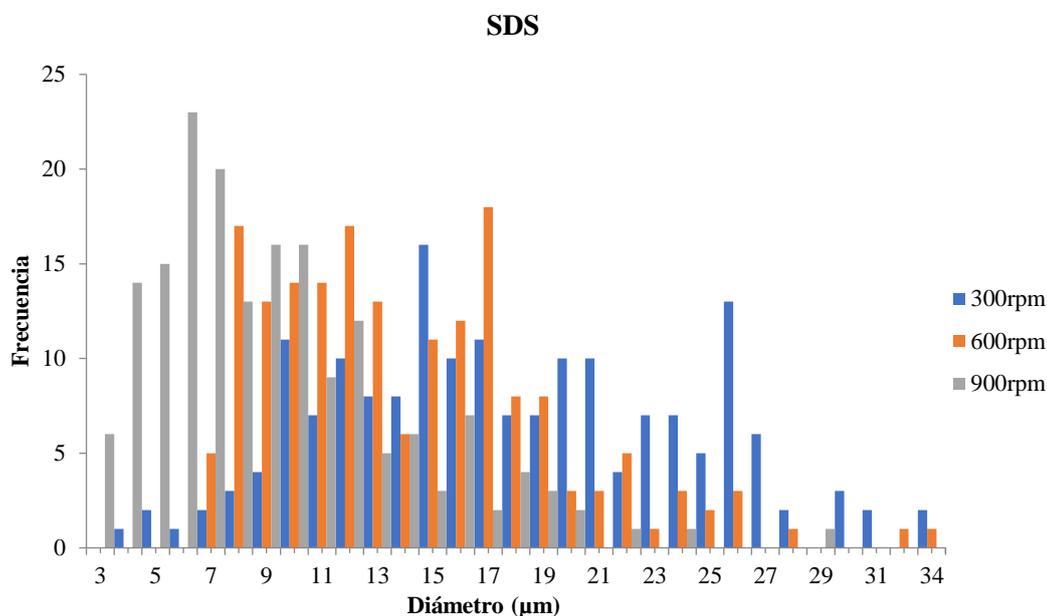


Gráfico 2. Distribución del tamaño de partícula debida a la influencia de la velocidad de agitación con SDS

El Gráfico 2 muestra la influencia de la velocidad de agitación en el diámetro y en la distribución del tamaño de partícula para lotes de microcápsulas producidos a una misma concentración de SDS. Un incremento en la velocidad de agitación causa una reducción en diámetro de partícula además de un estrechamiento en la distribución de este.

5.4.5. Análisis termogravimétrico (TGA/DTGA)

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por medio de SEM, únicamente dos de los tres tensioactivos permiten producir microcápsulas con la metodología de encapsulación estudiada. La

Figura 35 muestra la curva de TGA de las microcápsulas producidas con SDS como tensioactivo usando 3 velocidades de agitación diferentes y comparándolas con la curva producida por el complejo gelatina-goma arábiga reticulado sin fragancia y sin tensioactivo.

Microcápsulas	Tensioactivo	Velocidad agitación	Pérdida de peso	Eficiencia	Pico de temperatura
18,7 mg	2,25 g/l SDS	300 rpm	7,76 mg	37,5%	286,11°C
15,0 mg	2,25 g/l SDS	600 rpm	3,97 mg	23,4%	283,22°C
12,6 mg	2,25 g/l SDS	900 rpm	2,39 mg	15,9%	282,11°C
11,7 mg	Without	300 rpm	0,36 mg	--	--

Tabla 24. Influencia de la agitación en la eficiencia de encapsulado.

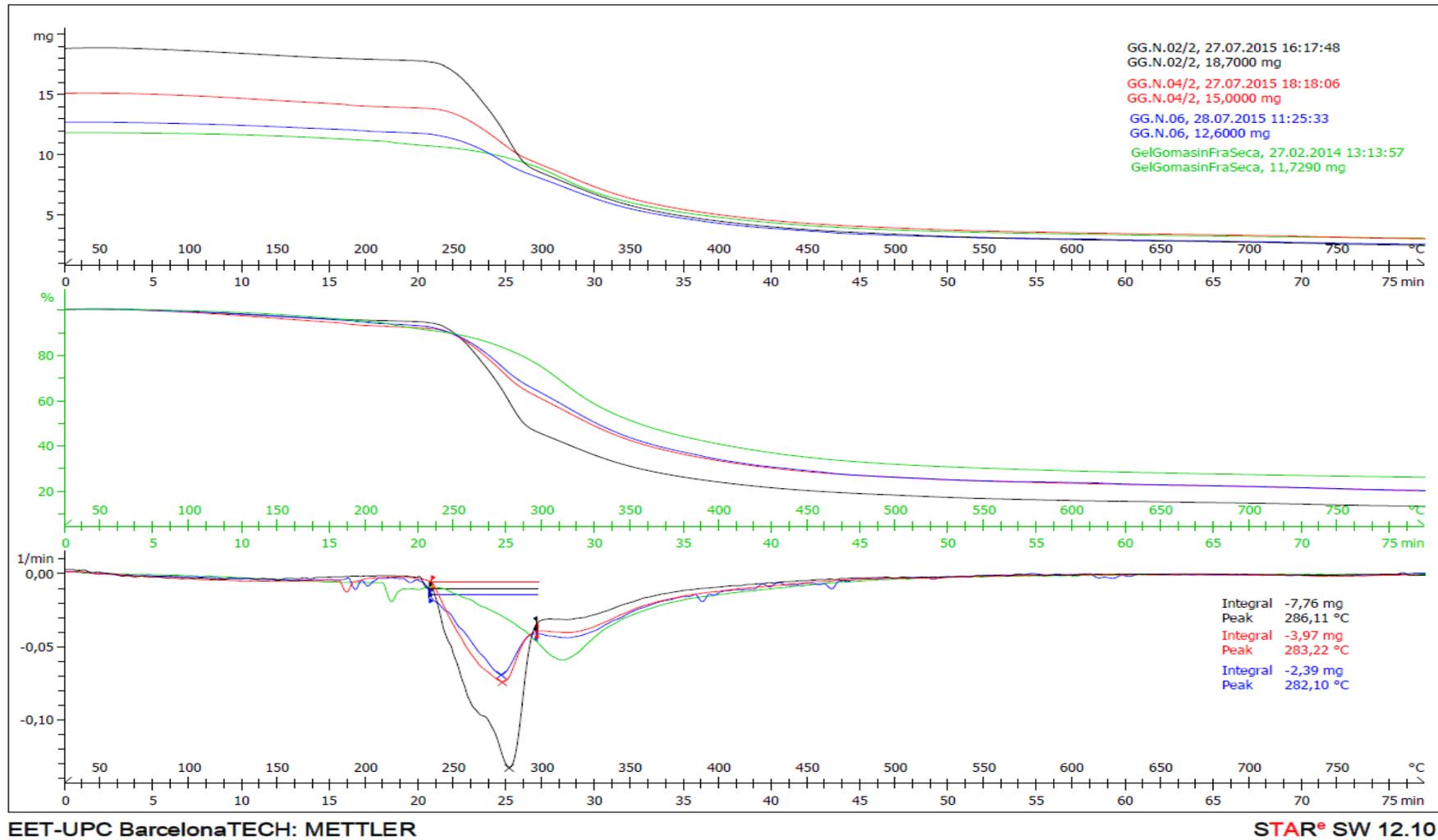


Figura 35. Influencia de la agitación en la eficiencia de encapsulado.

A partir de los 240°C se observa que hay una gran pérdida de peso. Este punto, como puede verse en la curva sin aceite, es la temperatura a la cual el polímero empieza a degradarse, por tanto, teniendo en cuenta que el punto de ebullición del aceite está alrededor de 80°C, éste se evaporará inmediatamente. Debido a que el polímero es el mismo en todos los casos, una gran pérdida de peso o una pendiente mayor en esta caída de peso implicará que la cantidad de aceite encapsulado es mayor y por tanto, también lo será la eficiencia [99].

Aproximadamente a 280°C se produce un nuevo cambio de pendiente con la misma inclinación que la obtenida en la curva del polímero analizado individualmente (línea verde en la

Figura 35).

Como puede observarse en la Tabla 24 bajas velocidades de agitación favorecen la eficiencia de la encapsulación. Fue demostrado por medio de microscopía óptica Tabla 22 que el diámetro de microcápsulas es más grande y con una variación mayor cuando se utilizan velocidades de agitación menores, lo que significa que el área superficial de aceite en la emulsión se reduce en estas condiciones, y por tanto, la cantidad polímero por unidad de superficie es mayor. Este hecho podría ser la razón por la cual este tipo de microcápsulas son capaces de retener mejor el aceite en su interior hasta que se produce la degradación del polímero y no antes.

La Figura 36 muestra las curvas de TGA que tienen una mayor pérdida de peso entre los 240°C y 280°C, para cada uno de los tensioactivos estudiados.

Microcapsulas	Tensioactivo	Velocidad agitación	Pérdida de peso	Eficiencia	Pico de temperatura
18,7 mg	2,25 g/l SDS	300 rpm	7,59 mg	37,5%	286,11°C
15,0 mg	2,25 g/l SDS	600 rpm	3,55 mg	20,6%	283,22°C
17,7 mg	Without	300 rpm	8,86 mg	47,0%	267,94°C
18,5 mg	20 g/l SMA	900 rpm	7,88 mg	39,5%	263,19°C
11,7 mg	Without	300 rpm	0,36 mg	--	--

Tabla 25. Influencia de la agitación y el tensioactivo en la eficiencia de encapsulado

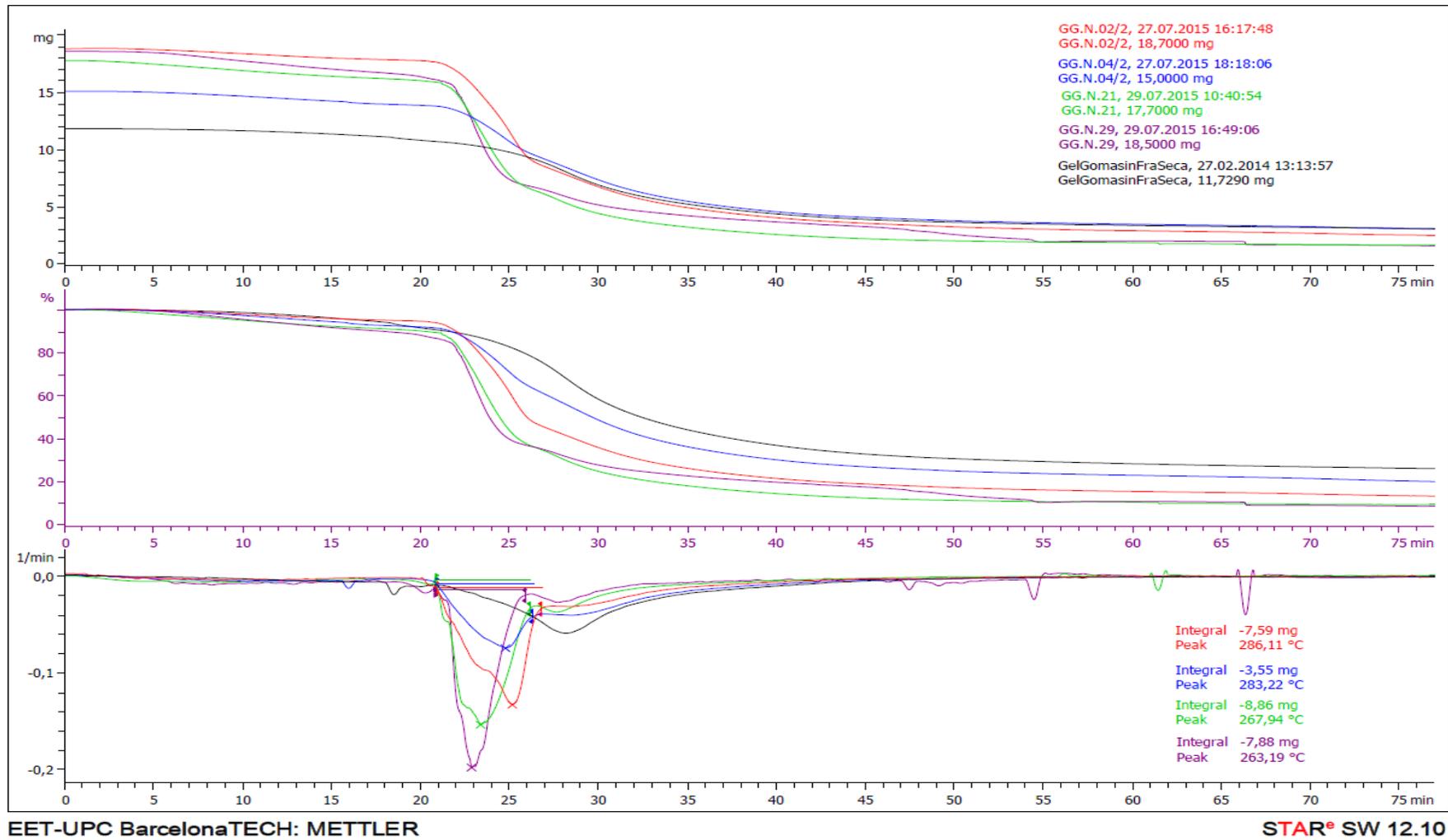


Figura 36. Influencia de la agitación y el tensioactivo en la eficiencia de encapsulado.

Como se puede observar en la Figura 36, las curvas de TGA tienen un comportamiento similar independientemente del tipo de tensioactivo. La temperatura a partir de la cual la pared de la microcápsula se empieza a degradar es similar aunque, por otro lado, la cantidad de aceite microencapsulado es diferente dependiendo del tensioactivo. Las mayores eficiencias fueron obtenidas usando goma arábica (material de pared) como único tensioactivo. Eficiencias similares se obtuvieron usando SMA y SDS sin embargo, la pendiente de cada una de las curvas indica que la estructura de la pared obtenida usando SMA como tensioactivo es más uniforme y ordenada, ya que la pendiente de pérdida de peso es mayor.

5.5. CONCLUSIÓN

Se ha demostrado la importancia de alcanzar concentraciones de tensioactivo por encima de su CMC para obtener microemulsiones estables. Dependiendo del tipo de tensioactivo, su HLB y su estructura, la gelatina y la goma arábica (material de la pared de las microcápsulas) se dirigirán a la interfase aceite-agua para formar la microcápsula influyendo también en sus características finales. La distribución de tamaño de partícula (particle size distribution, PSD) de las microcápsulas también depende del tipo de tensioactivo, sin embargo, el principal factor que influye en esta distribución es la agitación. Estrechamientos en la PSD y tamaños pequeños de microcápsulas no están alineados con una mayor eficiencia, lo que demuestra que la agitación tiene una gran influencia en la microemulsión y la formación de paredes.

5.6. BIBLIOGRAFÍA

- [84] P. Hansson and B. Lindman, "Surfactant-polymer interactions," pp. 604–613, 1996.
- [90] I. Lynch, J. Sjöström, and L. Piculell, "Reswelling of Polyelectrolyte Hydrogels by Oppositely Charged Surfactants," *J. Phys. Chem. B*, vol. 109, no. 9, pp. 4258–4262, Mar. 2005.
- [97] BASF, "Kolliphor™ P Grades," no. 118481, pp. 1–8, 2012.
- [98] SIGMA-ALDRICH, "Poly(styrene-co-maleic anhydride)."
- [99] Merck, "Sodium dodecyl sulfate Ph Eur," 2007.
- [100] M. K. Sabah, E. Kheir, A. El, G. A. Yagoub, and A. A. A. Baker, "Emulsion-Stabilizing Effect of Gum from *Acacia senegal* (L.) Willd. The Role of Quality and Grade of Gum, Oil Type, Temperature, Stirring Time and Concentration," *Pakistan J. Nutr.*, vol. 7, no. 3, pp. 395–399, 2008.

- [101] SIGMA-ALDRICH, "Gum arabic from acacia tree," *MFCD000812*.
- [102] S.-Y. Lin, Y.-Y. Lin, E.-M. Chen, C.-T. Hsu, and C.-C. Kwan, "A Study of the Equilibrium Surface Tension and the Critical Micelle Concentration of Mixed Surfactant Solutions," *Langmuir*, vol. 15, no. 13, pp. 4370–4376, Jun. 1999.
- [103] A. L. Tasker, J. P. Hitchcock, L. He, E. A. Baxter, S. Biggs, and O. J. Cayre, "The effect of surfactant chain length on the morphology of poly(methyl methacrylate) microcapsules for fragrance oil encapsulation," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 484, pp. 10–16, 2016.
- [104] F. Guth *et al.*, "Development of an improved poloxamer 188 to minimize risk in biologic manufacturing," pp. 8–11.
- [105] A. Cifuentes, J. L. Bernal, and J. C. Diez-Masa, "Determination of Critical Micelle Concentration Values Using Capillary Electrophoresis Instrumentation," *Anal. Chem.*, vol. 69, no. 20, pp. 4271–4274, Oct. 1997.
- [106] M. Pérez-Rodríguez, G. Prieto, C. Rega, L. M. Varela, F. Sarmiento, and V. Mosquera, "A Comparative Study of the Determination of the Critical Micelle Concentration by Conductivity and Dielectric Constant Measurements," *Langmuir*, vol. 14, no. 16, pp. 4422–4426, Aug. 1998.
- [107] A. Prieв, S. Zalipsky, R. Cohen, and Y. Barenholz, "Determination of Critical Micelle Concentration of Lipopolymers and Other Amphiphiles: Comparison of Sound Velocity and Fluorescent Measurements," *Langmuir*, vol. 18, no. 3, pp. 612–617, Feb. 2002.
- [108] M. A. Faiz Afzal, "A review on Pluronic block copolymer micelles: structure and dynamics," 2013.
- [109] M. F. Zambaux *et al.*, "Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method," *J. Control. Release*, vol. 50, no. 1–3, pp. 31–40, 1998.
- [110] C. Tanford, "Theory of micelle formation in aqueous solutions," *J. Phys. Chem.*, vol. 78, no. 24, pp. 2469–2479, 1974.
- [111] I. M. D. Martins, "Microencapsulation of Thyme Oil by Coacervation: Production, Characterization and Release Evaluation," pp. 4–90, 2012.
- [112] T. G. Mason, J. N. Wilking, K. Meleson, C. B. Chang, and S. M. Graves, "Nanoemulsions: Formation, structure, and physical properties," *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 18, no. 41,

pp. 635–666, 2006.

- [113] K. S. Mayya, A. Bhattacharyya, and J. F. Argillier, “Micro-encapsulation by complex coacervation: Influence of surfactant,” *Polym. Int.*, vol. 52, no. 4, pp. 644–647, 2003.

CAPÍTULO 6:

Estudio de los mecanismos de reticulación en la obtención de
microcápsulas de gelatina-goma arábica

6. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE RETICULACIÓN EN LA OBTENCIÓN DE MICROCÁPSULAS DE GELATINA-GOMA ARÁBIGA

6.1. INTRODUCCIÓN

Para el estudio de la cinética de reticulación en el proceso de microencapsulación de fragancias utilizando gelatina y goma arábica como materiales de pared, se pretende controlar la evolución en el tiempo de la concentración de reticulante en la fase continua para así obtener las ecuaciones que permitan realizar este estudio.

El equipo utilizado para la determinación de la concentración de reticulante en la fase acuosa será el espectrofotómetro UV-VIS, el cual permite realizar a partir de la absorbancia del reticulante de cada muestra, una recta de calibrado con la que obtener la cantidad de reticulante a lo largo del tiempo. Se extraerán 6 muestras del reactor en diferentes tiempos durante los primeros 90 minutos y una séptima muestra al día siguiente, abarcando de esta forma todo el tiempo de reacción.

Se llevará a cabo el estudio de la cinética para tres reticulantes diferentes que serán los siguientes: glutaraldehído, formaldehído y la enzima transglutaminasa. Para un análisis más completo se realizarán ensayos a diferentes concentraciones de reticulante, obteniendo así 5 reactores por cada uno de los reticulantes.

6.2. PROCESO DE RETICULACIÓN

6.2.1. Agentes reticulantes usados

En el presente capítulo se realizan microcápsulas de gelatina-goma arábica utilizando tres agentes reticulantes diferentes para poder realizar el estudio de la cinética de reacción de cada uno de ellos. Como ya se ha mencionado anteriormente, existen unos parámetros con los que escoger el más adecuado para el proceso, aunque la mejor manera de saber cuál es más efectivo es el método empírico. En este caso se escogieron tres reticulantes que ya habían sido probados para este tipo de microcápsulas y ya se conocía que actuaban bien como agentes reticulantes en estas condiciones.

6.2.1.1. Glutaraldehído

Entre los muchos agentes de reticulación de proteínas disponibles, el glutaraldehído se puede aplicar en muchos campos de la química y ha tenido un gran éxito debido a su alta disponibilidad comercial y su bajo coste, además de su alta reactividad. El glutaraldehído es un compuesto

químico de la familia de los aldehídos, líquido, oleaginoso generalmente incoloro o ligeramente amarillento y de olor acre. Es un compuesto estable sin riesgo de polimerización y es soluble en todas las proporciones en agua y alcohol, así como en disolventes orgánicos. Reacciona rápidamente con grupos amino y es más eficiente que otros aldehídos en la generación térmica y química de reticulaciones estables.

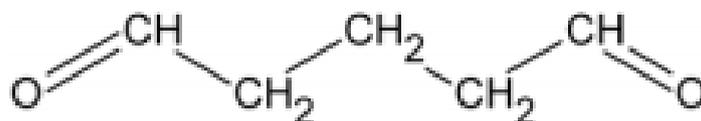


Figura 37. Estructura química del Glutaraldehído.

El glutaraldehído es una cadena de hidrocarburos larga y flexible con dos grupos aldehídos, que permiten una reticulación más eficiente. En las soluciones acuosas está presente en forma de monómeros y polímeros con un tamaño variable. Los grupos reactivos del glutaraldehído reaccionan con los grupos amino libres que tienen las proteínas [114], y de esta manera se crean los enlaces reticulados intra e inter-moleculares. La estructura y composición de las paredes de coacervado complejo afectan en gran medida a las propiedades de liberación del encapsulado. Por lo tanto, un conocimiento detallado de las estructuras exactas de los enlaces cruzados, así como del número y tipo de enlaces cruzados presentes es crucial para controlar las propiedades de liberación de los coacervados. Para que el glutaraldehído actúe de manera eficaz el pH tiene que tener un valor aproximado de 9.

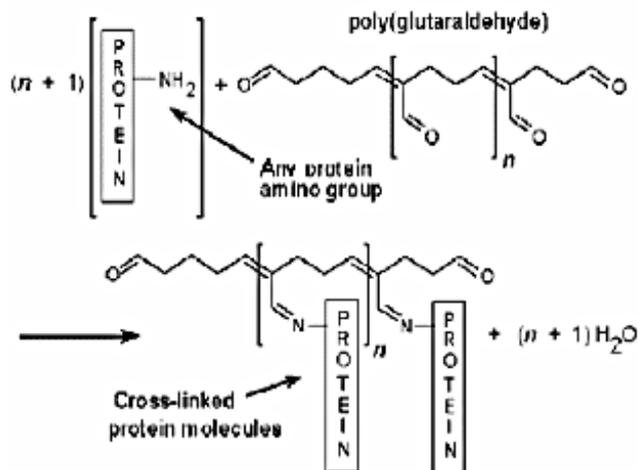


Figura 38. Actuación del glutaraldehído con las proteínas [115].

La mayor desventaja del glutaraldehído es que, aunque menos que el formaldehído, se trata de un producto tóxico.

6.2.1.2. Formaldehído

El formaldehído o metanal es un compuesto químico, más específicamente un aldehído (el más simple de ellos) altamente volátil y muy inflamable, de fórmula $H_2C=O$. Este reticulante ha sido el que más se ha utilizado y estudiado durante décadas debido a que hace que el entrecruzamiento de proteínas se realice de manera sencilla y tenga una gran eficacia gracias a las reacciones de condensación que actúan sobre los grupos reactivos de aminoácidos de cadena lateral. Los estudios indican que la manera más frecuente de reticulación formada por el formaldehído en el colágeno se produce mediante el átomo de nitrógeno al final de la cadena lateral de la lisina y el átomo de nitrógeno de un enlace peptídico. El grupo aldehído puede reaccionar con nitrógeno y algunos otros átomos de proteínas formando un puente de metileno ($-CH_2-$) entre dos átomos reactivos de las proteínas que estén muy próximos entre sí, consiguiendo así la reticulación. También puede reaccionar con otras moléculas (hidratos de carbono, lípidos, ácidos nucleicos) que al reaccionar quedan atrapadas en una matriz de proteínas reticuladas. Para que el formaldehído actúe de manera eficaz el pH tiene que estar entre 8 y 9.

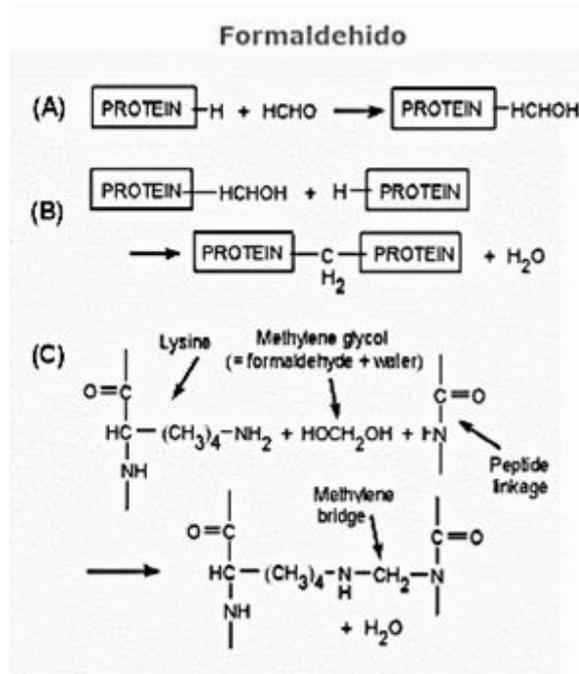


Figura 39. Reacciones del formaldehído con proteínas[93].

La principal problemática de utilizar formaldehído como reticulante es que es un producto muy tóxico al combinarse con átomos ionizados negativamente libres en el ambiente bajo condiciones normales de presión y temperatura. Está catalogado como probable cancerígeno en seres humanos en situaciones de exposición extraordinariamente alta o prolongada.

6.2.1.3. Transglutaminasa

La transglutaminasa (referida en este estudio como TG) es una transferasa que tiene el nombre sistemático de proteína-glutamina γ glutamiltransferasa. La transglutaminasa cataliza la polimerización y la unión cruzada o el entrecruzamiento de proteínas. Esta enzima cataliza la reacción de transferencia entre los grupos γ -carboxiamida de residuos de glutamina en proteínas, péptidos y en varias aminas primarias. Cuando un grupo ϵ -amino de lisina actúa como receptor de grupos acil, resulta en una polimerización y un entrecruzado molecular de las proteínas vía formación de enlaces ϵ -(γ glutamil) lisina. Esto ocurre a través del intercambio de los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina por amonio en el grupo carboxiamida del residuo de la glutamina en la molécula de proteínas. En la ausencia de aminas primarias, el agua puede tomar el papel del aceptor de grupos acil, resultando en la desaminación de los grupos γ -carboxiamida de residuos de glutamina para formar ácido glutámico. Los enlaces covalentes formados por la transglutaminasa son estables a los cambios de la temperatura. Para que la transglutaminasa actúe de manera eficaz el pH tiene que ser de 6 aproximadamente [116]. Una de las grandes ventajas de este reticulante respecto al gluutaraldehído y al formaldehído es que al ser una enzima de origen animal no es tóxica y es completamente inofensiva para la salud.

Los principales efectos de la transglutaminasa en las proteínas son los siguientes:

- Facilita viscosidad y estabilidad en la emulsión.
- Favorece la capacidad de formación de gel.
- Aporta resistencia física y estabilidad térmica.

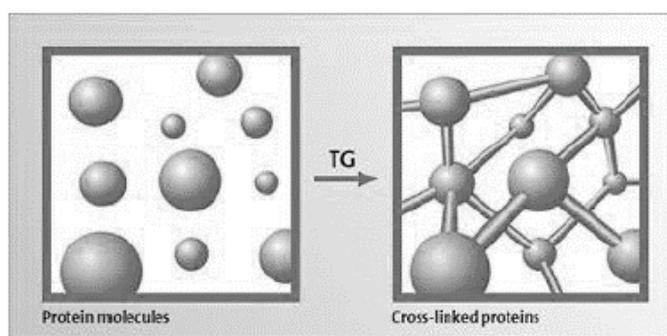


Figura 40. Actuación de la TG [117].

6.2.2. Cinética de reticulación

Anteriormente se ha explicado en que consiste la cinética de cualquier reacción. En este apartado se desarrollará el comportamiento químico específico que se produce en la reacción de reticulación.

6.2.2.1. Método de cálculo utilizado

Para la finalidad de este proyecto el enfoque experimental más obvio para la determinación de la difusividad en la reacción estudiada es medir directamente la velocidad de absorción del reticulante, ya que sólo aquellas moléculas de reticulante que se observan en la microestructura formada podrán reaccionar. Para ello se ha fundamentado el estudio en la siguiente premisa: para una partícula esférica sometida a un cambio en la concentración en la superficie externa en el tiempo cero, la aproximación al equilibrio, en condiciones de control de la difusión, viene dada por:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp\left(-\frac{n^2 \pi^2 D t}{R^2}\right) \quad \text{Ecuación 14}$$

Donde,

M_t = Concentración de la especie reticulante a lo largo del tiempo (la que queda en el baño)

M_∞ = Concentración de la especie reticulante que queda en el medio cuando el sistema ha alcanzado el equilibrio entre absorción and desorción

La ecuación 14 presenta dos posibles simplificaciones dependiendo del rango de tiempos que se consideren.

Se pueden diferenciar dos ecuaciones distintas para los tiempos cortos y los tiempos largos.

- Tiempos cortos:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \frac{6}{R} \sqrt{\frac{Dt}{\pi}} \quad \text{Ecuación 15}$$

- Tiempos largos:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{6}{\pi} \exp\left(-\frac{\pi^2 \cdot Dt}{R^2}\right) \quad \text{Ecuación 16}$$

7.3. PROCESO EXPERIMENTAL

6.3.1. Agente reticulante: Glutaraldehído

1. Se prepara la disolución 1: En un vaso de precipitados de 100 ml se añaden 4 g de gelatina y 50 ml de agua destilada. Se lleva a un agitador magnético, se introduce la mosca en el vaso de precipitados y se pone a agitar a 600 rpm y a una temperatura de 50°C.
2. Se prepara la disolución 2: En un vaso de precipitados de 50 ml se añade la cantidad que corresponde a cada tensioactivo y 50 ml de agua destilada. Se lleva a un agitador magnético y se pone a agitar a una velocidad de 600 rpm. Cuando la mezcla sea homogénea se introducen 10 ml de fragancia en el vaso de precipitados y se deja agitar hasta que la mezcla sea uniforme.

3. Cuando la disolución 1 esté a 50°C y la disolución 2 sea homogénea, se vierte el contenido de la disolución 2 en la 1 y se agita a 600 rpm.
4. Se prepara la disolución 3, en un vaso de precipitados de 100 ml se añaden 4 g de goma arábica y 100 ml de agua destilada. Se lleva a un agitador magnético y se agita a 900 rpm y a una temperatura de 50°C.
5. Cuando ambas disoluciones sean homogéneas y estén a 50°C, se vierte el contenido de ambas en el reactor, del cual previamente se ha debido calentar el baño hasta 50°C, y se agita a la velocidad deseada (300, 600 o 900 rpm).
6. Tras unos 2 minutos de agitación en el reactor se procede a regular el pH hasta un valor de 4. Para realizar este paso se utiliza un pH-metro y HCl 37%.
7. Transcurridos 90 minutos se debe apagar el baño y disminuir la temperatura hasta 8°C.
8. Cuando haya pasado 1 hora desde la disminución de temperatura se debe regular el pH hasta un valor de 9. Para realizar este paso se utiliza un pH-metro y NaOH.
9. Después de regular el pH se añade la concentración deseada de una disolución de glutaraldehído al 50%.
10. Al añadir el glutaraldehído se deja de 3 a 5 minutos agitando y se saca la primera muestra. Inmediatamente se lee su absorbancia con el ultravioleta.
11. Durante la primera hora y media, cada 20 minutos se saca una muestra y se lee la absorbancia.
12. Finalmente se deja el reactor en agitación durante toda la noche y al día siguiente se saca la última muestra, de la cual también se lee su absorbancia.

6.3.2. Agente reticulante: Formaldehído

Se procede prácticamente igual que en el protocolo anterior. La única diferencia reside en el valor del segundo pH en el paso 8:

8. Cuando haya pasado 1 hora desde la disminución de temperatura se deberá regular el pH hasta un valor entre 8-9. Para realizar este paso se utiliza NaOH para la regulación del pH.

6.3.3. Agente reticulante: Transglutaminasa

Se procede prácticamente igual que en el protocolo anterior. La única diferencia reside en el valor del segundo pH en el paso 8:

8. Cuando haya pasado 1 hora desde la disminución de temperatura se deberá regular el pH hasta un valor de aproximadamente 6. Para realizar este paso se utiliza un pH-metro y NaOH para la regulación del pH.

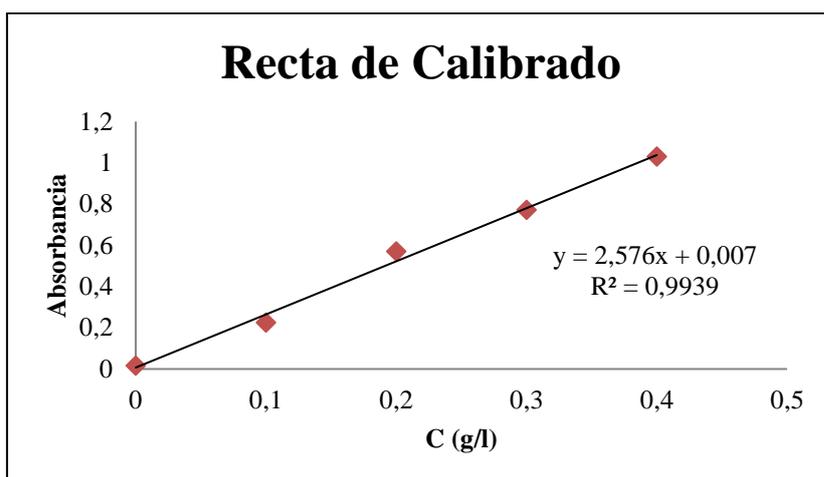
6.4. CÁLCULOS Y RESULTADOS

6.4.1. Rectas de calibrado

Inicialmente se determinarán las rectas de calibrado que permitirán relacionar la absorbancia real con la concentración de reticulante en el tiempo. Para la construcción de las rectas de calibrado se preparan disoluciones con diferentes concentraciones de reticulante y se mide la absorbancia mediante el ultravioleta. Se ha construido una recta de calibrado para cada una de las concentraciones estudiadas. Así pues se puede construir un gráfico donde Y es la absorbancia y X la concentración. De esta manera se obtiene la ecuación de recta que relaciona concentración de reticulante y absorbancia para las diferentes concentraciones que se estudian.

Para saber la absorbancia que tienen las disoluciones de los reticulantes que servirán para hacer las rectas de calibrado se ha utilizado un espectrofotómetro UV-VIS.

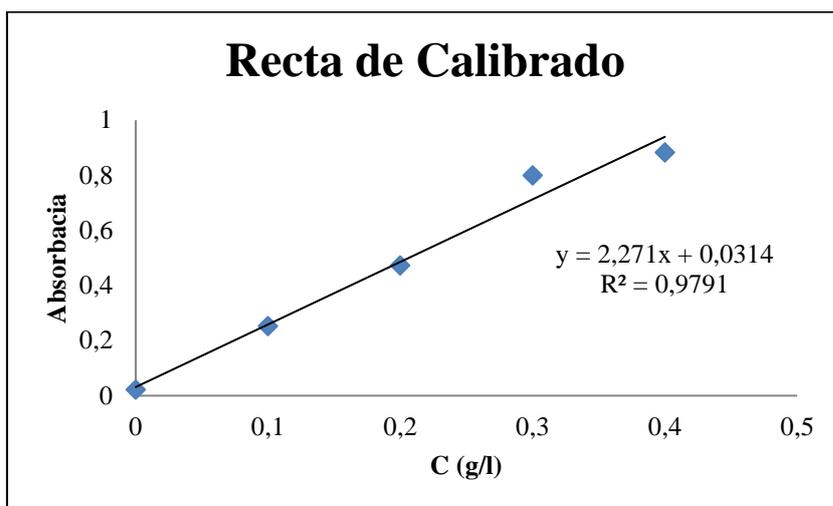
6.4.1.1. Agente reticulante: Glutaraldehído



Glutaraldehído	
C (g/l)	Abs
0	0,015
0,1	0,225
0,2	0,570
0,3	0,771
0,4	1,030

Figura 41. Recta de calibrado para la reticulación con glutaraldehído.

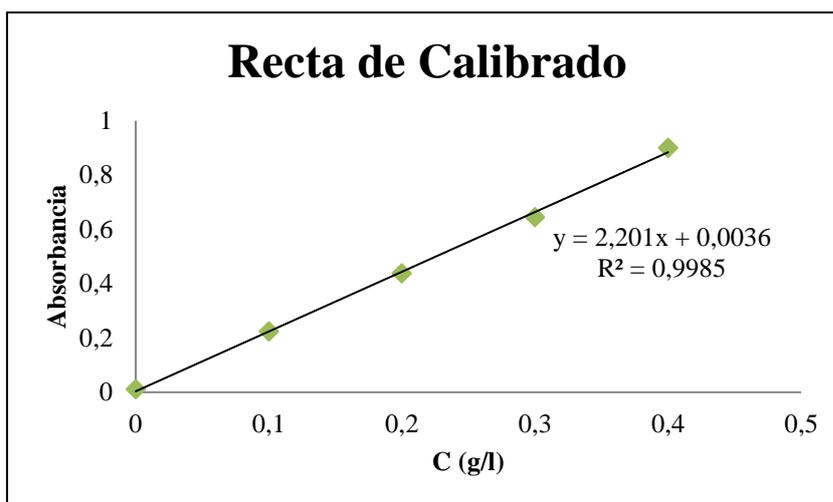
6.4.1.2. Agente reticulante: Transglutaminasa



Transglutaminasa	
C (g/l)	Abs
0	0,021
0,1	0,252
0,2	0,473
0,3	0,799
0,4	0,883

Figura 42. Recta de calibrado para la reticulación con transglutaminasa.

6.4.1.3. Agente reticulante: Formaldehído



Formaldehído	
C (g/l)	Abs
0	0,011
0,1	0,224
0,2	0,438
0,3	0,645
0,4	0,901

Figura 43. Recta de calibrado para la reticulación con 15 g de transglutaminasa.

6.4.2. Tamaño de las microcápsulas

Para poder realizar el estudio de la cinética de reticulación es necesario saber el tamaño que tienen las microcápsulas formadas. Para ello se ha utilizado un programa, llamado Imagej, que permite medir la distancia entre dos puntos según la escala que se quiera. Para cada ensayo se ha medido el diámetro de 100 microcápsulas de las imágenes obtenidas mediante el microscopio óptico y después se ha calculado el radio medio (Rm).

Los resultados obtenidos son los siguientes:

	GLUTARALDEHÍDO	TRANSGLUTAMINASA	FORMALDEHIDO
	Rm (µm)	Rm (µm)	Rm (µm)
1 gramo	11,29	11,85	10,71
4 gramos	11,46	10,64	13,05
7 gramos	10,94	11,55	10,95
10 gramos	12,59	19,12	13,20
15 gramos	11,50	12,44	9,17

Tabla 26. Tabla resumen de los diámetros y radios medios de los lotes reticulados a diferentes concentraciones de glutaraldehído y formaldehído.

6.4.3. Cinética de reticulación

6.4.3.1. **Glutaraldehído**

6.4.3.1.1. Reactor con 1 gramo de glutaraldehído en 200 ml de agua

Como ya se ha comentado anteriormente el objetivo de este apartado de la tesis es estudiar la cinética de reacción del reticulante en el proceso de formación de microcápsulas. Para ello se necesita conocer la concentración en el tiempo del reticulante que va reaccionando, así pues, se fueron cogiendo muestras del reactor cada cierto tiempo. En los estudios realizados se fijó el tiempo de reacción de las microcápsulas en hora y media, por este motivo durante esa primera hora y media de reacción las muestras se sacaron en intervalos de 20 minutos. Finalmente se sacó una última muestra a la que se denomina muestra en tiempo infinito, extraída al día siguiente.

Una vez obtenida la absorbancia real de cada muestra y teniendo las rectas de calibrado para cada rango de concentración, se puede pasar de absorbancia real a concentración de una manera sencilla.

$$\text{Recta de calibrado : } y = 2,576 x + 0,007$$

$$13,760 = (2,6135 * x) + 0,007 = 4,691 \text{ g/l}$$

Ya se pueden calcular las diferentes concentraciones en el tiempo de reticulante. Los resultados de este reactor se muestran en la siguiente tabla:

t (min)	Dilución	Factor	Abs exp	Abs real	C glut (g/l)
3	1 en 18	18	0,764	13,760	4,691
23	1 en 16	16	0,626	10,020	3,260
43	1 en 10	10	0,699	6,988	2,099
63	1 en 10	10	0,691	6,912	2,070
83	1 en 3	3	0,808	2,426	0,354
103	1 en 3	3	0,752	2,257	0,289
1000	1 en 2	2	0,778	1,557	0,021

Tabla 27. Absorbancia obtenida durante la reticulación con 1 g de glutaraldehído

Sabiendo la concentración de reticulante que hay en el baño, y al multiplicarla por los mililitros de agua se obtiene la masa de reticulante que queda en el baño. Para saber qué cantidad de reticulante ha sido transferida a las microcápsulas (M_t) sólo se tiene que restar la masa de este que queda en el baño (M_{glut}) a la masa de reticulante que se ha añadido inicialmente (M_o).

t (min)	M glut baño (g)	$M_t = M_o - M_{glut}$
3	0,986	0,014
23	0,777	0,223
43	0,542	0,458
63	0,536	0,464
83	0,188	0,812
103	0,175	0,825
1000	0,120	0,880

Tabla 28. Masa de glutaraldehído presente en el baño y en las microcápsulas durante la reticulación con 1 g de glutaraldehído.

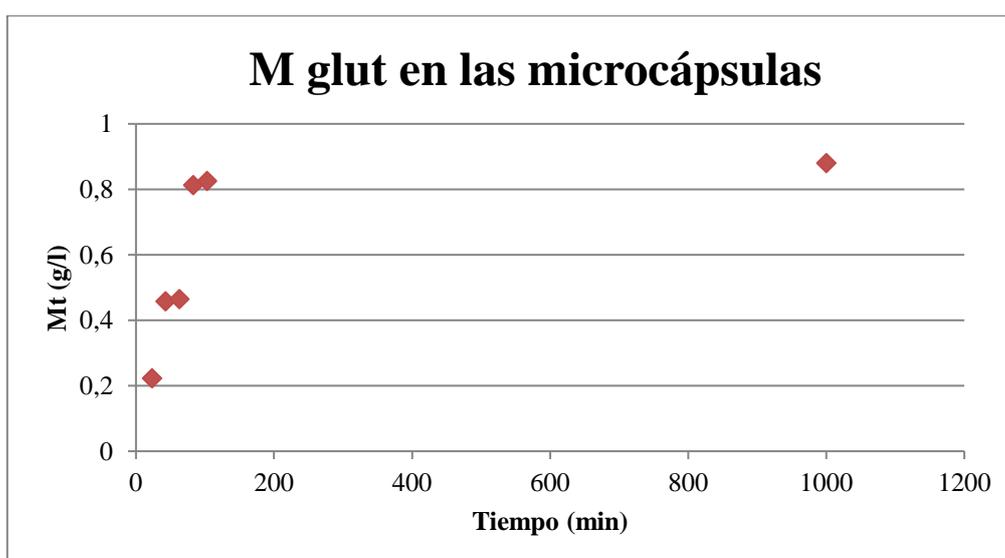


Figura 44. Evolución de la masa de glutaraldehído en las microcápsulas durante la reticulación con 1 g de glutaraldehído.

Como ya se ha comentado en el apartado donde se trataba de manera teórica la difusividad, para una partícula esférica isotérmica sometida a un cambio en la concentración del sorbato en la superficie externa en el tiempo cero, la aproximación al equilibrio, en condiciones de control de la difusión, viene dada por la siguiente ecuación:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp\left(\frac{-n^2\pi^2 Dt}{R^2}\right) \quad \text{Ecuación 17}$$

Para tiempos cortos, se puede utilizar la fórmula simplificada:

- Tiempos cortos:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \frac{6}{R} \cdot \sqrt{\frac{Dt}{\pi}} \quad \text{Ecuación 18}$$

Si se construye una gráfica donde se represente $\frac{M_t}{M_\infty}$ en función de \sqrt{t} se obtiene una gráfica creciente de forma logarítmica. Esto se debe a que la ecuación tiene la forma de recta, por tanto, se ha despejado t de los otros factores, obteniendo $\frac{M_t}{M_\infty}$ como Y y por otra parte \sqrt{t} como X.

t (min)	Mt/M _∞	t ^{1/2}
3	0,016	1,732
23	0,253	4,796
43	0,520	6,557
63	0,527	7,937
83	0,923	9,110
103	0,938	10,149
1000	1,000	31,623

Tabla 29. Cálculo de $\frac{M_t}{M_\infty}$ y \sqrt{t} durante la reticulación con 1 g de glutaraldehído.

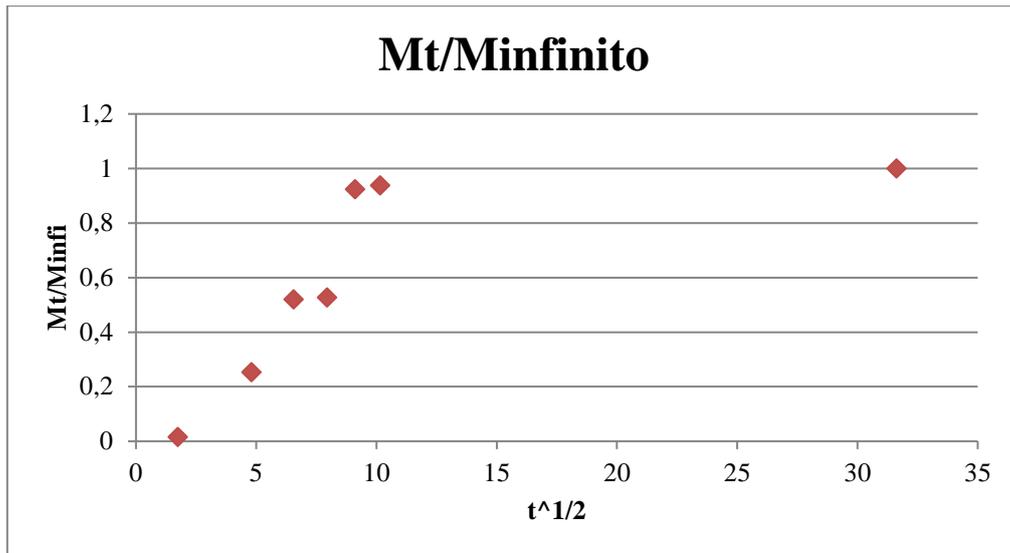


Figura 45. Evolución de $\frac{M_t}{M_{\infty}}$ en función de \sqrt{t} durante la reticulación con 1 g de glutaraldehído.

Se considera la primera parte de la reacción que tiene forma de recta, en este caso, los seis primeros puntos de la gráfica anterior. Si se representan estos puntos se puede obtener una ecuación para la recta que se busca. En este caso la ecuación es la siguiente:

$$y = 0,1016 \cdot x - 0,1798$$

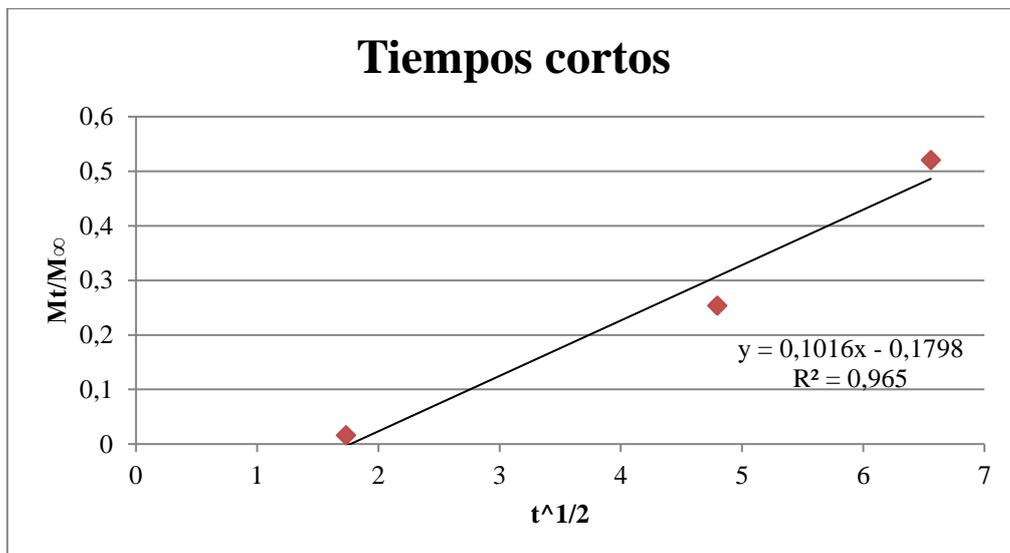


Figura 46. Representación de $\frac{M_t}{M_{\infty}}$ en función de \sqrt{t} durante la reticulación con 1 g de glutaraldehído para tiempos cortos

La ecuación de la recta representada anteriormente equivale a la ecuación de los tiempos cortos (Ecuación 18), así pues, se puede hallar la pendiente de esta, que corresponde al factor:

$$\frac{M_t}{M_{\infty}} = \frac{6}{R} \cdot \sqrt{\frac{D}{\pi}} \cdot \sqrt{t} \quad \text{Ecuación 19}$$

Recordando la ecuación de la recta anterior se puede substituir el valor de la pendiente y así hallar el coeficiente de difusión. Para realizar este cálculo se necesita saber el radio medio de las microcápsulas tratadas, que se consigue mediante el programa ImageJ. En este caso el radio medio de las microcápsulas producidas ha sido:

R (μm)
11,29

Con todos estos datos se puede proceder a la realización del cálculo del coeficiente de difusión.

$$\begin{cases} y = 0,1016 \cdot x \\ m = \frac{6}{R} \cdot \sqrt{\frac{D}{\pi}} \end{cases} \Rightarrow 0,1016 = \frac{6}{R} \cdot \sqrt{\frac{D}{\pi}}$$

Donde $m = \frac{M_t}{M_\infty}$.

El método de cálculo es el mismo para los demás reactores de glutaraldehído.

6.4.3.1.2. Resultados obtenidos utilizando glutaraldehído como reticulante

GLUTARALDEHÍDO			
Glutaraldehído (g)	m	R (μm)	D (m²/min)
1	0,1016	11,29	3,003·10 ⁻⁷
4	0,1086	11,46	3,258·10 ⁻⁷
7	0,0967	10,94	2,770·10 ⁻⁷
10	0,0942	12,59	3,105·10 ⁻⁷
15	0,1486	11,50	4,474·10 ⁻⁷

Tabla 30. Cálculo del coeficiente de difusión para todas las reticulaciones llevadas a cabo con glutaraldehído

6.4.3.2. **Transglutaminasa**

El procedimiento en el caso de usar la transglutaminasa como reticulante es también igual al explicado anteriormente con el glutaraldehído.

6.4.3.2.1. Reactor con 1 gramo de transglutaminasa en 200ml de agua

t (min)	Dilución	Factor	Abs exp	Abs real	C tg (g/l)
1	1 en 18	18	0,624	11,232	4,932
21	1 en 14	14	0,661	9,257	4,062
41	1 en 14	14	0,622	8,707	3,820
61	1 en 14	14	0,568	7,948	3,486
81	1 en 10	10	0,461	4,611	2,017
101	1 en 10	10	0,410	4,095	1,789
1000	1 en 10	10	0,583	5,831	2,554

Tabla 31. Absorbancia obtenida durante la reticulación con 1 g de transglutaminasa

Para saber qué cantidad de reticulante ha sido transferida a las microcápsulas (M_t) sólo se tiene que restar la masa de este que queda en el baño (M_{tg}) a la masa de reticulante que se ha añadido inicialmente (M_o).

t (min)	M tg baño (g)	$M_t = M_o - M_{tg}$
1	0,986	0,014
21	0,812	0,188
41	0,764	0,236
61	0,697	0,303
81	0,403	0,597
101	0,358	0,642
1000	0,511	0,489

Tabla 32. Masa de transglutaminasa presente en el baño y en las microcápsulas durante la reticulación con 1 g de transglutaminasa.

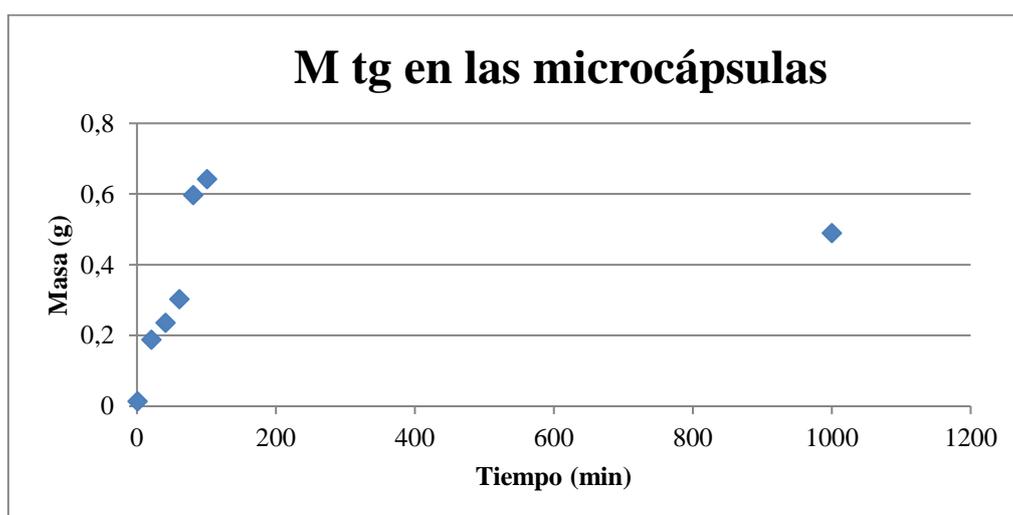


Figura 47. Evolución de la masa transglutaminasa en las microcápsulas durante la reticulación con 1 g de transglutaminasa

t (min)	Mt/M _∞	t ^{1/2} (s)
1	0,021	1,000
21	0,292	4,583
41	0,367	6,403
61	0,472	7,810
81	0,929	9,000
101	1,000	10,050
1000	0,762	31,623

Tabla 33. Cálculo de $\frac{M_t}{M_\infty}$ y \sqrt{t} durante la reticulación con 1 g de transglutaminasa.

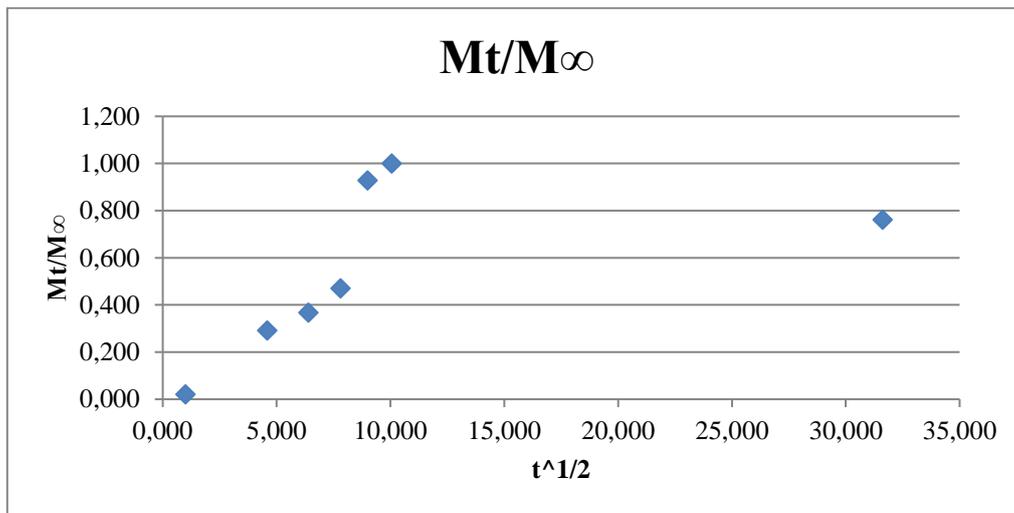


Figura 48. Evolución de $\frac{M_t}{M_\infty}$ en función de \sqrt{t} durante la reticulación con 1 g de transglutaminasa.

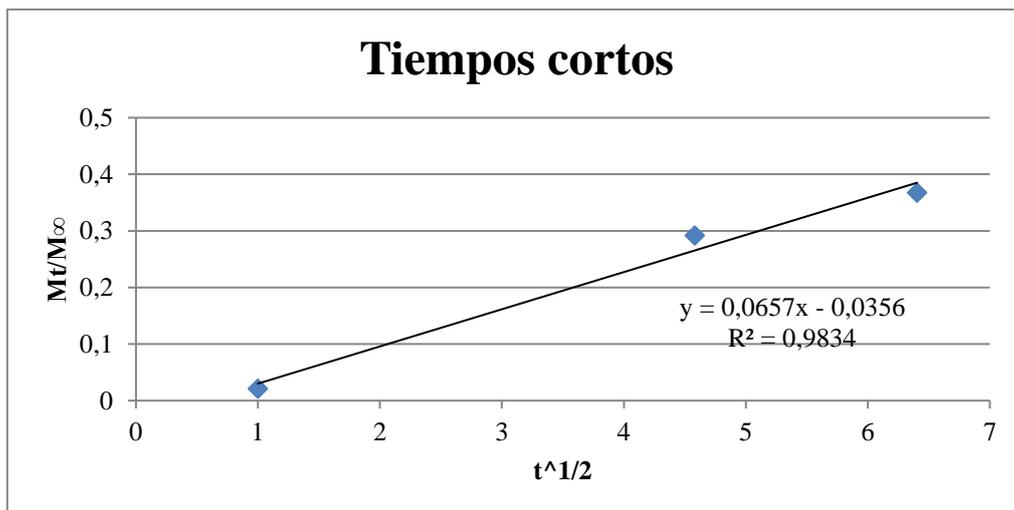


Figura 49. Representación de $\frac{M_t}{M_\infty}$ en función de \sqrt{t} durante la reticulación con 1 g de transglutaminasa para tiempos cortos.

R (μm)
11,85

Con todos estos datos se puede proceder a la realización del cálculo del coeficiente de difusión.

$$\begin{cases} y = 0,0657 \cdot x \\ m = \frac{6}{R} \cdot \sqrt{\frac{D}{\pi}} \end{cases} \rightarrow 0,0657 = \frac{6}{R} \cdot \sqrt{\frac{D}{\pi}}$$

6.4.3.2.2. Resultados obtenidos utilizando transglutaminasa como reticulante

TRANSGLUTAMINASA			
Transglutaminasa (g)	m	R (μm)	D (m²/min)
1	0,0657	11,85	2,038 · 10 ⁻⁷
4	0,0767	10,64	2,126 · 10 ⁻⁷
7	0,0710	11,55	2,147 · 10 ⁻⁷
10	0,0461	19,12	2,307 · 10 ⁻⁷
15	0,0448	12,44	1,459 · 10 ⁻⁷

Tabla 34. Cálculo del coeficiente de difusión para todas las reticulaciones llevadas a cabo con transglutaminasa.

6.4.3.3. Formaldehído

El procedimiento en el caso de usar el formaldehído como reticulante es también igual al explicado anteriormente con el glutaraldehído y transglutaminasa.

6.4.3.3.1. Reactor con 1 gramo de formaldehído en 200 ml de agua

t (min)	Dilución	Factor	Abs exp	Abs real	C tg (g/l)
3	1 en 20	20	0,469	9,375	4,258
23	1 en 20	20	0,351	7,015	3,186
43	1 en 14	14	0,450	6,303	2,862
63	1 en 10	10	0,549	5,490	2,493
83	1 en 4	4	0,660	2,64	1,198
103	1 en 4	4	0,505	2,02	0,916
1000	1 en 2	2	0,385	0,769	0,348

Tabla 35. Absorbancia obtenida durante la reticulación con 1 g de formaldehído.

Para saber qué cantidad de reticulante ha sido transferida a las microcápsulas (Mt) solo se tiene que restar la masa de este que queda en el baño (Mglut) a la masa de reticulante que se ha añadido inicialmente (Mo).

t (min)	M tg(g) baño	Mt= Mo-Mtg
3	0,852	0,148
23	0,637	0,363
43	0,572	0,428
63	0,499	0,501
83	0,240	0,760
103	0,183	0,817
1000	0,070	0,930

Tabla 36. Masa de formaldehído presente en el baño y en las microcápsulas durante la reticulación con 1 g de formaldehído.

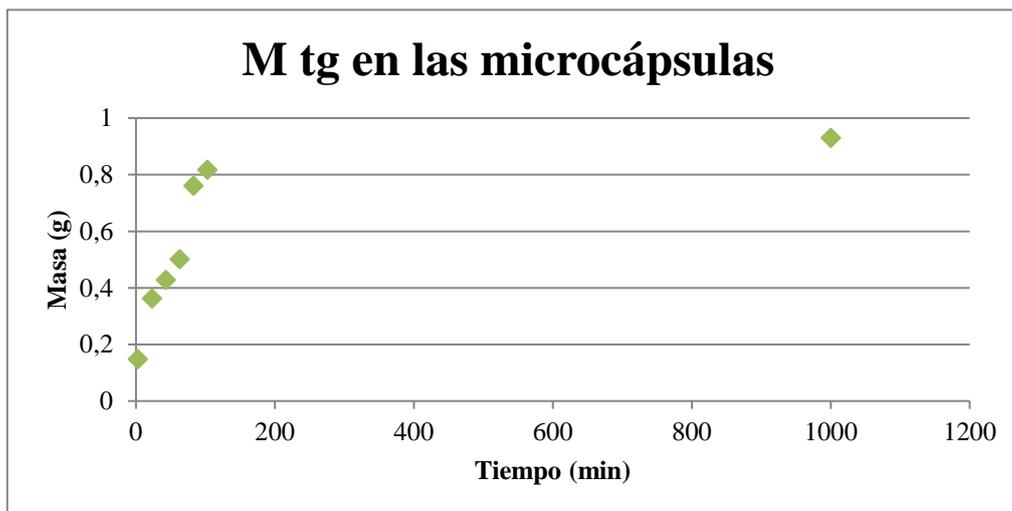


Figura 50. Evolución de la masa de formaldehído en las microcápsulas durante la reticulación con 1 g de formaldehído.

t (min)	Mt/M _∞	t ^{1/2} (s)
1	0,160	1,732
21	0,390	4,796
41	0,460	6,557
61	0,539	7,937
81	0,817	9,110
101	0,878	10,149
1000	1,000	31,623

Tabla 37. Cálculo de $\frac{M_t}{M_\infty}$ y \sqrt{t} durante la reticulación con 1 g de formaldehído.

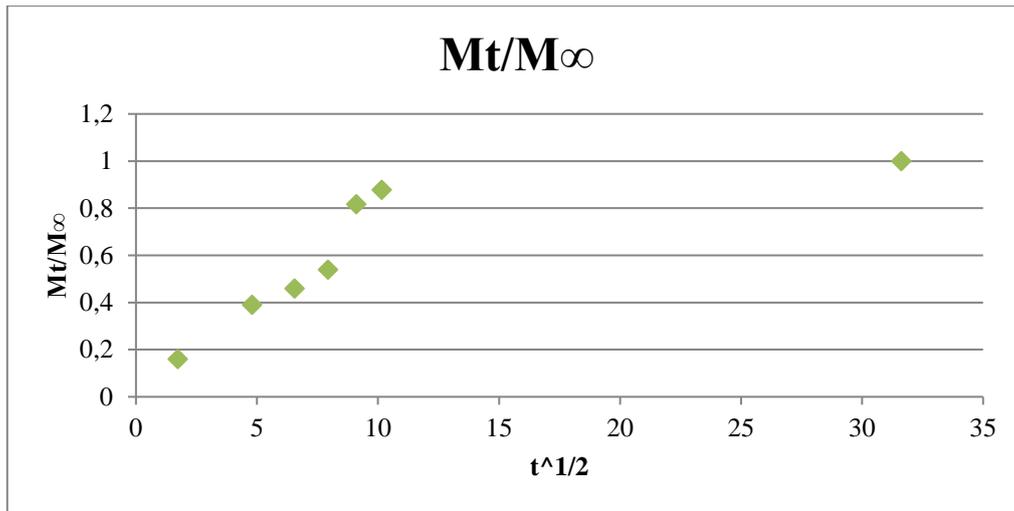


Figura 51. Evolución de $\frac{M_t}{M_\infty}$ en función de \sqrt{t} durante la reticulación con 1 g de formaldehído.

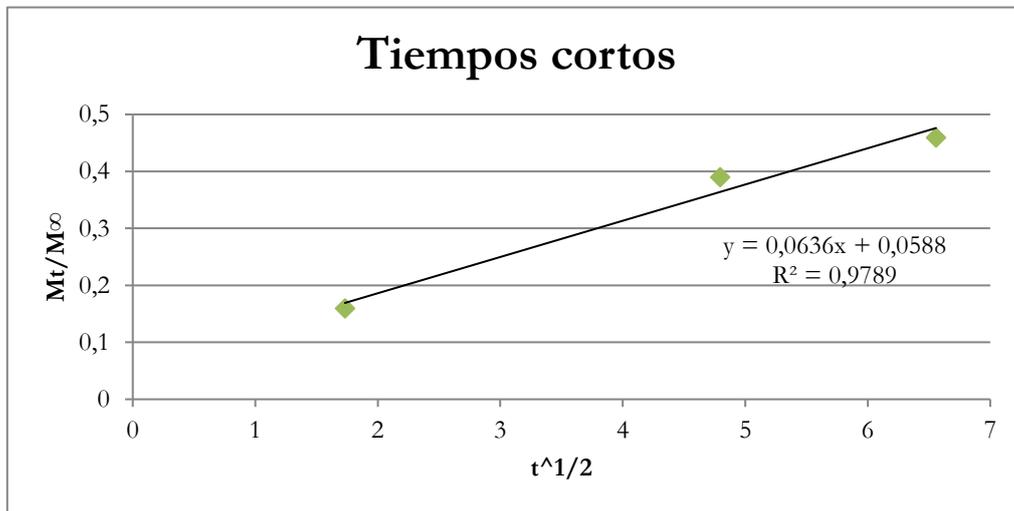


Figura 52. Representación de $\frac{M_t}{M_\infty}$ en función de \sqrt{t} durante la reticulación con 1 g de formaldehído para tiempos cortos.

El radio medio de las microcápsulas tratadas se consigue mediante el programa ImageJ. En este caso el radio medio de las microcápsulas obtenidos ha sido:

R (μm)
10,71

Con todos estos datos se puede proceder a la realización del cálculo del coeficiente de difusión:

$$\begin{cases} y = 0,0636 \cdot x \\ m = \frac{6}{R} \cdot \sqrt{\frac{D}{\pi}} \end{cases} \Rightarrow 0,0636 = \frac{6}{R} \cdot \sqrt{\frac{D}{\pi}}$$

6.4.3.3.2. Resultados obtenidos utilizando formaldehído como reticulante

FORMALDEHIDO			
Formaldehido (g)	m	R (μm)	D (m²/min)
1	0,0636	10,71	1,973·10 ⁻⁷
4	0,0783	13,05	2,182·10 ⁻⁷
7	0,1287	10,95	3,891·10 ⁻⁷
10	0,0569	13,20	2,848·10 ⁻⁷
15	0,0651	9,07	8,370·10 ⁻⁸

Tabla 38. Cálculo del coeficiente de difusión para todas las reticulaciones llevadas a cabo con formaldehído.

6.4.4. Morfología de las microcápsulas obtenidas

Para comprobar que las microcápsulas se formaron correctamente, se observaron muestras de cada uno de los reactores en un microscopio óptico. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

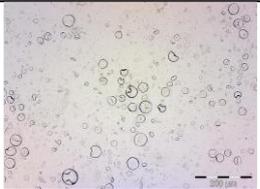
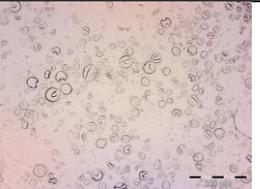
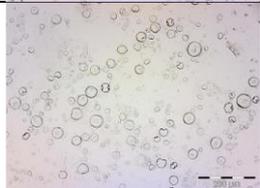
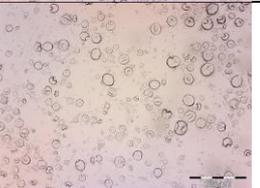
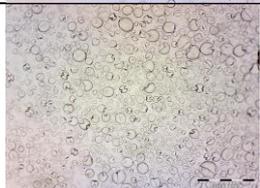
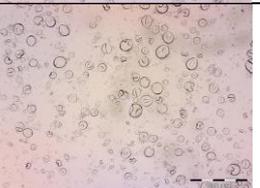
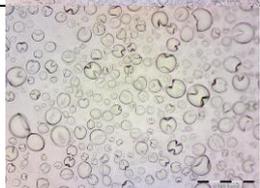
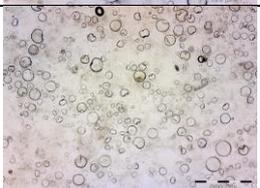
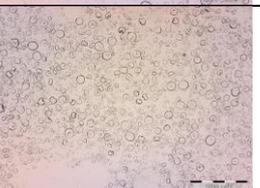
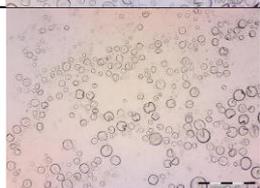
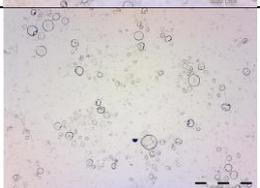
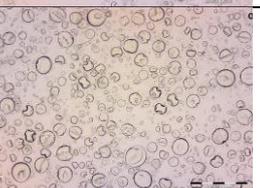
Cantidad de reticulante (g)	Reticulante		
	Glutaraldehído	Transglutaminasa	Formaldehído
1			
4			
7			
10			
15			

Tabla 39. Morfología de las microcápsulas reticuladas mediante el uso de formaldehído, glutaraldehído y transglutaminasa

Como puede verse en la Tabla 39 con el uso de cualquiera de los tres agentes reticulantes se obtienen microcápsulas de morfología esférica sin la presencia de aglomeraciones. En los casos en que las microcápsulas han sido reticuladas con formaldehído y glutaraldehído, estas presentan una distribución de tamaño similar y estrecha a partir de 7 g. En el caso de la transglutaminasa la distribución de tamaño es mucho mayor para todas las cantidades utilizadas.

6.5. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES

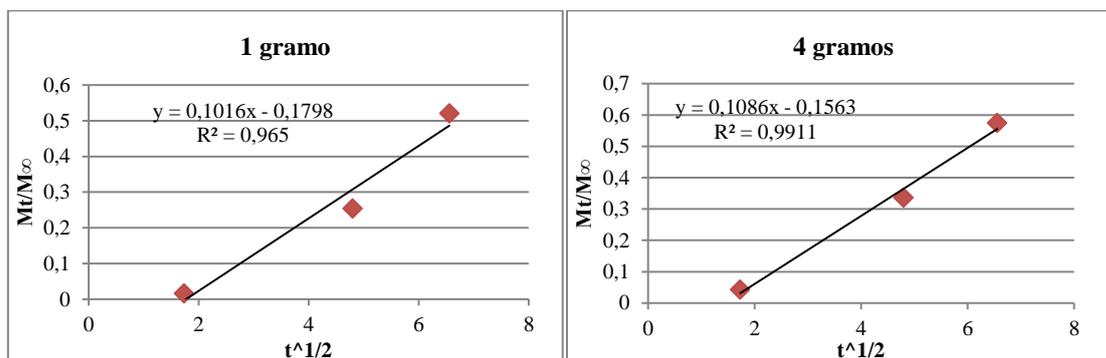
6.5.1. Concentración y cinética de reticulación

6.5.1.1. Glutaraldehído

Observando los resultados obtenidos se puede concluir que, en todos los casos estudiados, la concentración del agente reticulante en el medio va disminuyendo con el tiempo y que el último valor en el infinito, que correspondería al tiempo en el cual la reacción ya ha finalizado, es el valor más bajo de concentración excepto en el caso de la transglutaminasa.

El glutaraldehído debe ir disminuyendo su concentración con el tiempo ya que va reaccionando con la pared de las microcápsulas formando parte de esta, y esto se cumple en todos los casos ya que la concentración en el medio cada vez es menor.

Si se representa en un gráfico los valores de $\frac{M_t}{M_\infty}$ en función de \sqrt{t} de las muestras que correspondientes a los primeros 45 minutos de la reacción, se obtiene una ecuación de la recta de la cual se puede analizar la velocidad de consumo del reticulante mediante la pendiente. Los resultados obtenidos son los siguientes:



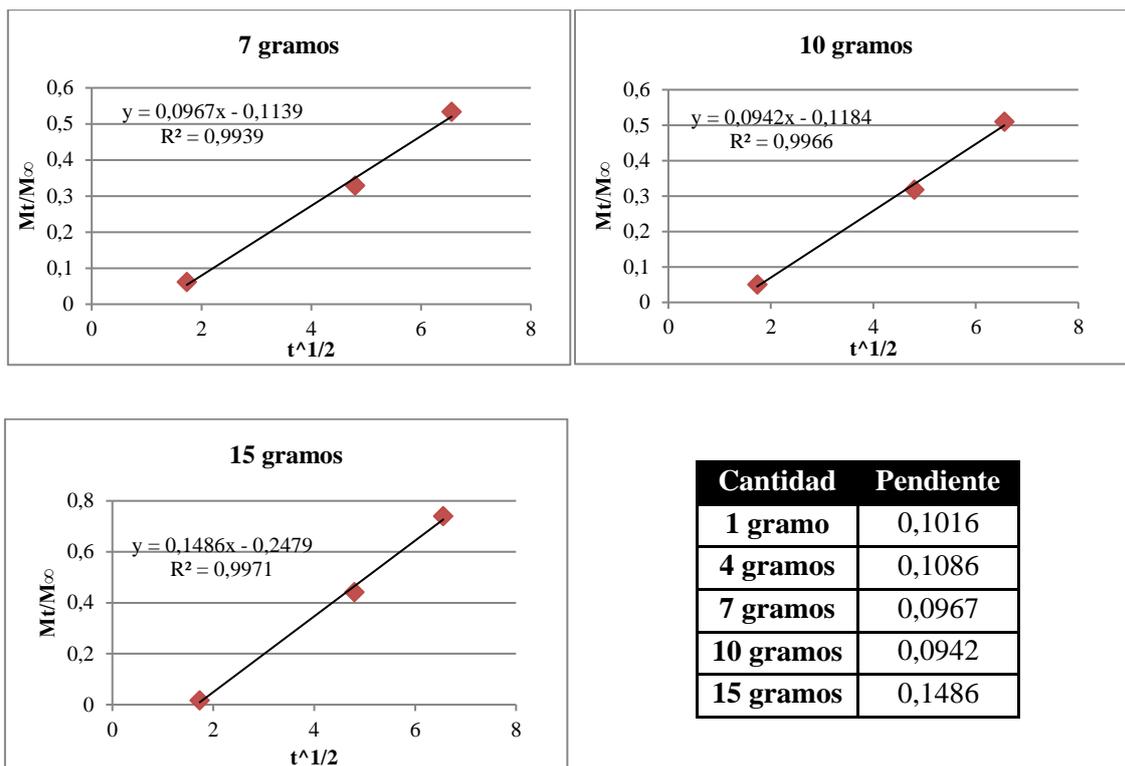


Figura 53. Evolución de $\frac{M_t}{M_\infty}$ en función de \sqrt{t} durante la reticulación mediante el agente reticulante glutaraldehído.

Con el glutaraldehído como reticulante se observa que el consumo del reticulante a tiempos cortos se mantiene casi constante para las cantidades (1, 4, 7, 10 gramos) estudiadas. En el caso del reactor con 15 g este consumo se incrementa.

6.5.1.2. Transglutaminasa

Observando los resultados obtenidos con las diferentes concentraciones de transglutaminasa se puede concluir que, en todos los casos estudiados, la concentración de transglutaminasa en el medio acuoso va disminuyendo con el tiempo a lo largo de los 45 minutos, que es cuando se produce la mayor parte de la reticulación del polímero. En cambio, la concentración del agente reticulante en el medio acuoso medida a tiempo infinito (día siguiente) no es inferior a la última muestra sacada en el día anterior, sino superior. El valor en el infinito, siempre es superior al valor de la quinta y sexta muestra, siendo en algunos mayor incluso que el de la cuarta muestra obtenida. Este resultado no debería ser lógico ya que la absorbancia representa la concentración de transglutaminasa que queda en el baño a medida que se produce la reacción, por tanto, cada vez debería ir disminuyendo y en el tiempo infinito tener el valor más bajo. Pero como ya se ha comentado anteriormente la transglutaminasa es una enzima que actúa como catalizador de la reacción (a pesar de que a la hora de realizar los cálculos no se ha considerado así), por tanto, no reacciona de forma activa en esta, es decir, que cuando la microcápsula no admite más

transglutaminasa esta se libera y vuelve al baño, debido a esto se obtiene un valor en la concentración de reticulante que queda en el medio acuoso superior.

Al igual que en el caso anterior, se representa en un gráfico los valores de $\frac{M_t}{M_\infty}$ en función de \sqrt{t} para los primeros 45 min de reacción obteniendo los siguientes resultados:

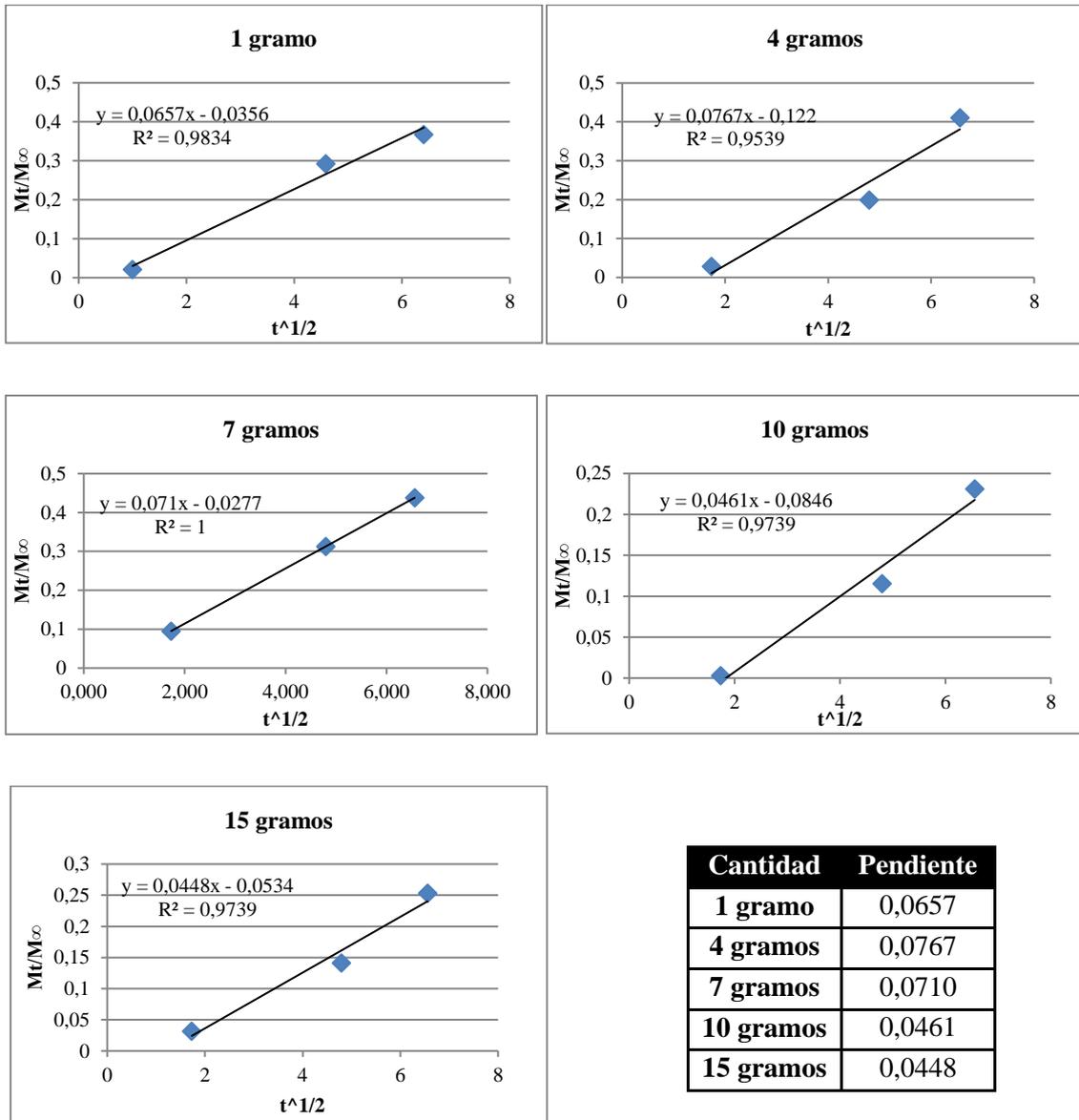


Figura 54. Evolución de $\frac{M_t}{M_\infty}$ en función de \sqrt{t} durante la reticulación mediante el agente reticulante transglutaminasa.

En este caso se observa las concentraciones iniciales más bajas estudiadas maximizan la adsorción de la transglutaminasa en las paredes de la microcápsula y, por tanto, la reticulación de las paredes de la microcápsula siendo en el lote de 4 gramos en el que se consigue un valor máximo. Esta velocidad de adsorción va disminuyendo a medida que se incrementa la concentración inicial de la enzima. Comparando las pendientes obtenidas en el caso de la reticulación con glutaraldehído

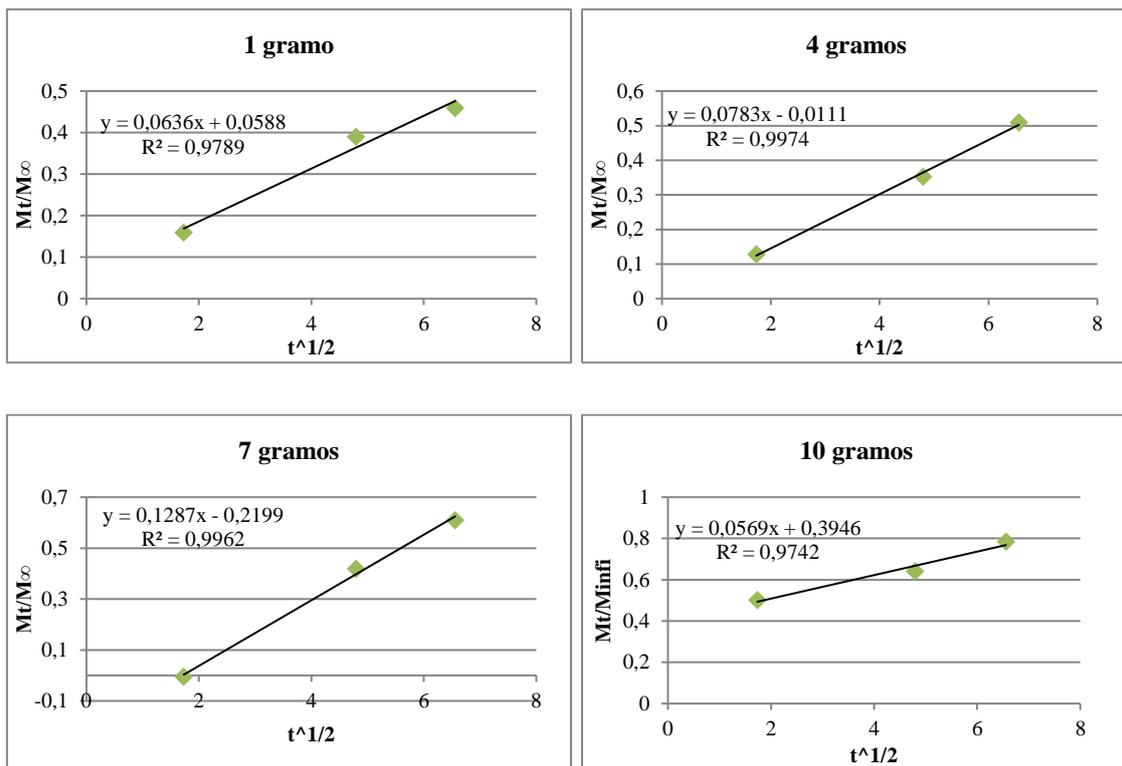
y con transglutaminasa, se puede apreciar que los valores de las pedientes que determinan la velocidad de salida del agente reticulante del medio acuoso son más altas en el caso del glutaraldehído.

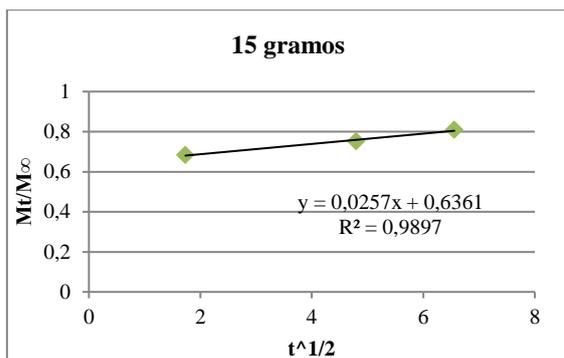
6.5.1.3. Formaldehído

Como en el resto de casos el formaldehído presente en la fase acuosa del sistema va disminuyendo con el paso del tiempo, ya que, al igual que en el caso del glutaraldehído, este reacciona con la pared de la microcápsula llegando a formar parte de ella.

Los resultados obtenidos con el formaldehído como agente reticulante tienen una forma similar a los del glutaraldehído, ya que en todos los casos estudiados, la concentración va disminuyendo con el tiempo de reacción alcanzando a tiempo infinito su valor mínimo, que correspondería al tiempo en el cual la reacción ya ha finalizado.

Al igual que en el caso anterior, se representa en un gráfico los valores de $\frac{M_t}{M_\infty}$ en función de \sqrt{t} para los primeros 45 min de reacción obteniendo los siguientes resultados:





Cantidad	Pendiente
1 gramo	0,0636
4 gramos	0,0783
7 gramos	0,1287
10 gramos	0,0569
15 gramos	0,0257

Figura 55. Evolución de $\frac{M_t}{M_\infty}$ en función de \sqrt{t} durante la reticulación mediante el agente reticulante formaldehído.

Como ocurre en el caso de la transglutaminasa, a medida que aumenta la concentración inicial de formaldehído en el medio, lo hace la velocidad a la que reacciona con la pared de las microcápsulas saliendo del medio acuoso a tiempos cortos, alcanzando su valor máximo en el lote de 7 gramos, disminuyendo esta velocidad progresivamente en los lotes con mayor cantidad de formaldehído (10 y 15 gramos).

6.5.1.4. Generales

De forma general, se puede afirmar que al representar $\frac{M_t}{M_\infty}$ en función de \sqrt{t} durante la reticulación de las microcápsulas mediante cualquiera de los tres agentes reticulantes se obtiene una recta cuya pendiente indica la velocidad a la cual el agente reticulante reacciona (formaldehído y glutaraldehído) o se absorbe (transglutaminasa) con la pared de la microcápsula ya formada. En los tres casos se han comparado las pendientes para tiempos cortos de reacción puesto que es donde en los tres casos se dan las velocidades más altas.

Cantidad (g)	Glutaraldehído	Transglutaminasa	Formaldehído
	m	m	m
1	0,1016	0,0657	0,0636
4	0,1086	0,0767	0,0783
7	0,0967	0,0710	0,1287
10	0,0942	0,0461	0,0569
15	0,1486	0,0448	0,0257

Tabla 40. Velocidad de reacción o absorción de los diferentes agentes de reticulación a diferentes concentraciones en las paredes de las microcápsulas.

Analizando los resultados mostrados en la tabla se puede ver que en los tres casos a medida que se incremente la cantidad inicial de agente reticulante la velocidad de salida del medio acuoso se incrementa, alcanzo un máximo en valores entre 4 y 7 gramos. Para cantidades superiores esta velocidad disminuye hasta alcanzar el mínimo a 15 gramos excepto en caso del glutaraldehído donde esta velocidad repunta para alcanzar su máximo.

Si se comparan las velocidades alcanzadas con los diferentes agentes reticulantes, se puede observar que las velocidades más altas se alcanzan con glutaraldehído, casi doblando para cada una de las cantidades estudiadas al formaldehído, lo cual se podría esperar teniendo en cuenta la estructura de los reticulantes. El formaldehído tiene un grupo reactivo en su estructura mientras que el glutaraldehído tiene dos. Por otro lado, la enzima transglutaminasa presenta valores similares a los alcanzados con formaldehído, aunque la velocidad máxima está alejada.

Finalmente, se puede afirmar que tanto el tipo de reticulante como su concentración inicial en el medio acuoso tienen una influencia importante en la cinética de reticulación de las microcápsulas de goma árabiga y gelatina.

6.5.2. Tamaño de las microcápsulas

6.5.2.1. Glutaraldehído

La media de los radios de las microcápsulas usando diferentes concentraciones de glutaraldehído como reticulante están recogidos en la siguiente tabla:

Cantidad (g)	Rm (μm)
1	11,29
4	11,46
7	10,94
10	12,59
15	11,50

Tabla 41. Radio medio de las microcápsulas obtenidas en los reactores en los que se ha utilizado glutaraldehído a diferentes concentraciones como agente para la reticulación.

Las microcápsulas de los 5 reactores llevados a cabo presentan diferencias en tamaños es prácticamente despreciable, ya que todas las microcápsulas obtenidas están en un rango de entre 11 y 12,5 μm .

Al realizar el radio medio de los 5 reactores se obtiene un valor final de 11,55 μm .

6.5.2.2. Tansglutaminasa

Para el caso de la transglutaminasa, los resultados son los siguientes:

Cantidad (g)	Rm (μm)
1	11,85
4	10,64
7	11,55
10	19,12
15	12,44

Tabla 42. Radio medio de las microcápsulas obtenidas en los reactores en los que se ha utilizado transglutaminasa a diferentes concentraciones como agente para la reticulación.

En este caso hay una diferencia más elevada entre los extremos del rango, ya que este oscila entre tamaños de 10,5 y 19,12. A pesar de esta diferencia sólo es un reactor, el de 10 g, el que se aleja más de la media ya que los otros 4 tienen un radio medio muy aproximado entre sí. Al no haber ninguna tendencia o correlación entre la concentración de transglutaminasa y el tamaño de partícula, se podría deducir que el radio medio obtenido en el reactor llevado a cabo con 10 gramos de transglutaminasa puede ser debido a alguna ligera variación en las condiciones de proceso como por ejemplo la agitación.

Al realizar el radio medio de los 5 reactores se obtiene un valor final de 13,14 μm .

6.5.2.3. Formaldehído

Con formaldehído como reticulante, el radio medio queda de la siguiente manera:

Cantidad (g)	Rm (μm)
1	10,71
4	13,05
7	10,95
10	13,20
15	9,17

Tabla 43. Radio medio de las microcápsulas obtenidas en los reactores en los que se ha utilizado formaldehído a diferentes concentraciones como agente para la reticulación.

Las microcápsulas con un tamaño mayor se obtienen en el reactor que contiene 10 gramos de reticulante, y las más pequeñas en el de 15 g. A pesar de ello únicamente se observa una diferencia de 4 μm entre los dos extremos de 9,17 y 13,20.

Al realizar el radio medio de los 5 reactores se obtiene un valor final de 11,41 μm .

6.5.2.4. General

	Glutaraldehído	Transglutaminasa	Formaldehído
Rm (μm)	11,55	13,14	11,41
Rmáx(μm)	11,29	19,12	13,20
Rmín (μm)	10,94	10,64	9,17

Tabla 44. Radio medio, máximo y mínimo de los reactores en los que se ha utilizado glutaraldehído, formaldehído y transglutaminasa como agentes para la reticulación.

Analizando los resultados de forma general, se concluye que el glutaraldehído y el formaldehído dan unos valores de tamaño de microcápsula muy similares, aunque el formaldehído es el reticulante con el cuál, dependiendo de su concentración, se obtiene el radio medio más bajo.

Con la transglutaminasa, en cambio, se consigue un valor medio mayor y no tan igual al de los otros dos casos aunque la diferencia sigue siendo pequeña, solo incrementa en 2 μm . En cuanto a la diferencia entre el $R_{\text{máx}}$ y el $R_{\text{mín}}$, la transglutaminasa es la que presenta una mayor diferencia. Esto puede ser debido a la diferencia que hay entre los mecanismos de reticulación de los diferentes agentes reticulantes estudiados. Mientras que el formaldehído y el glutaraldehído reaccionan con la pared quedándose a formar parte de ella, la transglutaminasa llega a la superficie de la microcápsula y se absorbe y desabsorbe de ésta creando microcápsulas menos regulares. El radio máximo alcanzado es de 19,12 μm y pertenece también a las microcápsulas realizadas con transglutaminasa. Si no se tuviera en cuenta este máximo obtenido, el cual no sigue una relación con el incremento de la concentración de transglutaminasa, se podría determinar que el tipo de agente de reticulación (transglutaminasa, formaldehído y glutaraldehído) no tiene influencia en el tamaño de partícula.

6.5.3. Coeficiente de difusión

6.5.3.1. Glutaraldehído

El coeficiente de difusión varía en función de la concentración de glutaraldehído en el medio alcanzando dos picos, uno inferior en el lote con una cantidad inicial de glutaraldehído de 4 gramos y otro mayor a 15 gramos.

Cantidad (g)	$D/r^2(\text{min}^{-1})$
1	2355,96
4	2480,92
7	2314,07
10	1958,82
15	3382,90

Tabla 45. Coeficientes de difusión de los reactores llevados a cabo con glutaraldehído como agente para la reticulación a diferentes concentraciones.

6.5.3.2. Transglutaminasa

En el caso de la transglutaminasa, los valores también varían en función de la concentración. Concentraciones bajas de reticulante incrementan el coeficiente de difusión alcanzo un máximo con 4 gramos.

Cantidad (g)	D/r ² (min ⁻¹)
1	1451,49
4	1887,22
7	1609,33
10	631,22
15	942,81

Tabla 46. Coeficientes de difusión de los reactores llevados a cabo con transglutaminasa como agente para la reticulación a diferentes concentraciones.

6.5.3.3. Formaldehído

Al igual que con los otros dos agentes reticulantes estudiados, las concentraciones bajas de reticulante incrementan su coeficiente de difusión hacia las paredes de la microcápsula. En este caso el máximo se alcanza en el lote preparado con 7 gramos de formaldehído.

Cantidad (g)	D/r ² (min ⁻¹)
1	1405,10
4	1926,59
7	2917,19
10	779,09
15	540,85

Tabla 47. Coeficientes de difusión de los reactores llevados a cabo con formaldehído como agente para la reticulación a diferentes concentraciones.

6.5.3.4. General

Cantidad (g)	Glutaraldehído	Transglutaminasa	Formaldehído
	D/r ² (min ⁻¹)	D/r ² (min ⁻¹)	D/r ² (min ⁻¹)
1	2355,96	1451,49	1405,10
4	2480,92	1887,22	1926,59
7	2314,07	1609,33	2917,19
10	1958,82	631,22	779,09
15	3382,90	942,81	540,85

Tabla 48. Coeficiente de difusión de los reactores en los que se ha utilizado glutaraldehído, formaldehído y transglutaminasa como agentes para la reticulación.

Agrupando todos los resultados de los diferentes reticulantes se puede concluir que, en general, para la mayoría de concentraciones de agentes reticulantes y sistemas estudiados, el glutaraldehído presenta un coeficiente de difusión mayor. Por otro lado, se puede observar que la concentración del agente reticulante tiene una cierta influencia en el coeficiente de difusión, la cual se evidencia más para el formaldehído y la transglutaminasa. En los lotes producidos con estos dos agentes reticulantes, las concentraciones más bajas presentan coeficientes de difusión más altos, alcanzando picos en los lotes de 4 y 7 gramos. Mientras que en el caso del glutaraldehído,

aunque hay un pico en el coeficiente entre estas cantidades, el coeficiente mayor se encuentra a 15 gramos.

6.5.4. TGA (Análisis termogravimétrico)

Para realizar el TGA las muestras se han filtrado por gravedad y secado en la estufa a 70°C durante toda la noche, para así minimizar la evaporación del agua al inicio del análisis. El método se basa en un aumento de 10°C por minuto hasta los 800°C.

6.5.4.1. Glutaraldehído

A continuación, se indican las muestras analizadas mediante TGA. Estas son microcápsulas de un mismo lote extraídas a diferentes tiempos después de añadir glutaraldehído al sistema.

- 20G: Muestra a los 20 minutos
- 40G: Muestra a los 40 minutos
- 60G: Muestra a los 60 minutos
- Infinito G: Muestra del día siguiente (tiempo infinito)

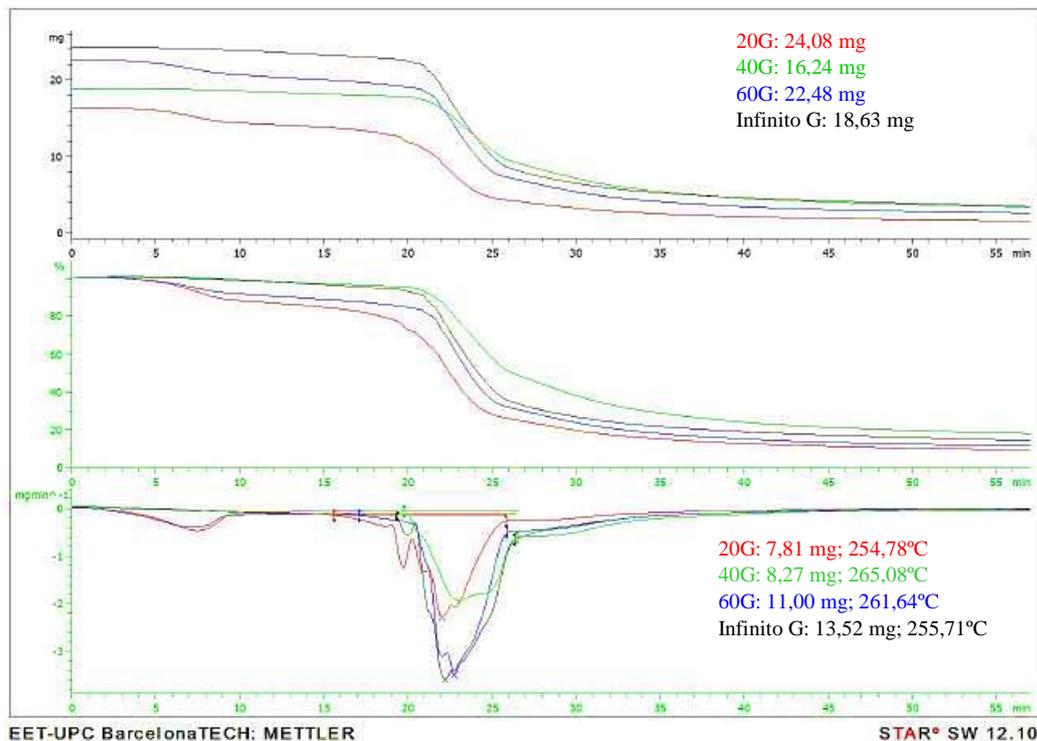


Figura 56. TGA de un reactor llevado a cabo con glutaraldehído como agente para la reticulación.

Normalmente la reticulación debería provocar 2 efectos en el degradado térmico de las muestras:

- Aumento de la temperatura de degradación.
- Incremento de la pendiente cuando se descompone la pared de la microcápsula debido a la liberación casi instantánea de su contenido, el cual se encuentra a temperaturas muy por encima de su temperatura de ebullición.

Por un lado, la concentración de glutaraldehído y, por el otro, el tiempo de exposición a este son factores que favorecen o perjudican a la encapsulación.

Observando las gráficas obtenidas mediante DTGA (derivada de la curva de TGA) se puede deducir que a los 60 minutos la reticulación de la pared de la microcápsula ya está completa, ya que no existe variación entre las características de la pared a ese tiempo y 23 horas después.

Por otro lado, para tiempos inferiores a 60 minutos (20 y 40 minutos) la curva de DTGA no presenta un pico bien definido y el área de este pico es muy inferior al de 60 min o 24 horas. Esto indica que para tiempos inferiores a una hora la estructura de la pared aún no está lo suficientemente bien reticulada y uniforme como para conseguir que toda la fragancia salga a una temperatura concreta, sino que va difundiendo poco a poco a medida que la temperatura aumenta.

En cuanto a la concentración de glutaraldehído, esta podría afectar de la misma manera que el tiempo, obteniendo el mismo efecto comentado, pero a mayor concentración de glutaraldehído, menos tiempo para que se produzca esta reticulación.

6.5.4.2. Transglutaminasa

Seguidamente se muestra la relación de las muestras analizadas mediante TGA. Estas son microcápsulas de un mismo lote extraídas a diferentes tiempos después de añadir transglutaminasa al sistema.

- T30/2: Muestra a los 30 minutos
- T60: Muestra a los 60 minutos
- T90: Muestra a los 90 minutos
- Infinito G: Muestra del día siguiente (tiempo infinito)

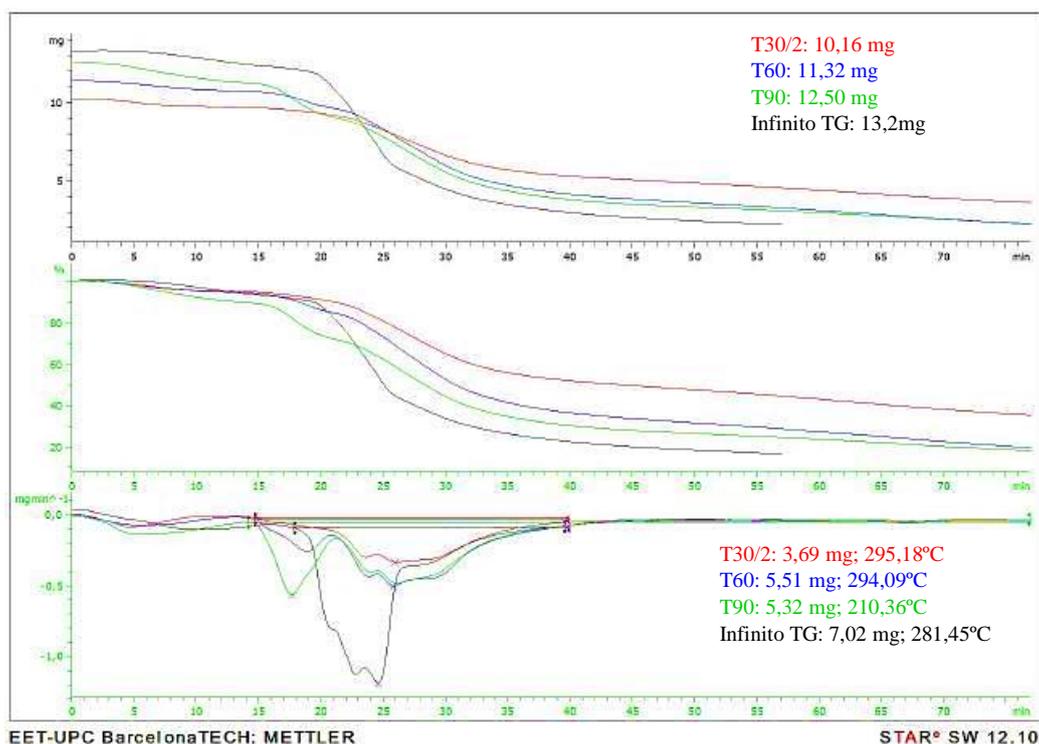


Figura 57. TGA de un reactor llevado a cabo con transglutaminasa como agente para la reticulación.

La reticulación mediante esta enzima es muy dependiente de la temperatura y el pH. La temperatura óptima es de 50°C donde en unos 40 minutos se completa la reacción. Si se trabaja a temperaturas inferiores necesitamos un mayor tiempo, en cambio si el ensayo se realiza a 4°C necesitamos unas 12 horas para que se complete la reacción. Es importante no bajar de 2°C, ya que la reacción se para (no se inactiva, ya que la inactivación sólo se da por tratamiento térmico). En este caso, la transglutaminasa se añade a unos 10°C y a un pH 6. Aun siendo el pH de 6 óptimo, una temperatura tan baja hace que la influencia de la enzima sea muy baja a tiempos cortos (30 min, 60 min, 90 min) pero latente a tiempos largos (día siguiente).

En los primeros tiempos no hay una estructura reticulada por lo que a (30, 60 y 90 min) el aceite esencial se va perdiendo por difusión durante todo el rango de temperatura (no hay un efecto protector claro de la microcápsula), esto queda demostrado porque en ninguna de las 3 curvas (30, 60, 90) hay un cambio en la pendiente (el que debería aparecer si el aceite se liberará todo al mismo tiempo por la rotura o degradación de una pared rígida). Además, solo hay un pico bien definido en el DTGA, el correspondiente a la curva de 1 día. Una buena definición de pico en la derivada indica un cambio de pendiente claro en la curva de la que proviene o lo que es lo mismo una pérdida rápida de peso como consecuencia de la liberación rápida del aceite esencial. Cuando esto pasa solo puede significar que hasta ese punto la pared de la microcápsula cumplía bien su función protectora del aceite, el cual si no estuviera microencapsulado se empezaría a evaporar a unos 40°C.

El peso molecular de la enzima utilizada es muy alto, por ello se absorberá más lentamente en la superficie y le costará adquirir la configuración en la que se activa. Es un mecanismo de inhibición de reacciones enzimáticas por sustrato. Por esto, la reticulación termina siendo tan lenta y solo alcanza valores comparables a los del glutaraldehído (pico de la DTGA bien definido y aunque de valor más bajo 7,02 mg comparado con los 13,52 mg a los 20 min) a las 24 horas.

6.5.4.3. Formaldehído

- F20: Muestra a los 20 minutos
- F40: Muestra a los 40 minutos
- F60: Muestra a los 60 minutos
- Infinito G: Muestra del día siguiente (tiempo infinito)

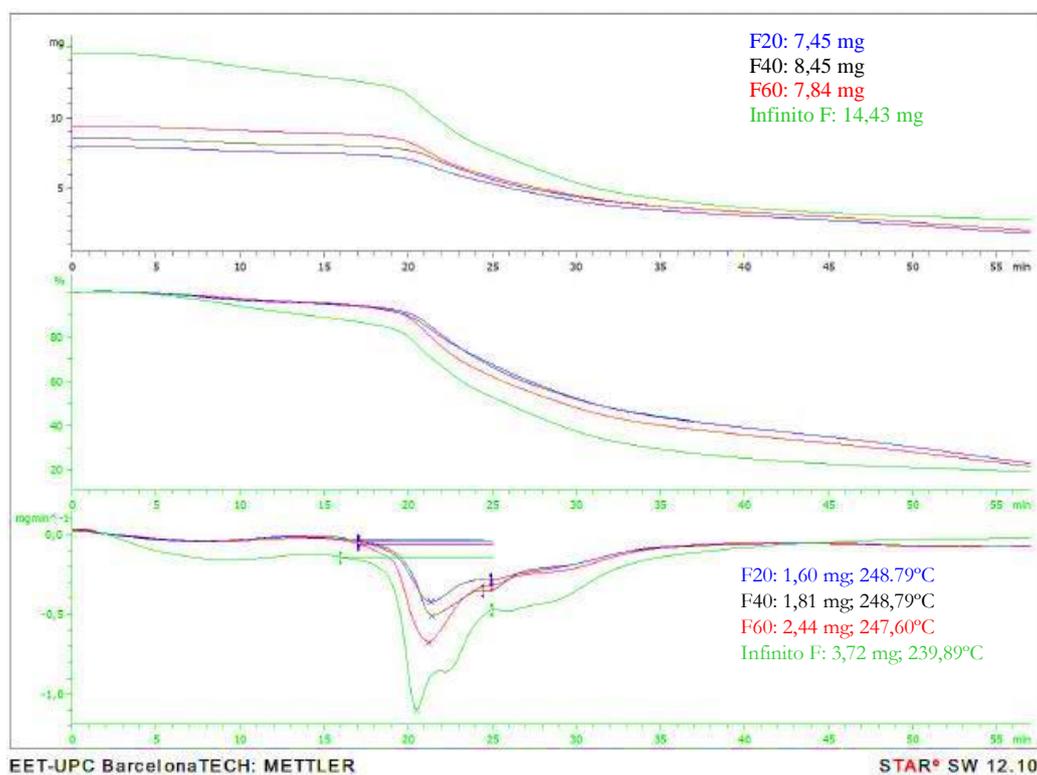


Figura 58. TGA de un reactor llevado a cabo con formaldehído como agente para la reticulación.

Se observa como la pérdida de peso se va haciendo mayor con el tiempo, es decir, la reticulación de las microcápsulas va aumentando a medida que el tiempo pasa. Este hecho se puede observar si se presta atención a la gráfica del DTGA, en la que, en las tres primeras curvas (20,40,60), se aprecia un pico pronunciado que va creciendo conforme el tiempo de cada muestra, el pico de los 20 minutos es el más pequeño y el de 60 el más grande. Este pico representa la pérdida de peso que se produce debido a la liberación completa del aceite por la rotura o degradación de la pared rígida de la microcápsula. Esto tiene sentido ya que indica que la reacción de reticulación se va

produciendo con el tiempo, así pues, a tiempos iniciales la pared estará menos reticulada que en tiempos más avanzados. Finalmente, esto se manifiesta en la curva que representa tiempo infinito, en la cual el fenómeno de reticulación ya ha finalizado dando lugar a la mayor pendiente de pérdida de peso en el momento en que se inicia la degradación de la microcápsula correspondiente a un área mayor en la curva DTGA.

6.5.4.4. General

Los resultados obtenidos mediante el TGA indican que claras diferencias entre los 3 agentes reticulantes.

Por un lado, el glutaraldehído es el reticulante que requiere menos tiempo para alcanzar una estructura final reticulada.

Por otro lado, las áreas de los picos de las curvas de DTGA a tiempos finales, permiten constatar que las microcápsulas obtenidas con glutaraldehído como agente reticulante permiten retener mayor cantidad de fragancia liberada a una temperatura concreta de degradación de la pared de la microcápsula ($13,52 \text{ mg}/18,63 \text{ mg} = 0,72$) mientras que en el caso de la transglutaminasa la pérdida en ese mismo punto es menor ($7,02 \text{ mg}/13,2 \text{ mg} = 0,53$) y para el formaldehído la más reducida ($3,72 \text{ mg}/14,43 \text{ mg} = 0,26$). Esto indica que la estructura de la pared formada con glutaraldehído retiene y protege mejor el aceite en su interior.

6.6. CONCLUSIONES

Después de realizar el estudio completo de los sistemas de reticulación en la formación de microcápsulas de gelatina y goma arábiga utilizando tres reticulantes y diferentes concentraciones de estos se describen las siguientes conclusiones:

En primer lugar, a partir de los resultados obtenidos mediante microscopía óptica se puede determinar que se han obtenido microcápsulas en todos los lotes llevados a cabo con diferentes agentes reticulantes a diferentes concentraciones.

En segundo lugar, cabe destacar que la reacción de reticulación se sigue midiendo la difusión, ya que se produce un intercambio de materia entre las microcápsulas formadas y el reticulante que va reaccionando siendo absorbido en estas.

Después de obtener los datos experimentales de la concentración del reticulante en el medio continuo en diferentes tiempos y realizar los cálculos, se han determinado unos coeficientes de difusión radial para los tres reticulantes. En este caso, el glutaraldehído es el agente reticulante

que presenta un coeficiente de difusión mayor desde la fase acuosa donde está disuelto inicialmente, a la pared de la microcápsula.

Si se comparan las velocidades de reacción o absorción alcanzadas con los diferentes agentes reticulantes, se puede observar que las velocidades más altas se alcanzan con glutaraldehído, casi doblando para cada una de las cantidades estudiadas al formaldehído, lo cual se podría esperar teniendo en cuenta la estructura de los reticulantes. El formaldehído tiene un grupo reactivo en su estructura mientras que el glutaraldehído tiene dos. Por otro lado, la enzima transglutaminasa presenta valores similares a los alcanzados con formaldehído, aunque la velocidad máxima está alejada.

Respecto al comportamiento de los diferentes reticulantes se puede concluir que el glutaraldehído y el formaldehído tienen unas características de reticulación muy parecidas, en cambio la transglutaminasa se comporta de diferente manera. Esto se debe a que el formaldehído y el glutaraldehído provienen de la misma familia química; los aldehídos, por tanto, tienen muchas similitudes en su estructura química y su comportamiento frente a un mismo sistema, en este caso frente a las microcápsulas de gelatina y goma arábiga, es prácticamente igual. En cambio, la transglutaminasa es una enzima y como ya se ha ido comentando a lo largo del proyecto, esta trabaja como una enzima catalizadora de la reacción, aunque en este estudio no se haya tratado como tal y se haya trabajado bajo la premisa de que sí que se produce reacción con ella. La gran diferencia entre la transglutaminasa y los otros dos reticulantes se encuentra en que, al medir la concentración en el baño de la última muestra, la extraída un día después, se obtiene una absorbancia más elevada que la muestra anterior. Esto solo sucede en el caso de la transglutaminasa y es debido a que las microcápsulas dejaban de admitir más transglutaminasa, esta se liberaba y volvía al baño. En los otros dos casos, el último valor de concentración en el baño es siempre menor al anterior ya que los reticulantes reaccionaban con las microcápsulas y cuanto más tiempo pasaba, menos cantidad quedaba en el baño.

Con respecto a la formación de microcápsulas, también se produce una diferencia entre la transglutaminasa y los otros dos reticulantes. Utilizando glutaraldehído o formaldehído se obtiene un valor de tamaño medio de microcápsula muy similar, aproximadamente 11,5 μm de radio y utilizando transglutaminasa se obtiene un tamaño medio de 13,14 μm . Mientras en los lotes de glutaraldehído y formaldehído para las diferentes concentraciones el radio se mantiene más o menos constantes, en el caso de la transglutaminasa este sufre más fluctuaciones dependiendo del lote. Esto puede ser debido a la diferencia que hay entre los mecanismos de reticulación de los diferentes agentes reticulantes estudiados. Mientras que el formaldehído y el Glutaraldehído reaccionan con la pared quedándose a formar parte de ella, la transglutaminasa llega a la superficie de la microcápsula y se absorbe y desabsorbe de esta creando microcápsulas menos regulares.

Por último, mediante el TGA se ha constatado que el reticulante más rápido en llegar a la conformación final de la microcápsula reticulada es el glutaraldehído, lo cual se correlaciona con el hecho de que era el reticulante que más rápidamente salía de la fase acuosa.

Por otro lado, las áreas de los picos de las curvas de DTGA a tiempos finales, permiten constatar que las microcápsulas obtenidas con glutaraldehído como agente reticulante permiten retener mayor cantidad de fragancia liberada a una temperatura concreta de degradación de la pared de la microcápsula, seguido de la transglutaminasa y por último el formaldehído. Esto indica que la estructura de la pared formada con glutaraldehído retiene y protege mejor el aceite en su interior.

6.7. BIBLIOGRAFÍA

- [93] J. . Gonzalez, “Cinética Enzimática.” EHU.
- [114] I. Migneault, C. Dartiguenave, M. J. Bertrand, and K. C. Waldron, “Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking,” *Biotechniques*, vol. 37, no. 5, pp. 790–802, 2004.
- [115] E. Fuguet, C. van Platerink, and H. G. Janssen, “Analytical characterisation of glutardialdehyde cross-linking products in gelatine-gum arabic complex coacervates,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 604, no. 1, pp. 45–53, 2007.
- [116] K. R. Juvonen *et al.*, “Crosslinking with transglutaminase does not change metabolic effects of sodium caseinate in model beverage in healthy young individuals,” *Nutr. J.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–12, 2012.
- [117] D. Arnold, “Cooking Issues,” *Harvard Lect.*

CAPÍTULO 7:
Conclusiones Generales

7. CONCLUSIONES GENERALES

La investigación llevada a cabo con el desarrollo de esta tesis ha permitido alcanzar los objetivos marcados al inicio de la misma, aportando nuevos conocimientos acerca de los diferentes parámetros involucrados en la microencapsulación mediante coacervación compleja.

A continuación, se describen las conclusiones generales obtenidas a partir del análisis de las conclusiones obtenidas en cada uno de los capítulos que conforman esta tesis.

En lo referente a la formación de microcápsulas de aromas y la posterior optimización se demuestra que:

- La microencapsulación mediante coacervación compleja utilizando como material de pared gelatina y goma arábiga muestra una limitación importante en cuanto a la concentración de polímero en el sistema. La gran capacidad de la gelatina para absorber agua en su estructura hace que a concentraciones elevadas se forme un gel, a temperaturas por debajo de 35°C.
- El orden de adición de los diferentes componentes del proceso tienen una influencia importante en la morfología final de las microcápsulas. El uso de la gelatina como emulsionante del aceite y la posterior adición de la goma reducen la aparición de aglomeraciones.
- La proporción entre gelatina y goma arábiga que permite obtener los mejores resultados a nivel morfológico es la relación 1:1.
- La concentración de reticulante en el sistema presenta una gran influencia en la presencia de aglomeraciones. Cantidades reducidas de reticulante permiten obtener microcápsulas mejor definidas y sin aglomeraciones.

Focalizando el análisis en la influencia del tipo de tensioactivo, su concentración y la influencia de la agitación en la formación de microcápsulas se determina que:

- Concentraciones de tensioactivo por encima de la CMC permiten obtener emulsiones estables del aceite a encapsular.
- La estructura y estado del tensioactivo utilizado controlará los fenómenos de interfase aceite-agua. Dependiendo del tipo de interacciones entre el tensioactivo y los materiales que deberían formar la pared de la microcápsula, esta se formará o no, y en caso de que se forme la microcápsula, el tensioactivo influirá en las propiedades finales de esta.
- La distribución del tamaño de partícula también está influenciado por el tipo y la concentración de tensioactivo, pero este factor depende más fuertemente de la agitación.

Esta no se relaciona linealmente con la eficiencia de la microencapsulación con lo que para cada sistema se deberá buscar el valor de agitación que maximice esta eficiencia.

Por último, los resultados generados durante el estudio de los sistemas de reticulación en la formación de microcápsulas de gelatina y goma arábiga permiten obtener las siguientes conclusiones:

- Es posible formar microcápsulas totalmente inocuas sustituyendo reticulantes como formaldehído o glutaraldehído por la enzima transglutaminasa, obteniendo la misma morfología.
- La reacción de reticulación se sigue midiendo por difusión, ya que se produce un intercambio de materia entre las microcápsulas formadas y el reticulante que va reaccionando siendo absorbido en estas. El glutaraldehído es de los tres agentes para la reticulación (glutaraldehído, formaldehído y transglutaminasa) el que presenta un coeficiente de difusión mayor desde la fase acuosa donde está disuelto inicialmente a la pared de la microcápsula lo que significa una velocidad de reacción más alta, doblando al formaldehído, ya que este tiene solo un grupo reactivo mientras que el glutaraldehído tiene dos. Por otro lado, la enzima transglutaminasa presenta valores similares a los alcanzados con formaldehído, aunque la velocidad máxima es menor.
- En referencia a la formación de las microcápsulas se producen diferencias entre la transglutaminasa y los otros dos reticulantes estudiados. La diferencia entre los mecanismos de reticulación hace que mientras que el glutaraldehído y el formaldehído reaccionan con la pared de la microcápsula quedándose para formar parte de ella, la transglutaminasa llega a la superficie de la microcápsula absorbiéndose y desabsorbiéndose creando microcápsulas menos regulares.
- La técnica de TGA permite determinar que el reticulante más rápido en lograr la conformación final de la microcápsula es el glutaraldehído, lo cual se correlaciona con el hecho de que es el reticulante que más rápidamente abandona la fase acuosa.
- El análisis de las áreas de los picos de las curvas de DTGA a tiempos finales permite determinar que las microcápsulas obtenidas con glutaraldehído como agente reticulante permiten retener mayor cantidad de fragancia, liberada a una temperatura concreta de degradación de la pared de la microcápsula, seguido de la transglutaminasa y, por último, del formaldehído. Esto indica que la estructura de la pared formada con glutaraldehído, retiene y protege mejor el aceite en su interior.

CAPÍTULO 8:
Trabajo Futuro

8. TRABAJO FUTURO

A partir de los resultados y las conclusiones obtenidas como consecuencia de la realización de la presente tesis se plantean una serie de posibles líneas de investigación futuras:

- Estudiar la influencia de diferentes aceites esenciales o diferentes fragancias en la formación de la microcápsula.
- Ampliar el estudio de las diferentes tensiones interfaciales involucradas en el proceso de microencapsulación con el objetivo de predecir la morfología final de las microcápsulas.
- Incrementar el número y tipo de tensioactivos estudiados con el fin de determinar qué características o conjunto de estas permitirían seleccionar los tensioactivos adecuados para un sistema concreto de microencapsulación.
- Profundizar en la etapa de reticulación en el proceso microencapsulación mediante coacervación compleja. Los resultados obtenidos con la enzima transglutaminasa permiten ser optimistas en cuanto a la obtención de microcápsulas con características muy similares a las obtenidas con glutaraldehído como reticulante.
- Realizar pruebas de escalado para conocer el potencial real de las microcápsulas totalmente inocuas diseñadas en la presente tesis.

CAPÍTULO 9:
Bibliografía general

9. BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- [1] A. Bakry *et al.*, “Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications,” *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 15, pp. 143–182, 2015.
- [2] N. Agnihotri, R. Mishra, C. Goda, and M. Arora, “Microencapsulation – A Novel Approach in Drug Delivery: A Review,” *Indo Glob. J Pharm Sci*, vol. 2, pp. 1–20, 2012.
- [3] H. G. de Jong and H. R. Kruyt, “Complex colloid systems,” *Colloid Sci.*, vol. 2, pp. 335–432, 1949.
- [4] S. Boral and H. B. Bohidar, “Effect of Ionic Strength on Surface-Selective Patch Binding-Induced Phase Separation and Coacervation in Similarly Charged Gelatin–Agar Molecular Systems,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 114, no. 37, pp. 12027–12035, Sep. 2010.
- [5] D. Klassen, “Associative phase separation in admixtures of pea protein isolates with gum Arabic and a canola protein isolate with ι -carrageenan and alginate.” pp. 6–11, 2010.
- [6] J. T. G. Overbeek and M. J. Voorn, “Phase separation in polyelectrolyte solutions. Theory of complex coacervation,” *J. Cell. Comp. Physiol.*, vol. 49, no. S1, pp. 7–26, 1957.
- [7] A. Veis, “PHASE SEPARATION IN POLYELECTROLYTE SOLUTIONS. II. INTERACTION EFFECTS,” *J. Phys. Chem.*, vol. 65, no. 10, pp. 1798–1803, Oct. 1961.
- [8] A. Nakajima and H. Sato, “Phase relationships of an equivalent mixture of sulfated polyvinyl alcohol and aminoacetylated polyvinyl alcohol in microsalt aqueous solution,” *Biopolymers*, vol. 11, no. 7, pp. 1345–1355, 1972.
- [9] K.-I. Tainaka, “Effect of counterions on complex coacervation,” *Biopolymers*, vol. 19, no. 7, pp. 1289–1298, 1980.
- [10] A. Gupta and H. B. Bohidar, “Kinetics of phase separation in systems exhibiting simple coacervation,” *Phys. Rev. E*, vol. 72, no. 1, p. 11507, Jul. 2005.
- [11] J.-L. Doublier, C. Garnier, D. Renard, and C. Sanchez, *Protein–polysaccharide interactions*, vol. 5. 2000.
- [12] S. Gouin, “Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 15, no. 7–8, pp. 330–347, Jul. 2004.
- [13] J. Helman, *Farmacotécnica Teórica y Práctica*. Continental, 1980.
- [14] V. Jack R. Lorraine, Newport News, “United States Patent (19,” vol. 19, no. 54, 1985.

- [15] C. Y. G. Lemetter, F. M. Meeuse, and N. J. Zuidam, "Control of the morphology and the size of complex coacervate microcapsules during scale-up," *AIChE J.*, vol. 55, no. 6, pp. 1487–1496, 2009.
- [16] Z. Xiao, W. Liu, G. Zhu, R. Zhou, and Y. Niu, "A review of the preparation and application of flavour and essential oils microcapsules based on complex coacervation technology," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 94, no. 8, pp. 1482–1494, 2014.
- [17] F. Weinbreck, M. Minor, and C. G. de Kruif, "Microencapsulation of oils using whey protein/gum arabic coacervates," *J. Microencapsul.*, vol. 21, no. 6, pp. 667–679, Sep. 2004.
- [18] X. Jun-xia, Y. Hai-yan, and Y. Jian, "Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic," *Food Chem.*, vol. 125, no. 4, pp. 1267–1272, 2011.
- [19] L. A. C. Zuanon, C. R. Malacrida, and V. R. N. Telis, "Production of Turmeric Oleoresin Microcapsules by Complex Coacervation with Gelatin–Gum Arabic," *J. Food Process Eng.*, vol. 36, no. 3, pp. 364–373, 2010.
- [20] Z. J. Dong, A. Toure, C. S. Jia, X. M. Zhang, and S. Y. Xu, "Effect of processing parameters on the formation of spherical multinuclear microcapsules encapsulating peppermint oil by coacervation," *J. Microencapsul.*, vol. 24, no. 7, pp. 634–646, Nov. 2007.
- [21] Z.-J. Dong, S.-Q. Xia, S. Hua, K. Hayat, X.-M. Zhang, and S.-Y. Xu, "Optimization of cross-linking parameters during production of transglutaminase-hardened spherical multinuclear microcapsules by complex coacervation," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 63, no. 1, p. 41–47, May 2008.
- [22] Z. Dong, Y. Ma, K. Hayat, C. Jia, S. Xia, and X. Zhang, *Morphology and release profile of microcapsules encapsulating peppermint oil by complex coacervation*, vol. 104. 2011.
- [23] Z.-Q. Zhang, C.-H. Pan, and D. Chung, "Tannic acid cross-linked gelatin–gum arabic coacervate microspheres for sustained release of allyl isothiocyanate: Characterization and in vitro release study," *Food Res. Int.*, vol. 44, no. 4, pp. 1000–1007, 2011.
- [24] Y. Yeo, E. Bellas, W. Firestone, R. Langer, and D. S. Kohane, "Complex coacervates for thermally sensitive controlled release of flavor compounds," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 19, pp. 7518–7525, Sep. 2005.
- [25] S. Leclercq, C. Milo, and G. A. Reineccius, "Effects of cross-linking, capsule wall thickness, and compound hydrophobicity on aroma release from complex coacervate

- microcapsules.,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 57, no. 4, pp. 1426–1432, Feb. 2009.
- [26] X. Z. Kong, X. Gu, X. Zhu, and Z. Zhang, “Spreadable dispersion of insect sex pheromone capsules, preparation via complex coacervation and release control of the encapsulated pheromone component molecule.,” *Biomed. Microdevices*, vol. 11, no. 1, pp. 275–285, Feb. 2009.
- [27] X.-L. Gu, X. Zhu, X.-Z. Kong, and Y. Tan, “Comparisons of simple and complex coacervations for preparation of sprayable insect sex pheromone microcapsules and release control of the encapsulated pheromone molecule.,” *J. Microencapsul.*, vol. 27, no. 4, pp. 355–364, 2010.
- [28] Y. T. Yu, L. N. Liu, X. L. Zhu, and X. Z. Kong, “Microencapsulation of dodecyl acetate by complex coacervation of whey protein with acacia gum and its release behavior,” *Chinese Chem. Lett.*, vol. 23, no. 7, pp. 847–850, 2012.
- [29] D. Wang and D. F. Chi, “Morphology and Release Profile of Microcapsules Encapsulated Alpha-Pinene by Complex Coacervation,” in *Progress in Materials and Processes*, 2013, vol. 602, pp. 1285–1288.
- [30] N. Devi and T. K. Maji, “Study of Complex Coacervation of Gelatin A with Sodium Carboxymethyl Cellulose: Microencapsulation of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) Seed Oil (NSO),” *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, vol. 60, no. 13, pp. 1091–1105, Dec. 2011.
- [31] N. Devi and T. K. Maji, “Genipin crosslinked microcapsules of gelatin a and κ -carrageenan polyelectrolyte complex for encapsulation of neem (*azadirachta indica* a.juss.) seed oil,” *Polym. Bull.*, vol. 65, no. 4, pp. 347–362, 2010.
- [32] N. Devi and T. K. Maji, “Effect of Crosslinking Agent on Neem (*Azadirachta Indica* A. Juss.) Seed Oil (NSO) Encapsulated Microcapsules of κ -Carrageenan and Chitosan Polyelectrolyte Complex,” *J. Macromol. Sci. Part A*, vol. 46, no. 11, pp. 1114–1121, Sep. 2009.
- [33] T. K. Maji and M. R. Hussain, “Microencapsulation of *Zanthoxylum limonella* oil (ZLO) in genipin crosslinked chitosan–gelatin complex for mosquito repellent application,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 111, no. 2, pp. 779–785, 2009.
- [34] Z. M. Yang *et al.*, “Preparation of Antibacterial Cotton Fabric Containing Patchouli Oil Microcapsules by Chemical Crosslinking Method,” in *Advanced Polymer Science and Engineering*, 2011, vol. 221, pp. 308–315.
- [35] J. Liu, C. Liu, Y. Liu, M. Chen, Y. Hu, and Z. Yang, “Study on the grafting of chitosan-

- gelatin microcapsules onto cotton fabrics and its antibacterial effect.," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 109, pp. 103–108, Sep. 2013.
- [36] G. T. Han *et al.*, "Preparation and Properties Analysis of Slow-Release Microcapsules Containing Patchouli Oil," in *Biotechnology, Chemical and Materials Engineering II*, 2013, vol. 641, pp. 935–938.
- [37] Y. Hu, Z. Ming Yang, J. Yi Liu, J. Hua Cheng, and Z. Yang, "Preparation and Controlled Release Analysis of Patchouli Oil Complex Microcapsules," *Adv. Mater. Res.*, vol. 236–238, pp. 2669–2672, 2011.
- [38] M. M. M. Specos, G. Escobar, P. Marino, C. Puggia, M. V. D. Tesoriero, and L. Hermida, "Aroma Finishing of Cotton Fabrics by Means of Microencapsulation Techniques," *J. Ind. Text.*, vol. 40, no. 1, pp. 13–32, 2010.
- [39] M. M. M. Specos *et al.*, "Microencapsulated citronella oil for mosquito repellent finishing of cotton textiles.," *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 104, no. 10, pp. 653–658, Oct. 2010.
- [40] B. Ocak, "Complex coacervation of collagen hydrolysate extracted from leather solid wastes and chitosan for controlled release of lavender oil.," *J. Environ. Manage.*, vol. 100, pp. 22–28, Jun. 2012.
- [41] G. Ru He, L. Li, W. Man, T. K. S. Wong, Z. Yang, and Q. Ling Jiang, *The Study of Cotton Finishing by Artemisia Argyi Oil Microcapsules*, vol. 654–656. 2010.
- [42] L. Li, L. Song, T. Hua, W. M. Au, and K. S. Wong, "Characteristics of weaving parameters in microcapsule fabrics and their influence on loading capability," *Text. Res. J.*, vol. 83, no. 2, pp. 113–121, 2013.
- [43] A. S. Prata, M. H. A. Zanin, M. I. Re, and C. R. F. Grosso, "Release properties of chemical and enzymatic crosslinked gelatin-gum Arabic microparticles containing a fluorescent probe plus vetiver essential oil.," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 67, no. 2, pp. 171–178, Dec. 2008.
- [44] A. S. Prata, C. Menut, A. Leydet, J. R. Trigo, and C. R. F. Grosso, "Encapsulation and release of a fluorescent probe, khusimyl dansylate, obtained from vetiver oil by complex coacervation," *Flavour Fragr. J.*, vol. 23, no. 1, pp. 7–15, 2008.
- [45] L.-F. Siow, "Effect of pH on Garlic Oil Encapsulation by Complex Coacervation," *J. Food Process. Technol.*, vol. 04, no. 01, pp. 1–5, 2012.
- [46] Y. Lv, X. Zhang, S. Abbas, and E. Karangwa, "Simplified optimization for microcapsule

- preparation by complex coacervation based on the correlation between coacervates and the corresponding microcapsule,” *J. Food Eng.*, vol. 111, no. 2, pp. 225–233, 2012.
- [47] S. Leclercq, K. R. Harlander, and G. A. Reineccius, “Formation and characterization of microcapsules by complex coacervation with liquid or solid aroma cores,” *Flavour Fragr. J.*, vol. 24, no. 1, pp. 17–24.
- [48] C.-P. Chang, T.-K. Leung, S.-M. Lin, and C.-C. Hsu, “Release properties on gelatin-gum arabic microcapsules containing camphor oil with added polystyrene.,” *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 50, no. 2, pp. 136–140, Jul. 2006.
- [49] D. V Mendanha, S. E. M. Ortiz, C. S. Favaro-Trindade, A. Mauri, E. S. Monterrey-Quintero, and M. Thomazini, “Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin,” *Food Res. Int.*, vol. 42, no. 8, pp. 1099–1104, 2009.
- [50] M. Pozippe Nori, C. Favaro-Trindade, S. Alencar, M. Thomazini, J. Balieiro, and C. J. Contreras Castillo, *Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation*, vol. 44. 2011.
- [51] T. F. Tadros, *Emulsion Science and Technology*. 2009.
- [52] L. L. Schramm, *Surfactants: Fundamentals and Applications in the Petroleum Industry*. 2000.
- [53] J. W. Goodwin, *Colloids and Interfaces with Surfactants and Polymers – An Introduction*. 2004.
- [54] R. J. Farn, *Chemistry and Technology of Surfactants*, Ltd, Black. Ltd, Blackwell Publishing, 2006.
- [55] S. Santos, B. Medronho, T. Santos, and F. E. Antunes, *Drug Delivery Systems: Advanced Technologies Potentially Applicable in Personalised Treatment*, vol. 4. 2013.
- [56] W. C. Griffin, “Classification of Surface-Active Agents by ‘HLB,’” *J. Soc. Cosmet. Chem.*, vol. 1, pp. 311–326.
- [57] W. Pfeiffer, T. Henkel, E. Sackmann, W. Knoll, and D. Richter, “Local Dynamics of Lipid Bilayers Studied by Incoherent Quasi-Elastic Neutron Scattering,” *Europhys. Lett.*, vol. 8, no. 2, pp. 201–206, Jan. 1989.
- [58] K. Holmberg, J. Bo, and B. Kronberg, *SOLUTION AND POLYMERS IN AQUEOUS*. 2003.
- [59] T. F. Tadros, *Applied Surfactants - principles and applications*. 2005.

- [60] “Dye solubilization by a cationic polymer/ anionic surfactant system.,” *J Colloid Interface*, vol. 60, pp. 214–215, 1977.
- [61] P. S. Leung, E. D. Goddard, C. Han, and C. J. Glinka, “A study of polycation—anionic-surfactant systems,” *Colloids and Surfaces*, vol. 13, pp. 47–62, 1985.
- [62] P. S. Leung and E. D. Goddard, “Gels from dilute polymer/surfactant solutions,” *Langmuir*, vol. 7, no. 3, pp. 608–609, Mar. 1991.
- [63] B. H. Lee, S. D. Christian, E. E. Tucker, and J. F. Scamehorn, “Effects of an anionic polyelectrolyte on the solubilization of mono- and dichlorophenols by aqueous solutions of N-hexadecylpyridinium chloride,” *Langmuir*, vol. 7, no. 7, pp. 1332–1335, Jul. 1991.
- [64] B. Magny, I. Iliopoulos, R. Zana, and R. Audebert, “Mixed Micelles Formed by Cationic Surfactants and Anionic Hydrophobically Modified Polyelectrolytes,” *Langmuir*, vol. 10, no. 9, pp. 3180–3187, Sep. 1994.
- [65] I. Iliopoulos, “Association between hydrophobic polyelectrolytes and surfactants,” *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 3, no. 5, pp. 493–498, 1998.
- [66] E. D. Goddard and B. A. Pethica, “590. On detergent–protein interactions,” *J. Chem. Soc.*, no. 0, pp. 2659–2663, 1951.
- [67] T. C. LAURENT and J. E. SCOTT, “MOLECULAR WEIGHT FRACTIONATION OF POLYANIONS BY CETYLPYRIDINIUM CHLORIDE IN SALT SOLUTIONS.,” *Nature*, vol. 202, pp. 661–662, May 1964.
- [68] A. J. Dualeh and C. A. Steiner, “Hydrophobic microphase formation in surfactant solutions containing an amphiphilic graft copolymer,” *Macromolecules*, vol. 23, no. 1, pp. 251–255, Jan. 1990.
- [69] F. Guillemet and L. Piculell, “Interactions in Aqueous Mixtures of Hydrophobically Modified Polyelectrolyte and Oppositely Charged Surfactant. Mixed Micelle Formation and Associative Phase Separation,” *J. Phys. Chem.*, vol. 99, no. 22, pp. 9201–9209, Jun. 1995.
- [70] K. Thuresson, S. Nilsson, and B. Lindman, “Effect of Hydrophobic Modification on Phase Behavior and Rheology in Mixtures of Oppositely Charged Polyelectrolytes,” *Langmuir*, vol. 12, no. 2, pp. 530–537, Jan. 1996.
- [71] K. Thuresson and B. Lindman, “Effect of Hydrophobic Modification of a Nonionic Cellulose Derivative on the Interaction with Surfactants. Phase Behavior and Association,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 101, no. 33, pp. 6460–6468, Aug. 1997.

- [72] M. Karlberg, K. Thuresson, L. Piculell, and B. Lindman, "Mixed solutions of hydrophobically modified graft and block copolymers," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 236, no. 1, pp. 159–164, 2004.
- [73] F. E. Antunes, E. F. Marques, M. G. Miguel, and B. Lindman, "Polymer-vesicle association.," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 147–148, pp. 18–35, 2009.
- [74] F. E. Antunes, B. Lindman, and M. G. Miguel, "Mixed systems of hydrophobically modified polyelectrolytes: controlling rheology by charge and hydrophobe stoichiometry and interaction strength.," *Langmuir*, vol. 21, no. 22, pp. 10188–10196, Oct. 2005.
- [75] K. Bergfeldt, L. Piculell, and P. Linse, "Segregation and Association in Mixed Polymer Solutions from Flory–Huggins Model Calculations," *J. Phys. Chem.*, vol. 100, no. 9, pp. 3680–3687, Jan. 1996.
- [76] L. Piculell and B. Lindman, "Association and segregation in aqueous polymer/polymer, polymer/surfactant, and surfactant/surfactant mixtures: similarities and differences," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 41, pp. 149–178, 1992.
- [77] K. JCT, *Polymer-surfactant systems*. 1998.
- [78] R. J. Hefford, "Polymer mixing in aqueous solution," *Polymer (Guildf.)*, vol. 25, no. 7, pp. 979–984, 1984.
- [79] T. C. Dubin P, Bock J, Davis R, Schulz ND, *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*. 1994.
- [80] S. Shenkov and V. Y. Baranovsky, "Complex formation between poly(methacrylic acid) and poly(propylene glycol) in aqueous solutions," *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 32, no. 7, pp. 1385–1387, 1994.
- [81] M. L. Cole and T. L. Whateley, "Interaction of Nonionic Block Copolymeric (Poloxamer) Surfactants with Poly (Acrylic Acid), Studied by Photon Correlation Spectroscopy," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 180, no. 2, pp. 421–427, 1996.
- [82] Y. Wang, E. J. Goethals, and F. E. Du Prez, "Association Behavior between End-Functionalized Block Copolymers PEO-PPO-PEO and Poly(acrylic acid)," *Macromol. Chem. Phys.*, vol. 205, no. 13, pp. 1774–1781, 2004.
- [83] D. Y. Chu and J. K. Thomas, "Effect of cationic surfactants on the conformation transition of poly(methacrylic acid)," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 108, no. 20, pp. 6270–6276, Oct. 1986.
- [84] P. Hansson and B. Lindman, "Surfactant-polymer interactions," pp. 604–613, 1996.

- [85] S. E. Friberg, "Interactions of Surfactants with Polymers and Proteins. E.D.Goddard and K.P. Ananthapadmanabhan (eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, 1993, pp. 1-427, \$169.95," *J. Dispers. Sci. Technol.*, vol. 15, no. 3, p. 399, 1994.
- [86] E. D. Goddard, "Polymer—surfactant interaction part II. Polymer and surfactant of opposite charge," *Colloids and Surfaces*, vol. 19, no. 2, pp. 301–329, 1986.
- [87] K. Thalberg and B. Lindman, "Interaction between hyaluronan and cationic surfactants," *J. Phys. Chem.*, vol. 93, 1989.
- [88] K. Thalberg, B. Lindman, and K. Bergfeldt, "Phase behavior of systems of polyacrylate and cationic surfactants," *Langmuir*, vol. 7, no. 12, pp. 2893–2898, Dec. 1991.
- [89] R. Dias, S. Mel'nikov, B. Lindman, and M. G. Miguel, "DNA Phase Behavior in the Presence of Oppositely Charged Surfactants," *Langmuir*, vol. 16, no. 24, pp. 9577–9583, Nov. 2000.
- [90] I. Lynch, J. Sjöström, and L. Piculell, "Reswelling of Polyelectrolyte Hydrogels by Oppositely Charged Surfactants," *J. Phys. Chem. B*, vol. 109, no. 9, pp. 4258–4262, Mar. 2005.
- [91] W. J. Knox and T. O. Parshall, "The interaction of sodium dodecyl sulfate with gelatin," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 33, no. 1, pp. 16–23, 1970.
- [92] N. Nishikido, "Interaction between hydrophilic proteins and nonionic detergents studied by surface tension measurements," *Chem. Soc. Japan*, vol. 55, pp. 3085–3088, 1982.
- [93] J. . Gonzalez, "Cinética Enzimática." EHU.
- [94] H. Puel, F; Briancon. S; Fessi, "Industrial Technologies and Scale-Up," in *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications, Second Edition*, S. Benita, Ed. 2006, pp. 149–182.
- [95] I. D. Alvim and C. R. F. Grosso, "Microparticles obtained by complex coacervation: influence of the type of reticulation and the drying process on the release of the core material," *Food Sci. Technol.*, vol. 30, pp. 1069–1076, 2010.
- [96] A. Lamprecht, U. F. Schäfer, and C.-M. Lehr, "Characterization of microcapsules by confocal laser scanning microscopy: structure, capsule wall composition and encapsulation rate," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 49, no. 1, pp. 1–9, 2000.
- [97] BASF, "Kolliphor™ P Grades," no. 118481, pp. 1–8, 2012.
- [98] SIGMA-ALDRICH, "Poly(styrene-co-maleic anhydride)."

- [99] Merck, "Sodium dodecyl sulfate Ph Eur," 2007.
- [100] M. K. Sabah, E. Kheir, A. El, G. A. Yagoub, and A. A. A. Baker, "Emulsion-Stabilizing Effect of Gum from *Acacia senegal* (L) Willd. The Role of Quality and Grade of Gum, Oil Type, Temperature, Stirring Time and Concentration," *Pakistan J. Nutr.*, vol. 7, no. 3, pp. 395–399, 2008.
- [101] SIGMA-ALDRICH, "Gum arabic from acacia tree," *MFCD000812*.
- [102] S.-Y. Lin, Y.-Y. Lin, E.-M. Chen, C.-T. Hsu, and C.-C. Kwan, "A Study of the Equilibrium Surface Tension and the Critical Micelle Concentration of Mixed Surfactant Solutions," *Langmuir*, vol. 15, no. 13, pp. 4370–4376, Jun. 1999.
- [103] A. L. Tasker, J. P. Hitchcock, L. He, E. A. Baxter, S. Biggs, and O. J. Cayre, "The effect of surfactant chain length on the morphology of poly(methyl methacrylate) microcapsules for fragrance oil encapsulation," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 484, pp. 10–16, 2016.
- [104] F. Guth *et al.*, "Development of an improved poloxamer 188 to minimize risk in biologic manufacturing," pp. 8–11.
- [105] A. Cifuentes, J. L. Bernal, and J. C. Diez-Masa, "Determination of Critical Micelle Concentration Values Using Capillary Electrophoresis Instrumentation," *Anal. Chem.*, vol. 69, no. 20, pp. 4271–4274, Oct. 1997.
- [106] M. Pérez-Rodríguez, G. Prieto, C. Rega, L. M. Varela, F. Sarmiento, and V. Mosquera, "A Comparative Study of the Determination of the Critical Micelle Concentration by Conductivity and Dielectric Constant Measurements," *Langmuir*, vol. 14, no. 16, pp. 4422–4426, Aug. 1998.
- [107] A. Prieu, S. Zalipsky, R. Cohen, and Y. Barenholz, "Determination of Critical Micelle Concentration of Lipopolymers and Other Amphiphiles: Comparison of Sound Velocity and Fluorescent Measurements," *Langmuir*, vol. 18, no. 3, pp. 612–617, Feb. 2002.
- [108] M. A. Faiz Afzal, "A review on Pluronic block copolymer micelles: structure and dynamics," 2013.
- [109] M. F. Zambaux *et al.*, "Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method," *J. Control. Release*, vol. 50, no. 1–3, pp. 31–40, 1998.
- [110] C. Tanford, "Theory of micelle formation in aqueous solutions," *J. Phys. Chem.*, vol. 78, no. 24, pp. 2469–2479, 1974.
- [111] I. M. D. Martins, "Microencapsulation of Thyme Oil by Coacervation: Production,

- Characterization and Release Evaluation,” pp. 4–90, 2012.
- [112] T. G. Mason, J. N. Wilking, K. Meleson, C. B. Chang, and S. M. Graves, “Nanoemulsions: Formation, structure, and physical properties,” *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 18, no. 41, pp. 635–666, 2006.
- [113] K. S. Mayya, A. Bhattacharyya, and J. F. Argillier, “Micro-encapsulation by complex coacervation: Influence of surfactant,” *Polym. Int.*, vol. 52, no. 4, pp. 644–647, 2003.
- [114] I. Migneault, C. Dartiguenave, M. J. Bertrand, and K. C. Waldron, “Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking,” *Biotechniques*, vol. 37, no. 5, pp. 790–802, 2004.
- [115] E. Fuguet, C. van Platerink, and H. G. Janssen, “Analytical characterisation of glutardialdehyde cross-linking products in gelatine-gum arabic complex coacervates,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 604, no. 1, pp. 45–53, 2007.
- [116] K. R. Juvonen *et al.*, “Crosslinking with transglutaminase does not change metabolic effects of sodium caseinate in model beverage in healthy young individuals,” *Nutr. J.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–12, 2012.
- [117] D. Arnold, “Cooking Issues,” *Harvard Lect.*

ANEXO:

Publicaciones y participación en congresos

10. ANEXO

10.1. ARTÍCULOS PUBLICADOS

Autor/es: Fabricio Maestá Bezerra; Óscar García Carmona; Carlos García Carmona; Manuel J. Lis Arias; Flavio Faria de Moraes	
Grupos de investigación y universidades vinculadas: INTEXTTER-UPC; State University of Maringa; Federal University of Technology – Parana.	
Título: Controlled release of microencapsulated citronella essential oil on cotton and polyester matrices	
Revista (título, volumen, página inicial-final): Cellulose, Volume 23, Issue 2, 1459–1470	
ISSN: 0969-0239	Año: 2016
Agencia de impacto: JCR 2017 Science	Cuartil: Q1
Índice de impacto: 3,809	Número de citas: 17
URL del texto: https://link.springer.com/article/10.1007/s10570-016-0882-5	

Autor/es: Fabricio Maestá Bezerra; Manuel J. Lis Arias; Óscar García Carmona; Carlos García Carmona; Murilo Pereira Moisés; Gisella Maria Zanin; Flávio Faria Moraes.	
Grupos de investigación y universidades vinculadas: INTEXTTER-UPC; State University of Maringa; Federal University of Technology – Parana.	
Título: Assessment of the delivery of citronella oil from microcapsules supported on wool fabrics	
Revista (título, volumen, página inicial-final): Powder Technology, 1 , 775-782	
ISSN: 0032-5910	Año: 2018
Agencia de impacto: JCR 2017 Science	Cuartil: Q1
Índice de impacto: 3,230	Número de citas: 1
URL del texto: https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.11.001	

Autor/es: Manuel J. Lis Arias; Luisa Coderch; Meritxell Martí; Cristina Alonso; Óscar García Carmona; Carlos García Carmona; Fabricio Maestá Bezerra.	
Grupos de investigación y universidades vinculadas: INTEXTER-UPC; IQAC-CSIC; Textile Engineering Dept., Federal Technological University of Paraná.	
Título: Vehiculation of Active Principles as a Way to Create Smart and Biofunctional Textiles	
Revista (título, volumen, página inicial-final): Materials 2018, 11, 2152	
ISSN: 1996-1944	Año: 2018
Agencia de impacto: JCR 2017 Science	Cuartil: Q2
Índice de impacto: 2,467	Número de citas: 0
URL del texto: https://link.springer.com/article/10.1007/s10570-016-0882-5	

Autor/es: Carlos García Carmona; Manuel J. Lis Arias; Óscar García Carmona; Fabricio Maestá Bezerra; Marc Pallarès Andreu; Noelia de la Cruz Díaz	
Grupos de investigación y universidades vinculadas: GDE I+D+I; Chemical Engineering Dept. ESEIAAT. UPC; Federal University of Technology – Parana.	
Título: Microencapsulation Yield Assessment Using TGA.	
Revista (título, volumen, página inicial-final): Journal of Mineral, Metal and Material Engineering, núm. 5, 1-11	
ISSN: 2414-2115	Año: 2019
Agencia de impacto: SIS	Cuartil:
Índice de impacto:	Número de citas: 0
URL del texto: http://www.scientificarray.org/jmmme-v5a1/	

Autor/es: Fabricio Maestá Bezerra; Óscar García Carmona; Carlos García Carmona; André Mathias Souza Plath; Manuel J. Lis Arias.	
Grupos de investigación y universidades vinculadas: Chemical Engineering Dept. ESEIAAT. UPC; Federal University of Technology – Parana.	
Título: Biofunctional wool using β -cyclodextrins as vehiculizer of citronella oil.	
Revista (título, volumen, página inicial-final): Process Biochemistry, vol. 77, 151-158	
ISSN: 1359-5113	Año: 2018
Agencia de impacto: JCR 2017 Science	Cuartil: Q2
Índice de impacto: 2,616	Número de citas: 0
URL del texto: https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.11.018	

Autor/es: Fabricio Maestá Bezerra; Óscar García Carmona; Carlos García Carmona; Manuel J. Lis Arias.	
Grupos de investigación y universidades vinculadas: Chemical Engineering Dept. ESEIAAT. UPC; Federal University of Technology – Parana.	
Título: Inclusion complexes of citronella oil with β -Cyclodextrin for controlled release in biofunctional textiles.	
Revista (título, volumen, página inicial-final): polymers, vol. 10, 1324	
ISSN: 2073-4360	Año: 2018
Agencia de impacto: JCR 2017 Science	Cuartil: Q1
Índice de impacto: 2,935	Número de citas: 1
URL del texto: https://doi.org/10.3390/polym10121324	

10.2. CAPÍTULOS DE LIBRO PUBLICADOS

Autor/es: Manuel J Lis; Luisa Coderch; Meritxell Martí; Cristina Alonso; Óscar García; Carlos García; Fabricio Maesta	
Grupos de investigación y universidades vinculadas: INTEXTER-UPC; IQAC-CSIC; Federal University of Technological - Paraná	
Título: Smart and Biofunctional Textiles: An Alternative for Vehiculation of Active Principles.	
Book: Top 5 Contributions in Materials Science: 3rd Edition	
ISBN: 978-93-88170-33-8	Año: 2019
URL del texto: http://www.avidscience.com/wp-content/uploads/2017/10/Smart-and-Biofunctional-Textiles-An-Alternative-for-Vehiculation-of-Active-Principles.pdf	

10.3. PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

Autor/es: Juliana Fiedlerde Oliveira, Óscar García Carmona, Carlos García Carmona, Marc Pallarès Andreu, Manuel Lis, Fabrício Maestá Bezerra, Ariana Roldán, Noelia de la Cruz.	
Título: Microencapsulación de aceite de aloe vera vía coacervación simple y su aplicación en textiles.	
Congreso: 43º Simposium AEQCT	
Ámbito del congreso: Nacional	
Tipo de participación: Póster	
Ciudad: Terrassa	Año: 2018

Autor/es: Óscar García Carmona, Carlos García Carmona, Marc Pallarès Andreu, Manuel Lis, Fabrício Maestá Bezerra, Ariana Roldán, Noelia de la Cruz, Eulogio Almudevar.	
Título: Tejidos inteligentes mediante la incorporación de microcápsulas	
Congreso: 43º Simposium AEQCT	
Ámbito del congreso: Nacional	
Tipo de participación: Póster	
Ciudad: Terrassa	Año: 2018

Autor/es: Carlos García Carmona; Óscar García Carmona; Manel Jose Lis Arias.	
Título: Assessment of the yield using TGA.	
Congreso: 13 th Mediterranean congress of chemical engineering	
Ámbito del congreso: Nacional	
Tipo de participación: Póster	
Ciudad: Barcelona	Año: 2014

Autor/es: Óscar García Carmona, Carlos García Carmona, Manuel Lis.	
Título: Interfacial tension influence on fragrance microencapsulation.	
Congreso: 13 th Mediterranean congress of chemical engineering	
Ámbito del congreso: Nacional	
Tipo de participación: Póster	
Ciudad: Barcelona	Año: 2014

Autor/es: Óscar García Carmona; Carlos García Carmona; Manuel José Lis; Marina Cano; Ariadna Roldán; Noelia de la Cruz; Fabricio Maesta; Marc Pallarès.	
Título: Interfacial tension influence on fragrance microencapsulation.	
Congreso: 13 th Mediterranean congress of chemical engineering	
Ámbito del congreso: Nacional	
Tipo de participación: Póster	
Ciudad: Barcelona	Año: 2014