



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA

*APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE ENCAPSULACIÓN
PARA LA INCORPORACIÓN DE ADITIVOS EN LA
FORMULACIÓN DE DETERGENTES*

Tesis Doctoral

2023

Ismael Lobato Guarnido

Departamento de Ingeniería Química

Directores

Mercedes Fernández Serrano

Germán Luzón González

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Ismael Lobato Guarnido
ISBN: 978-84-1195-282-8
URI: <https://hdl.handle.net/10481/91088>

El doctorando / The *doctoral candidate* [**Ismael Lobato Guarnido**] y los directores de la tesis / and the thesis supervisor/s: [**Mercedes Fernández Serrano y Germán Luzón González**]

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

/

Guarantee, by signing this doctoral thesis, that the work has been done by the doctoral candidate under the direction of the thesis supervisor/s and, as far as our knowledge reaches, in the performance of the work, the rights of other authors to be cited (when their results or publications have been used) have been respected.

Lugar y fecha / Place and date:

Granada a 21 de diciembre de 2023

Director/es de la Tesis / *Thesis supervisor/s*;

Doctorando / *Doctoral candidate*:

Firma / Signed

Firma / Signed

INDICE

RESUMEN	11
SUMMARY	15
I. INTRODUCCIÓN	19
1. ANTECEDENTES	19
2. ADITIVOS DE INTERÉS PARA ENCAPSULACIÓN	22
3. ENCAPSULACIÓN	23
3.1. MECANISMO DE LIBERACIÓN DESDE EL INTERIOR DE LAS CÁPSULAS	24
3.2. TIPOS DE EMULSIONES	27
4. EMULSIONES DE PICKERING	27
5. MATERIALES COLOIDALES	31
6. SINERGIAS ENTRE ADITIVOS ENCAPSULADOS Y RECUBRIMIENTOS	35
7. USO DE ACEITES ESENCIALES EN LA FORMULACIÓN DE DETERGENTES	37
8. HIPÓTESIS DE PARTIDA Y JUSTIFICACIÓN	38
II. OBJETIVOS DE LA TESIS	41
III. MATERIALES	43
IV. METODOLOGÍA	47
1. CARACTERIZACIÓN	47
1.1. MEDIDA DE TAMAÑO DE PARTÍCULAS Y POTENCIAL ZETA	47
1.2. TENSIÓN INTERFACIAL Y ÁNGULO DE CONTACTO	49
1.3. ENSAYO DE BIODEGRADABILIDAD	52
1.3.1. Ensayo estático	52
1.3.2. Ensayo respirométrico	53
1.4. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA EMPLEADAS	53
1.4.1. Microscopía óptica	53
1.4.2. Microscopía electrónica de transmisión, TEM (Transmission Electron Microscopy)	54
1.4.3. Microscopía electrónica de barrido, SEM (Scanning Electron Microscopy)	54
1.5. ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (TGA)	55

2. PROCESOS DE HOMOGENEIZACIÓN EMPLEADOS PARA LA FORMACIÓN DE EMULSIONES	56
2.1. Sonda de ultrasonidos	56
2.2. Mezclado de alta velocidad y cizalla	57
2.3. Vortex	58
2.4. Homogeneizador de alta presión	58
3. SEPARACIÓN DE FASES	58
4. MEDIDA DE ABSORBANCIA	58
4.1. Espectrofotómetro	58
4.2. Lector de placas	59
5. CONTROL DE pH DE LAS REACCIONES DE REDUCCIÓN DE UN METAL	59
6. MECANISMOS DE LIBERACIÓN	59
6.1. Reómetro	59
6.2. Sonda de ultrasonidos	59
7. OPTIMIZACIÓN DE LOS MECANISMOS DE FORMACIÓN DE CÁPSULAS CON NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE AEROSIL® A200	60
7.1. Procedimiento de encapsulación con nanopartículas de sílice AEROSIL® A200	60
7.1.1. Metodología para la formación de las cápsulas	60
7.1.2. Sustitución del disolvente orgánico en la formación de la emulsión	61
7.1.3. Recubrimiento inorgánico con CaCO ₃	62
7.1.4. Ensayos de liberación	63
8. PROCESO DE ENCAPSULACIÓN UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE LUDOX	64
8.1. OBJETIVO	64
8.2. PREPARACIÓN DE LAS CÁPSULAS DE SÍLICE	65
8.3. ADICIÓN DE UNA SAL INSOLUBLE EN EL PROCESO DE FORMACIÓN DE LAS CÁPSULAS	67
8.4. ENSAYOS DE LIBERACIÓN	67
8.5. RECUBRIMIENTO CON SALES INORGÁNICAS	67
8.5.1. Carbonato sódico	68
8.5.2. Carbonato cálcico	68
8.6. RECUBRIMIENTO METÁLICO	69
8.6.1. Reducción del metal a un pH controlado	69
8.6.2. Preparación de las muestras para la formación de un recubrimiento metálico	73
8.7. RECUBRIMIENTO DE LAS CÁPSULAS CON PARTÍCULAS DE QUITOSANO	75
8.8. LIBERACIÓN DEL TINTE TOTAL RETENIDO MEDIANTE OTROS MECANISMOS DE LIBERACIÓN	76
8.8.1. Adición de una disolución ácida	76

8.8.2. Aplicación de ultrasonidos	76
9. PROCESO DE ENCAPSULACIÓN UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE LÁTEX	77
9.1. OBJETIVO	77
9.2. FORMACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE LÁTEX	77
9.2.1. Reactivos de la polimerización	77
9.2.2. Procedimiento de síntesis	81
9.3. ENSAYO DE BIODEGRADABILIDAD	84
9.4. ENCAPSULACIÓN CON LAS NANOPARTÍCULAS DE LÁTEX SINTETIZADO	84
9.4.1. Método inclusión etanol en aceite de girasol	84
9.4.2. Formación de cápsulas de látex con Silverson	85
9.5. ENSAYOS DE LIBERACIÓN CON ENZIMA PROTEASA	86
9.5.1. Determinación de la actividad enzimática mediante el método de la azocaseína	86
9.5.2. Determinación de la concentración de la enzima mediante el método BCA	87
9.5.3. Ensayo de liberación de enzima proteasa por dilución	88
9.6. ENSAYOS DE RECUBRIMIENTO METÁLICO	88
9.6.1. Método de formación de un recubrimiento con plata	89
9.6.2. Método de formación de un recubrimiento con cobre	89
9.7. ENSAYOS DE LIBERACIÓN POR DILUCIÓN DE LAS CÁPSULAS CON TINTE Y RECUBRIMIENTO METÁLICO	91
9.8. RUPTURA DE LAS CÁPSULAS MEDIANTE OTROS MECANISMOS DE LIBERACIÓN	91
10. FORMACIÓN DE CÁPSULAS POR COACERVACIÓN COMPLEJA DE QUITOSANO Y GOMA ARÁBIGA MEDIANTE SECADO POR ATOMIZACIÓN	91
10.1. FORMACIÓN COMPLEJOS QUITOSANO – GOMA ARÁBIGA. COACERVACIÓN COMPLEJA	91
10.2. ENCAPSULACIÓN	92
10.3. DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE LAS CÁPSULAS FORMADAS	92
10.4. EFICACIA ENCAPSULACIÓN AEO	93
<u>V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</u>	<u>95</u>
1. EXPERIMENTACIÓN CON PARTÍCULAS DE SÍLICE	95
1.1. AEROSIL®200	95
1.1.1. Caracterización	95
1.1.2. Comportamiento medioambiental	101
1.1.3. Encapsulación	102
1.1.4. Conclusión	108
1.2. LUDOX® SM	109
1.2.1. Caracterización	109

Índice

1.2.2.	Justificación de variables que afectan en la formación de las cápsulas	113
1.2.3.	Objetivo	113
1.2.4.	Caracterización de las cápsulas formadas	114
1.2.5.	Adición de Span 80 en la fase orgánica de aceite de girasol	116
1.2.6.	Caracterización de las cápsulas formadas mediante SEM	118
1.2.7.	Adición de sal para recubrimiento inorgánico	120
1.2.8.	Cambio sistema de homogeneización	122
1.2.9.	Perfil de liberación	123
1.2.10.	Eficacia de encapsulación de las cápsulas formadas	125
1.2.11.	Formación de una capa adicional de recubrimiento	127
1.2.12.	Recubrimiento con quitosano	141
1.2.13.	Liberación de las cápsulas con recubrimiento	143
1.2.14.	Liberación por otros mecanismos	146
2.	EXPERIMENTACIÓN CON LÁTEX	148
2.1.	CARACTERIZACIÓN	148
2.1.1.	Tamaño	148
2.1.2.	Análisis termogravimétrico	149
2.1.3.	Potencial zeta	150
2.1.4.	Ángulo de contacto	151
2.1.5.	Tensión interfacial	152
2.1.6.	Ensayo de biodegradabilidad	154
2.2.	JUSTIFICACIÓN DE VARIABLES QUE AFECTAN EN LA FORMACIÓN Y ESTABILIDAD DE LA EMULSIÓN	155
2.3.	ENCAPSULACIÓN	155
2.3.1.	Formación de las cápsulas con adición de etanol para la agregación de las partículas de látex	156
2.3.2.	Homogeneización de alta intensidad	161
2.3.3.	Recubrimiento metálico	163
2.3.4.	Ensayos de liberación y eficacia de encapsulación	167
2.3.5.	Liberación por otros mecanismos	169
2.3.6.	Sinergia del recubrimiento metálico	170
2.4.	CONCLUSIONES	171
3.	CHITOSAN – ARABIC GUM EXPERIMENTATION	171
3.1.	OBJECTIVE	171
3.2.	FORMATION OF CS-GA NANOPARTICLES AND ZETA POTENTIAL	172
3.3.	PARTICLE SIZE	174
3.4.	CONTACT ANGLE	175

3.5.	INTERFACIAL TENSION	176
3.5.1.	Influence of nanoparticles concentration	177
3.5.2.	Influence of polymer ratio	178
3.6.	BIODEGRADABILITY TEST	179
3.7.	ENCAPSULACIÓN	181
3.7.1.	Characterization of formed capsules	181
3.7.2.	AEO Encapsulation efficiency	184
3.8.	CONCLUSIONS	185
<u>VI.</u>	<u>CONCLUSIONES</u>	<u>187</u>
	<u>CONCLUSIONS</u>	<u>191</u>
<u>VII.</u>	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>194</u>

RESUMEN

La industria de detergentes se enfrenta a unos estándares de calidad cada vez más rigurosos, caracterizados por mayores requisitos de eficacia en el lavado y una selectividad mejorada para la eliminación de suciedades específicas. Dentro de este contexto destaca cada vez más importancia a la sostenibilidad ambiental debido al uso masivo y continuo de los detergentes tanto en entornos domésticos como industriales.

La integración de aditivos en las formulaciones se convierte en una estrategia crucial para conferir un valor añadido al producto. Sin embargo, muchos de los aditivos esenciales para mejorar las prestaciones de los detergentes son susceptibles a la inestabilidad, ya sea debido a estímulos físicos externos o a la incompatibilidad intrínseca con otros compuestos presentes en la formulación del detergente.

En respuesta a estos desafíos, la utilización de las técnicas de encapsulación emerge como una herramienta clave para la protección de sustancias sensibles presentes en detergentes. Este enfoque innovador implica confinar estas sustancias en el interior de partículas sólidas, ofreciendo soluciones efectivas sin el empleo de altas cantidades de energía o disolventes orgánicos asociados con la formación de emulsiones para la creación de cápsulas. Este método no solo optimiza la eficiencia del proceso, sino que también demuestra ser más respetuoso con el medio ambiente.

La encapsulación de aditivos en las formulaciones de detergentes presenta ventajas adicionales al permitir una liberación controlada de estos compuestos desde el interior de las cápsulas. Este control se logra mediante un estímulo externo, lo que posibilita una dosificación precisa en el momento oportuno durante el ciclo de lavado. Esta estrategia no solo mejora la estabilidad de los aditivos, sino que también contribuye significativamente a la sostenibilidad ambiental al evitar la liberación descontrolada de sustancias potencialmente perjudiciales. En conjunto, la encapsulación se presenta como una solución integral que combina eficacia técnica y consideraciones medioambientales en el desarrollo de detergentes avanzados.

La presente Tesis Doctoral se divide seis partes bien diferenciadas. La puesta en contexto y problemática existente que genera la necesidad del desarrollo de este trabajo se presenta en la Introducción. Seguidamente se expone el objetivo general y los objetivos específicos para su consecución. En el apartado de Materiales se presentan los compuestos químicos empleados para los diferentes procedimientos seguidos. Tras esto,

en el apartado de Metodología, se exponen las técnicas utilizadas, tanto para el modo de empleo de los equipos usados, como para la formación de las cápsulas, su caracterización, técnicas de recubrimiento y liberación, clasificadas según el material empleado para la formación de las cápsulas. De una forma similar, en el apartado de Discusión de Resultados, se presentan los resultados obtenidos, ordenados de la misma forma que en el apartado anterior y divididos en tres capítulos, en el primero se ensayan nanopartículas de sílice, en el segundo látex y en el tercero quitosano y goma arábiga. Por último, se presentan las principales conclusiones extraídas.

De esta forma, el objetivo principal de la tesis es la optimización de diferentes metodologías para la formación de cápsulas de diferentes materiales para la incorporación de aditivos de interés para su inclusión en formulaciones detergentes. Para la consecución de este objetivo, se siguen una serie de objetivos específicos como explorar diferentes técnicas y materiales que reúnan todos los requisitos necesarios para la obtención de cápsulas capaces de retener diferentes aditivos y conseguir su liberación controlada, con la aplicación de recubrimientos que sean compatibles con el material de la pared de la cápsula y desempeñen una doble función; en primer lugar, proporcionar impermeabilización a la cápsula y, en segundo lugar, conferir propiedades antimicrobianas. Finalmente se trata de cuantificar la efectividad de la encapsulación, determinando la cantidad de encapsulado que se puede liberar desde el interior de las cápsulas.

Como se ha explicado, tanto la metodología como los resultados de este trabajo, se presentan ordenados según el material coloidal utilizado para la estabilización de las emulsiones de Pickering y formación de las cápsulas.

En primer lugar, se ensaya la capacidad de nanopartículas de sílice de distinta naturaleza para formar cápsulas a partir de emulsiones. En el caso de las Aerosil® A200, aunque se consigue la formación de las cápsulas, presentan una alta inestabilidad, por lo que se recurre al uso de nanopartículas de sílice Ludox®. El objetivo es llevar a cabo la encapsulación de un agente biocida como el Bronopol. En primera instancia se consigue obtener cápsulas porosas capaces de transportar el compuesto activo, pero sin retenerlo en su interior. Por ello, se lleva a cabo el estudio de la aplicación de recubrimientos de distinta naturaleza para conseguir la liberación controlada del biocida, alcanzando los mejores resultados con la utilización de quitosano para la formación de una película alrededor de las cápsulas de sílice Ludox®.

El siguiente paso es el empleo de un polímero sintético como el látex para la formación de cápsulas con el objetivo de encapsular enzimas. Se lleva a cabo la síntesis de las nanopartículas partiendo de tres monómeros y se prueban dos métodos diferentes para la formación de coloidosomas. Tras comprobar la permeabilidad de las cápsulas en su ensayo por dilución, se requiere la formación de una capa de recubrimiento adicional para conseguir el sellado de éstas. La retención total del compuesto interno se consigue con la aplicación de recubrimientos metálicos de cobre y plata, quedando protegido el núcleo. Una vez provocada la liberación controlada mediante la ruptura de la pared de las cápsulas se consiguen altas eficacias de encapsulación.

Por último, para la encapsulación de aceite esencial de orégano se emplean nanopartículas híbridas de quitosano y goma arábica sintetizadas mediante la optimización de las condiciones en la que se lleva a cabo la coacervación compleja de los dos biopolímeros. Se llevan a cabo medidas del tamaño, ángulo de contacto y tensión interfacial de los complejos de quitosano y goma arábica formados para facilitar la formación de emulsiones de Pickering que dan lugar a las cápsulas mediante secado por atomización en las mejores condiciones. También se evalúa el aceite contenido en el interior de las cápsulas mediante la diferencia entre el aceite extraído de la superficie de las cápsulas y, por otro lado, el aceite total presente en estas, mediante su disolución total en un medio ácido. El escenario óptimo se consigue usando las nanopartículas CS-GA 1-2 a una concentración del 2%wt, logrando un ángulo de contacto de 89.1 grados, que es ideal para la formación de una emulsión de aceite en agua, obteniendo cápsulas de unos 2.5 μm , acompañadas de una eficacia de encapsulación del 60%.

Un punto importante en la formulación de detergentes es la utilización de compuestos que permitan una alta biodegradabilidad para evitar la limitación de uso por unas normativas cada vez más restrictivas. Por ello, se lleva a cabo el estudio de la biodegradabilidad y efectos sobre el medio ambiente de todas las nanopartículas empleadas para la formación de cápsulas. Con esto, los datos de este estudio aportarán conocimientos fundamentales sobre las nanopartículas empleadas, y los resultados presentados serán útiles para futuras aplicaciones en formulaciones de detergentes respetuosos con el medio ambiente.

En general, de los estudios llevados a cabo en la Tesis Doctoral se puede concluir que se ha conseguido optimizar las técnicas de producción de cápsulas con los diferentes materiales empleados, sílice, látex y quitosano y goma arábica, para la inclusión de

Resumen

enzimas, un agente biocida y aceite esencial de orégano, respectivamente. Se ha conseguido, además, que, con el uso de la plata, el cobre y el quitosano como materiales formadores de la capa de recubrimiento de las cápsulas permite aprovechar también su capacidad antimicrobiana unido a la de estabilización.

SUMMARY

The detergent industry faces increasingly stringent quality standards characterized by higher washing effectiveness requirements and improved selectivity for the removal of specific soils. Within this context, the importance of environmental sustainability is gaining prominence due to the widespread and continuous use of detergents in both domestic and industrial settings.

The incorporation of additives into formulations becomes a crucial strategy to add value to the product. However, many of the essential additives to enhance detergent performance are susceptible to instability, either due to external physical stimuli or intrinsic incompatibility with other compounds present in the detergent formulation.

In response to these challenges, the utilization of encapsulation techniques emerges as a key tool for protecting sensitive substances present in detergents. This innovative approach involves confining these substances within solid particles, offering effective solutions without the use of high amounts of energy or organic solvents associated with emulsion formation for capsule creation. This method not only optimizes process efficiency but also proves to be more environmentally friendly.

Encapsulation of additives in detergent formulations presents additional advantages by allowing controlled release of these compounds from inside the capsules. This control is achieved through an external stimulus, enabling precise dosing at the opportune moment during the washing cycle. This strategy not only improves the stability of additives but also significantly contributes to environmental sustainability by avoiding uncontrolled release of potentially harmful substances. Overall, encapsulation emerges as a comprehensive solution that combines technical efficiency and environmental considerations in the development of advanced detergents.

This Doctoral Thesis is divided into six well-defined parts. The introduction presents the contextualization and existing issues that generate the need for this work. Subsequently, the general objective and specific objectives for its achievement are outlined. The Materials section presents the chemical compounds used for different procedures. Following this, the Methodology section explains the techniques used for equipment usage, capsule formation, characterization, coating techniques, and release, classified according to the material used for capsule formation. Similarly, in the Results Discussion section, the obtained results are presented, organized in the same manner as

the previous section and divided into three chapters: the first chapter tests silica nanoparticles, the second latex, and the third chitosan and Arabic gum. Finally, the main conclusions drawn are presented.

The main objective of the thesis is the optimization of different methodologies for the formation of capsules using various materials to incorporate additives of interest for inclusion in detergent formulations. To achieve this objective, a series of specific objectives are followed, such as exploring different techniques and materials that meet all the necessary requirements for obtaining capsules capable of retaining different additives and achieving their controlled release. This includes applying coatings compatible with the capsule wall material, serving a dual function: providing waterproofing to the capsule and imparting antimicrobial properties. Finally, the effectiveness of encapsulation is quantified by determining the amount of encapsulated material that can be released from inside the capsules.

As explained, both the methodology and the results of this work are presented in order according to the colloidal material used for stabilizing Pickering emulsions and capsule formation.

Firstly, the ability of different types of silica nanoparticles to form capsules from emulsions is tested. In the case of Aerosil™ A200, although capsule formation is achieved, they exhibit high instability, leading to the utilization of Ludox™ silica nanoparticles. The objective is to encapsulate a biocide agent like Bronopol. Initially, porous capsules capable of transporting the active compound are obtained, but without retaining it inside. Hence, the study focuses on applying coatings of different natures to achieve controlled release of the biocide, achieving the best results using chitosan to form a film around the Ludox™ silica capsules.

The next step involves the use of a synthetic polymer like latex for capsule formation with the aim of encapsulating enzymes. Nanoparticles synthesis is carried out using three monomers, and two different methods are tested for colloid formation. After confirming capsule permeability in dilution tests, additional coating layers are required to seal them. Total retention of the internal compound is achieved by applying copper and silver metallic coatings, protecting the core. Once controlled release is induced by rupturing the capsule walls, high encapsulation efficiencies are attained.

The encapsulation of bioactive agents through the utilization of biodegradable nanoparticles is a topic of considerable scientific interest. In this study, microcapsules composed of chitosan (CS) and Arabic gum (GA) nanoparticles were synthesized, encapsulating oregano essential oil (OEO) through Pickering emulsions and subsequent spray drying. The optimization of hybrid chitosan and Arabic gum (CS–GA) nanoparticle formation was carried out via complex coacervation, followed by an assessment of their behavior during the formation of the emulsion. Measurements of the size, contact angle, and interfacial tension of the formed complexes were conducted to facilitate the development of Pickering emulsions for encapsulating the oil under the most favorable conditions. The chitosan–Arabic gum capsules were physically characterized using scanning electron microscopy and fitted to the Beerkan estimation of soil transfer (BEST) model to determine their size distribution. Finally, the OEO encapsulation efficiency was also determined. The optimum scenario was achieved with the CS–GA 1–2 capsules at a concentration of 2% wt, featuring a contact angle of 89.1 degrees, which is ideal for the formation of oil/water (O/W) emulsions. Capsules of approximately 2.5 μm were obtained, accompanied by an encapsulation efficiency of approximately 60%.

An important point in detergent formulation is the utilization of compounds that allow high biodegradability to avoid limitations imposed by increasingly restrictive regulations. Therefore, a study on the biodegradability and environmental effects of all nanoparticles used for capsule formation is conducted. This study aims to provide fundamental insights into the employed nanoparticles, and the presented results will be valuable for future applications in environmentally friendly detergent formulations.

Overall, from the studies conducted in the doctoral thesis, it can be concluded that the optimization of capsule production techniques has been achieved using various materials: silica, latex, chitosan, and Arabic gum for the inclusion of enzymes, a biocide agent, and oregano essential oil, respectively. Furthermore, it has been demonstrated that the use of silver, copper, and chitosan as capsule coating materials not only allows their antimicrobial capacity but also contributes to stabilization.

I. INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes

Muchos de los ingredientes activos con alta eficacia en el laboratorio fallan cuando son formulados en productos a escala industrial, normalmente debido a problemas de estabilidad o incompatibilidad con otros ingredientes. Un ejemplo son las formulaciones líquidas de lavado con enzimas. Las enzimas solas son capaces de degradar grasas y manchas en la ropa o en superficies duras, pero cuando se incorporan en detergentes, la mezcla compleja de tensioactivos provoca su desnaturalización y pérdida de eficacia en la limpieza. Sin embargo, mediante técnicas innovadoras, es posible encapsular ciertos ingredientes, para proporcionarles protección dentro de las formulaciones detergentes, mejorando así el rendimiento final.

Para lograr este objetivo, los ingredientes deben protegerse de un entorno hostil (luz, UV, pH, presencia de moléculas incompatibles) y liberarse en el momento en que se requieren para lograr su efecto. En este campo, los polímeros sintéticos o biológicos, lípidos y nanomatrices porosas cerradas se utilizan como soportes inteligentes e innovadores para lograr un almacenamiento efectivo y la liberación controlada de ingredientes activos. Estas cápsulas se pueden definir como dispositivos nanoscópicos en los que el suministro puede activarse mediante un estímulo seleccionado que controla el estado de la “puerta”, abierta o cerrada, es decir, confinado o liberado. Estos conjuntos inteligentes y funcionales son excelentes candidatos para el diseño de vehículos con liberación cero antes de la aparición del estímulo objetivo. Este estímulo puede ser químico, como el pH, la presencia de aniones, pequeñas moléculas redox, antígenos y enzimas, o físicos, como la luz o la temperatura.

Existen numerosos métodos patentados para minimizar los problemas de incompatibilidad de las enzimas en las formulaciones detergentes que incluyen la reducción de la actividad de agua empleando disolventes o aditivos químicos como estabilizadores o inhibidores enzimáticos[1,2]. Los métodos de inmovilización de enzimas utilizan adsorción química, unión covalente, agregados enzimáticos reticulados, atrapamiento y encapsulación [3]. Muchas de las técnicas de inmovilización presentan problemas como largos tiempos de preparación, procedimientos con muchos y tediosos pasos, pérdida de la actividad enzimática durante la inmovilización y bajas tasas de recuperación y reutilización de la enzima.

Entre los métodos de atrapamiento/encapsulación, el método *sol-gel* es el más común, el cual implica la inmovilización de la enzima en un gel de sílice [4]. Mediante este método la enzima permanece estable durante largos periodos de tiempo, es estable en disolventes orgánicos y permite que las enzimas se puedan reutilizar. Sin embargo, con este método las enzimas solo pueden encapsularse durante la síntesis del *sol-gel*, para lo que se necesitan largos tiempos de preparación y grandes cantidades de disolventes orgánicos que conllevan la desnaturalización de la enzima y baja eficiencia de encapsulación [5].

La encapsulación ideal de aditivos destinados al uso en formulaciones detergentes requiere que el método sea de bajo coste, fácilmente escalable, que los proteja de tensioactivos y otros componentes durante largos periodos y que su liberación se produzca de manera controlada.

Tabla I.1. Ventajas e inconvenientes de los métodos para producción de cápsulas.

Método	Ventajas	Inconvenientes
Coloidosomas	- Formación por autoensamblaje - Adecuado para encapsular sustancias biológicas - Buen control en la permeabilidad	- Es necesario una carcasa adicional para mejorar la estructura - Riesgo de liberación por carcasa incompleta
Precipitación de polímeros por separación de fases	- Más adecuado para núcleos de aceite - Carcasas relativamente gruesas - Distribución de tamaños pequeña	- Condiciones de humectación críticas para formación de microcápsulas - Se requieren grandes cantidades de disolventes orgánicos
Polimerización interfacial de policondensación	- Adecuado para núcleos de aceite y acuosos - Procedimiento de fabricación simple	Formación de la cápsula controlada por la difusión
Deposición de polielectrolitos capa por capa	- Más común para la formación de núcleos acuosos - Posibilidad de controlar el espesor de la carcasa - Adecuado para encapsular sustancias biológicas	- Procedimiento de fabricación laborioso - La estabilidad depende de los alrededores - Gran tendencia a floculación
Vesículas de copolímero	- Más robusto en relación con los liposomas - Utiliza un dispositivo microcapilar	- Coexisten otras estructuras ordenadas - La estabilidad depende de la composición del copolímero

Actualmente existe una gran variedad de métodos para la producción de microcápsulas dependiendo de la polaridad del núcleo, tamaño de las partículas, grosor y permeabilidad de la pared, velocidad de liberación del contenido del núcleo, propiedades físicas y facilidad de producción [6]. Centrando el interés en la obtención de cápsulas con fase líquida en el núcleo, los métodos más destacados se muestran en la Tabla I.1 [7].

En técnicas de silicificación las enzimas son atrapadas en nanoesferas de gel de sílice, que ofrece importantes ventajas en la encapsulación debido a que es químicamente inerte, mecánicamente estable, biocompatible y con transparencia óptica. En esta técnica,

se suspenden monómeros de silicato en un tampón acuoso que contiene la enzima y una reacción de condensación iniciada mediante una molécula amínica provoca que la sílice forme una cápsula alrededor de la enzima. Este método es rápido, suave, de bajo coste y con un protocolo controlado. Se ha demostrado que la encapsulación mediante técnicas de silicificación bio-inspiradas es un método eficaz para aumentar la estabilidad de las enzimas [8].

Otra alternativa es la encapsulación de enzimas mediante coloidosomas, basados en las emulsiones Pickering, mediante la dispersión de gotas de agua en una fase orgánica formando una emulsión que se estabiliza mediante partículas sólidas que difunden hasta la interfase de los líquidos inmiscibles y permanecen ahí en un estado de equilibrio mecánico. Este tipo de emulsiones se diferencian de las convencionales en que el tensioactivo utilizado como estabilizador se sustituye por nanopartículas sólidas, dando lugar a una estructura del tipo núcleo-coraza. En los últimos años, el desarrollo de la ciencia de materiales ha incrementado la variedad de partículas que se pueden utilizar como estabilizador en las emulsiones de Pickering. Es evidente que las propiedades inherentes de las nanopartículas afectan a la preparación, características y aplicaciones de las emulsiones de Pickering [9], pero también es importante seleccionar el método de sellado más adecuado. En la Figura I.1 se muestran las diferentes vías para obtención de coloidosomas basados en emulsiones de Pickering analizados por Thompson et al. [10].

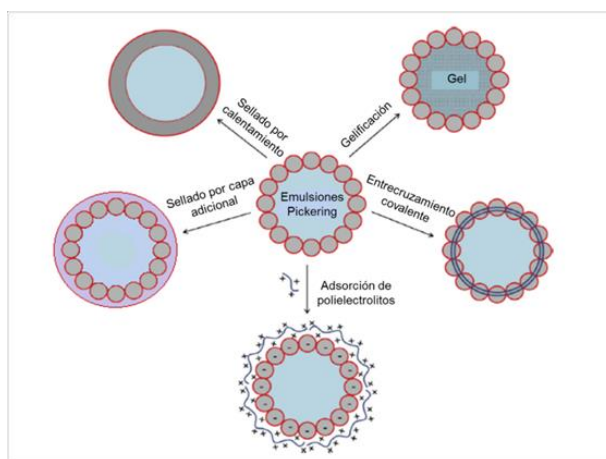


Figura I.1 – Métodos de obtención de Coloidosomas

Además de enzimas, las formulaciones detergentes pueden incorporar otros aditivos como desinfectantes, blanqueantes, antiespumantes, que también pueden interactuar con el resto de los componentes, por lo que también son susceptibles de ser aislados adaptando las técnicas de encapsulación.

2. Aditivos de interés para encapsulación

La encapsulación de aditivos en la formulación de detergentes es una técnica que se utiliza para mejorar la estabilidad, eficacia y liberación controlada de ciertos componentes en los productos detergentes. Al encapsular aditivos en detergentes, se pueden lograr varios objetivos, como prolongar la vida útil del aditivo, protegerlo de interacciones no deseadas con otros componentes, controlar su liberación y mejorar su eficiencia en la aplicación.

Se presentan algunos aditivos interesantes que se pueden encapsular en la formulación de detergentes:

- a) **Fragancias:** La encapsulación de fragancias ayuda a mantener su aroma durante más tiempo, protegiéndolas de la degradación causada por factores como la luz, el calor o la interacción con otros ingredientes del detergente. Esto proporciona una liberación sostenida del aroma, lo que resulta en una experiencia sensorial más duradera para el consumidor.
- b) **Blanqueadores:** Los blanqueadores como el percarbonato de sodio o perborato de sodio pueden encapsularse para protegerlos de la degradación por humedad o interacción con otros componentes del detergente. Esto permite una liberación más controlada del agente blanqueador durante el lavado, aumentando su efectividad y manteniendo su estabilidad.
- c) **Enzimas:** Las enzimas son componentes clave en los detergentes, ya que ayudan a descomponer las manchas y la suciedad. La encapsulación de enzimas las protege de la degradación causada por condiciones adversas, como pH extremos o altas temperaturas, permitiendo una liberación controlada y una mayor eficacia en la eliminación de las manchas.
- d) **Agentes antimicrobianos:** Algunos detergentes contienen agentes antimicrobianos para eliminar bacterias y hongos. La encapsulación de estos agentes puede mejorar su estabilidad y eficacia al protegerlos de la oxidación o la degradación debido a factores ambientales, asegurando una liberación efectiva durante el lavado.
- e) **Aditivos para cuidado de telas:** Componentes como los suavizantes de telas pueden encapsularse para protegerlos de la evaporación prematura o la interacción

con otros ingredientes del detergente, lo que permite una liberación gradual y prolongada para mejorar la suavidad de las prendas lavadas.

- f) **Antiolores:** La encapsulación de los antiolores en detergentes ayuda a mejorar la estabilidad de estos compuestos, evitando su degradación prematura y permitiendo su liberación efectiva durante el ciclo de lavado. Esto contribuye a una eliminación más eficiente y duradera de los olores no deseados en la ropa u otros objetos lavados con los detergentes encapsulados
- g) **Aceites esenciales:** Es una tecnología emergente con un gran potencial para una amplia gama de aplicaciones. Con la encapsulación se ayuda a mejorar su estabilidad y prolongar su vida útil, protegiéndolos del medio externo y evitando la degradación química, térmica y oxidativa. Además, se facilita su aplicación y manipulación, mejorando su eficacia.

La encapsulación de aditivos en detergentes se realiza mediante diversas técnicas, como la encapsulación por pulverización, coacervación, encapsulación lipídica, entre otras, dependiendo de la naturaleza del aditivo y las propiedades deseadas. Proporcionando así beneficios significativos al mejorar la estabilidad, eficacia y experiencia del usuario con los detergentes.

3. Encapsulación

La encapsulación es un proceso mediante el cual un material o mezcla de materiales está cubierto o capturado dentro de otro material o sistema [11]. El material que se recubre o encapsula suele ser un líquido, aunque también puede ser una partícula sólida o gas, y recibe diversos nombres como núcleo, carga, activo, relleno o fase interna. El material que forma el recubrimiento se conoce como material de pared, portador, membrana, carcasa o recubrimiento. La encapsulación se utiliza en diversas industrias con una amplia variedad de técnicas o procesos disponibles.

La selección de los componentes que forman el núcleo y la cáscara de las partículas depende en gran medida del uso que se vaya a dar, por lo tanto, serán aquellos que otorguen sus propiedades específicas. Así, McClements et al. [12] presentan diversas vías de encapsulación dependiendo de la aplicación que se quiera obtener de las cápsulas producidas recogidas en la Figura I.2.

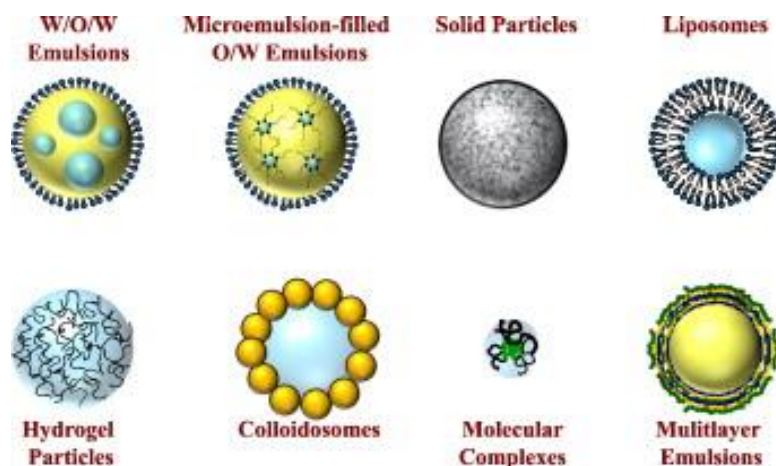


Figura 1.2 – Ejemplos de sistemas de administración coloidal que se pueden usar para encapsular, proteger y administrar componentes bioactivos.[12]

En esta tesis doctoral el objetivo es la formación de cápsulas a partir de coloidosomas, empleando emulsiones como mecanismo para su obtención.

3.1. Mecanismo de liberación desde el interior de las cápsulas

Otro aspecto importante en la encapsulación es el mecanismo de liberación. Dependiendo de la aplicación para la cual se emplean las cápsulas, el núcleo líquido se liberará de una manera u otra. Algunos se liberarán espontáneamente, dependiendo principalmente de la porosidad de la carcasa; otros, por el contrario, deben ser provocados por un cambio en las condiciones experimentales, como cambios de pH, aumento de temperatura, emisión de ultrasonidos o cualquier otra acción que cause la rotura parcial o total de la cápsula.

Según el tiempo y velocidad de liberación del compuesto activo incluido en el interior de las cápsulas, hay varios tipos de perfiles de liberación de cápsulas:

- Liberación inmediata: En este tipo de liberación, el compuesto activo se libera rápidamente de la cápsula, por lo general en cuestión de minutos. Este perfil de liberación se utiliza para compuestos que requieren alcanzar rápidamente una concentración elevada en el medio que se dispersa.
- Liberación sostenida: Aquí, el compuesto interno se libera de la cápsula a una velocidad constante a lo largo de un período prolongado. Este tipo de perfil de liberación se emplea en los casos que se necesita mantener una determinada concentración durante un tiempo extendido, lo que permite reducir la frecuencia de administración y mantener una acción constante.

- Liberación retardada: En este caso, el compuesto del núcleo se libera gradualmente de la cápsula, a menudo durante horas o incluso días. Este tipo de perfil de liberación se aplica a compuestos que pueden causar problemas si se liberan demasiado rápido o se requiere un cierto tiempo para la actuación del activo. En el caso de medicamentos, la liberación retardada permite que el fármaco se libere en áreas específicas del cuerpo o en momentos específicos para evitar irritaciones o para optimizar su efectividad.
- Liberación cero: En este caso, una vez disueltas las cápsulas en un medio determinado, no se lleva a cabo el proceso de liberación del compuesto retenido en el interior de las cápsulas, se forman cápsulas totalmente impermeables que no dejan pasar al elemento interno hacia el exterior. Se trata, pues, de un tipo de cápsulas muy útiles en diversas aplicaciones y con un elevado potencial ya que se puede provocar la liberación controlada de cualquier compuesto mediante un estímulo externo que provoque la ruptura de las cápsulas.

De esta forma, los perfiles de liberación serán de uno u otro tipo atendiendo a diferentes factores como pueden ser el material de la cápsula y su espesor, el tamaño y la forma de la cápsula o el propio contenido de la cápsula.

Los perfiles de liberación de cápsulas se pueden modificar mediante una serie de factores, algunas estrategias para modificar y controlar la liberación de las cápsulas son:

- Modificación de la composición de la cápsula: La modificación de la composición de las cápsulas puede influir en su tasa de liberación. Cambiar la relación de materiales utilizados en la pared de la cápsula puede afectar la permeabilidad y la velocidad de liberación. Por ejemplo, el aumento del compuesto formador de la carcasa puede modificar la difusión de los compuestos encapsulados [13].
- Uso de diferentes tipos de partículas como estabilizadores: La elección de las partículas sólidas que se utilizan para estabilizar las emulsiones de Pickering puede influir en la liberación. Variar el tamaño, forma o naturaleza química de las partículas sólidas puede alterar la velocidad de liberación controlada.
- Modificación de la morfología de las partículas: Cambiar la morfología de las partículas, como su forma o porosidad, puede influir en la velocidad de liberación de las cápsulas. Por ejemplo, las partículas porosas pueden permitir una liberación más rápida en comparación con partículas densas.

- Incorporación de aditivos o modificadores de la superficie: La adición de aditivos a la superficie de las partículas utilizadas en la emulsión de Pickering puede alterar las interacciones entre las partículas y las cápsulas, lo que puede afectar la tasa de liberación controlada.
- Control del tamaño de las cápsulas: El tamaño de las cápsulas puede influir en su velocidad de liberación. Las cápsulas más pequeñas pueden liberar su contenido más rápido que las cápsulas más grandes debido a una mayor relación área/volumen.
- Variación en las condiciones de procesamiento: Cambiar las condiciones durante la síntesis de las emulsiones de Pickering y la encapsulación de cápsulas, como la temperatura, el pH o la velocidad de agitación, puede alterar las propiedades de las cápsulas y su liberación.
- Uso de recubrimientos adicionales: Aplicar recubrimientos adicionales a las cápsulas puede controlar su liberación, creando una capa alrededor de las cápsulas formadas mejorando su protección hacia el medio externo. Los recubrimientos pueden ser de muy distinta naturaleza como son polímeros y biopolímeros [14], lípidos [15,16], compuestos inorgánicos [17,18] u otros materiales que influyan en la difusión de los compuestos encapsulados.

Así pues, una vez definidas las vías disponibles para la modificación de la liberación de los compuestos encapsulados en el interior de las cápsulas, este proceso se puede ajustar a un modelo de liberación de primer orden, expuesto por primera vez por Gibaldi y Feldman [19], presentado en la ecuación (1), expresada en términos de absorbancia ya que la evolución de la concentración del compuesto activo liberada se lleva a cabo mediante técnicas espectrofotométricas, donde A_t es la absorbancia medida en cada instante en el que dura el experimento, A_0 es la concentración máxima de compuesto activo que se alcanza en el proceso de liberación, t hace referencia al tiempo y k es la constante de liberación de primer orden, que se relaciona con la velocidad con la que se libera el compuesto retenido en el interior de las cápsulas y el tiempo en que tarda en liberar una cierta cantidad de aditivo.

$$A_t = A_0(1 - \exp(-k \cdot t)) \quad (1)$$

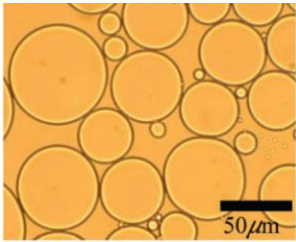
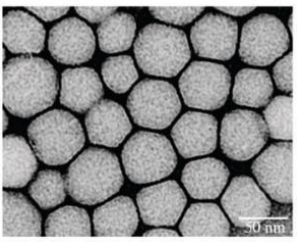
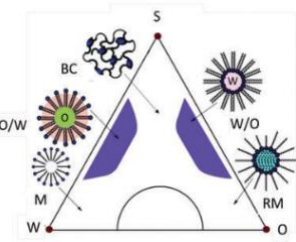
Una vez se diluyen las cápsulas en el medio externo, la fuerza impulsora de la liberación es la diferencia de concentraciones en el interior de las cápsulas y en el medio externo, en un proceso que está controlado por el proceso de difusión del compuesto

activo a través de las partículas que forman la carcasa de las cápsulas. La velocidad de liberación es directamente proporcional al gradiente de concentraciones y la cantidad restante de compuesto que queda por liberar [20]. Mediante la linealización de la ecuación (1) se puede obtener el valor de la constante k en función de la absorbancia y el tiempo.

3.2. Tipos de emulsiones

Antes de proseguir con el desarrollo de formación de las cápsulas, conviene diferenciar entre los diferentes tipos de emulsiones que se pueden obtener y las principales características que presentan cada una de ellas. Según el trabajo realizado por Gupta et al. [21] se puede diferenciar las emulsiones presentes en la Tabla I.2.

Tabla I.2 – Tipos de emulsiones y principales características

	Macroemulsiones	Nanoemulsiones	Microemulsiones
			
Tamaño	1-100 μm	20-500 nm	10-100 nm
Forma	Esférica	Esférica	Esférica, laminar
Estabilidad	Termodinámicamente inestables, débil estabilidad cinética	Termodinámicamente inestables, cinéticamente estable	Termodinámicamente estable
Método de preparación	Métodos de alta y baja energía	Métodos de alta y baja energía	Método de baja energía
Variación de tamaños	Frecuentemente alta (>40%)	Típicamente baja (<10-20%)	Típicamente baja (<10%)

4. Emulsiones de Pickering

Las emulsiones de tipo Pickering se caracterizan por la sustitución de los tensioactivos tradicionalmente usados en la estabilización de las emulsiones por partículas sólidas que se adsorben en la interfase y consiguen estabilizar las emulsiones, Figura I.3. Se produce un fenómeno de adsorción parcial de las partículas sólidas, ya sean

nanopartículas [22,23], microgeles [24,25] u otras partículas coloidales, sobre la fase de la emulsión a la que son más afines, aceite o agua. Las partículas actúan como emulsionantes reduciendo la tensión interfacial entre las dos fases y evitan la coalescencia de las gotas formadas mediante algún mecanismo de dispersión.

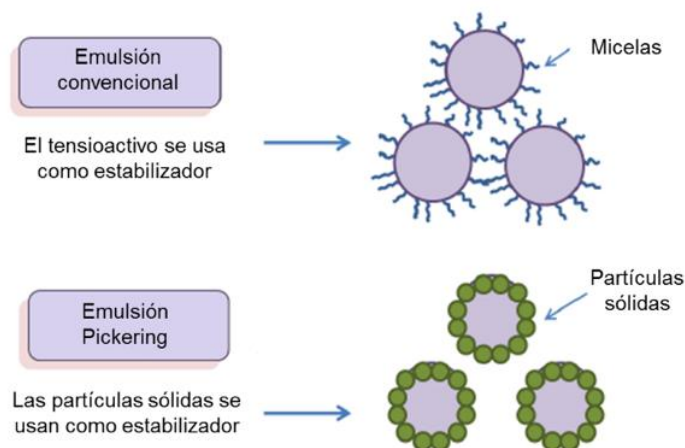


Figura I.3 – Principio de las emulsiones de Pickering

Son varias las ventajas que tienen las emulsiones de Pickering sobre las emulsiones tradicionales estabilizadas con tensioactivos:

1. **Estabilidad mejorada:** Las partículas sólidas proporcionan una estabilización más robusta que los tensioactivos, lo que puede resultar en emulsiones más estables en condiciones extremas como cambios de pH, salinidad, temperatura, etc.
2. **Menor toxicidad:** A diferencia de algunos tensioactivos, las partículas sólidas utilizadas en las emulsiones de Pickering pueden ser menos tóxicas, lo que puede ser beneficioso para aplicaciones en productos de cuidado personal, alimentos, farmacéuticos, entre otros.
3. **Posibles aplicaciones en la liberación controlada de sustancias:** Las emulsiones de Pickering también ofrecen oportunidades para la liberación controlada de componentes, ya que las propiedades de las partículas pueden ajustarse para controlar la velocidad de liberación de sustancias encapsuladas.
4. **Compatibilidad con ciertos ingredientes sensibles:** Algunos ingredientes activos o sensibles pueden no ser compatibles con tensioactivos convencionales, pero podrían ser estables en emulsiones de Pickering debido a la naturaleza de las partículas sólidas utilizadas.

5. Potencial sostenible: Dependiendo de las partículas sólidas utilizadas, las emulsiones de Pickering podrían ofrecer un enfoque más sostenible al evitar el uso de tensioactivos sintéticos.

Las aplicaciones de las emulsiones de Pickering son diversas e incluyen campos como la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica, productos de cuidado personal, entre otros. Su versatilidad y las propiedades específicas que ofrecen hacen que sean un área de investigación y desarrollo interesante en la ciencia de coloides y emulsiones.

Para determinar el tipo de emulsión, O/W o W/O que se va a formar, se recurre a la mojabilidad de las partículas empleadas como estabilizadores en la emulsiones de Pickering. La mojabilidad se determina mediante la medida del ángulo de contacto de las partículas respecto a las fases involucradas en la emulsión, normalmente medida sobre el agua.

Las partículas con un ángulo de contacto inferior a 90° , tienen un carácter hidrofílico, denotando una mayor afinidad a mantenerse en la fase acuosa, mientras que partículas con ángulos mayores a 90° son más hidrofóbicas y tienden a quedarse en la fase orgánica. Por último, partículas con un ángulo de contacto de 90° presentan la misma afinidad por las dos fases, quedando la partícula en un punto intermedio entre la fase acuosa y la fase orgánica.

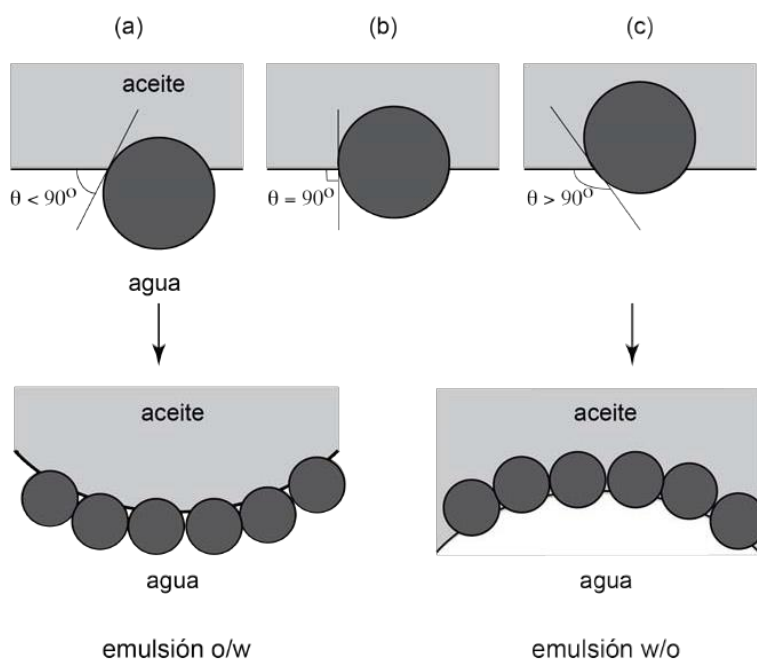


Figura I.4 – Tipo de emulsión formada en función de la mojabilidad de las partículas. Fuente: Cuaderno FIRP SC280R

De esta forma, se requiere que las partículas presenten una mojabilidad intermedia, pero con preferencia ligeramente superior por alguna de las fases, siendo la fase externa aquella que moja en mayor extensión a las partículas. Así pues, como se demuestra en la Figura I.4, las partículas con un ángulo de contacto ligeramente inferior a 90° tienen tendencia a estabilizar emulsiones de aceite en agua y, por otro lado, las partículas con uno levemente superior a 90° , ligeramente lipofílicas, tienen preferencia por estabilizar emulsiones de agua en aceite.

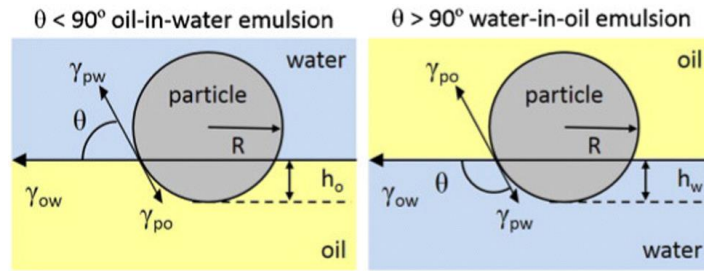


Figura I.5 – Equilibrio de las tensiones interfaciales en el sistema agua-aceite-partículas. Fuente: [26]

Este fenómeno se puede explicar mediante el equilibrio de tensiones interfaciales de las tres fases presentes, agua, aceite y las propias partículas [26]. Una forma de expresar este equilibrio es usando la Ecuación de Young, que indica que el ángulo de contacto es función de las tensiones interfaciales líquido-partícula según la ecuación (2):

$$\cos(\theta_w) = \frac{\gamma_{p-o} - \gamma_{p-w}}{\gamma_{w-o}} \quad (2)$$

Donde γ indica el valor interfacial y los subíndices hacen referencia a partículas (p), agua (w) y aceite (o).

Sin embargo, el proceso de adsorción de las partículas en la interfase y la estabilidad de las emulsiones no sólo depende de la mojabilidad de las partículas, sino que también están fuertemente influenciadas por la tensión interfacial, las interacciones electrostáticas y el tamaño de las partículas[27].

La relación entre la tensión interfacial y las emulsiones de Pickering se encuentra en cómo estas partículas sólidas pueden disminuir la tensión entre dos fases líquidas que no se mezclan, lo que estabiliza las emulsiones y evita que las gotas se fusionen.

El tamaño de las partículas sólidas en relación con las emulsiones de Pickering afecta directamente la estabilidad y las propiedades de las gotas dispersas. En general, se observa que partículas pequeñas tienen una mayor facilidad para adsorberse en la

interfase, consiguiendo formar una capa más uniforme alrededor de las cápsulas y resultando en una emulsión más estable, ya que estas partículas pequeñas cubren una mayor área superficial y previenen la coalescencia de las gotas con mayor efectividad. Sin embargo, por lo general, van a formar películas más finas y pueden verse afectadas con mayor facilidad por las condiciones externas. Por otro lado, partículas mayores pueden formar una capa más gruesa alrededor de las gotas, proporcionando estabilidad a largo plazo debido a una mayor resistencia a la migración o redistribución de las partículas en la interfase. Sin embargo, la formación de una capa demasiado gruesa puede afectar la fluidez y la capacidad de flujo de la emulsión. Así pues, con partículas de tamaño intermedio, entre 100 y 250 nm [28], se consiguen mejores resultados para la formación de emulsiones de Pickering.

El tamaño y la distribución de tamaño de las partículas sólidas utilizadas en las emulsiones de Pickering se pueden ajustar para controlar las propiedades y estabilidad de las gotas dispersas, lo que tiene implicaciones significativas en diversas aplicaciones, desde alimentos y cosméticos hasta productos farmacéuticos y de cuidado personal.

Así pues, para la comprensión total de la formación de las emulsiones de Pickering se hace necesario tener una caracterización lo más completa posible de las partículas empleadas para la estabilización en la interfase con el fin de poder predecir el comportamiento que van a tener.

5. Materiales coloidales

La elección del material coloidal es fundamental a la hora de llevar a cabo la formación de emulsiones de Pickering. Dependiendo del uso y propiedades que se requiera, se elegirá un tipo u otro de material para la formación de emulsiones de Pickering y posterior formación de cápsulas. Se dispone de una amplia variedad de materiales siendo los más empleados óxidos de sílice [29,30], arcillas [31], óxidos metálicos [32,33] o polímeros [34]. En la Figura I.6 se muestra un esquema de los materiales clásicos utilizados en la formación de emulsiones de Pickering clasificados según naturaleza química.

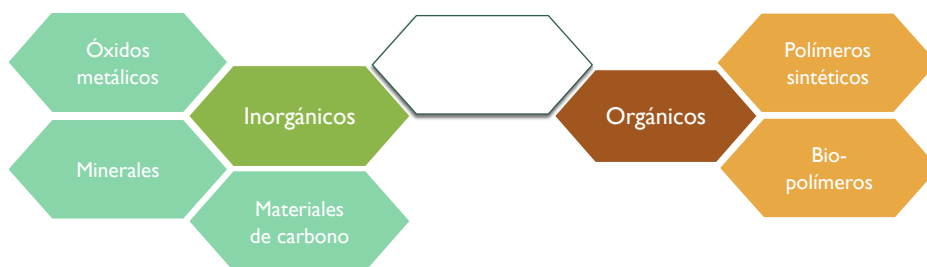


Figura I.6 – Tipos de materiales clásicos usados en encapsulación. Adaptación de Zdarta et al. [35]

En el trabajo realizado en esta tesis, se aborda la utilización de compuestos de distinta naturaleza química, por un lado, se emplean dos nanopartículas inorgánicas de sílice de diferentes características, y por otro, partículas orgánicas como el látex, el quitosano y la goma arábiga.

Las nanopartículas de sílice Aerosil® A200 son un tipo específico de sílice coloidal que se utiliza en una amplia gama de aplicaciones industriales y científicas. El Aerosil® A200 es un producto fabricado por Evonik, que se compone principalmente de partículas de sílice amorfas con un tamaño de partícula nanométrico y una alta área superficial. Su gran versatilidad permite tener un amplio abanico de aplicaciones de diversa índole, como catalizadores o soporte de catálisis [36], en productos cosméticos y de cuidado personal [37], o en la formación de emulsiones [38,39] como es el caso de estudio en esta tesis doctoral, entre otros.

Las partículas Ludox®, Figura I.7 marca comercial de sílice coloidal, son un tipo de nanopartículas de sílice monomodal, de entre 20-50 nm, que usan sodio como contraión estabilizador. Son sintetizadas mediante el método sol-gel, que es un método versátil para la preparación de un amplio rango de materiales. En este procedimiento, la sílice se disuelve en un solvente líquido, como agua o alcohol, y luego se procede a la evaporación del líquido. Este proceso conduce a la formación de un gel que, posteriormente, es tratado con un compuesto químico para eliminar el solvente, resultando en una estructura sólida conformada por partículas de sílice entrelazadas. Las nanopartículas Ludox® se emplean en una gran variedad de aplicaciones, incluyendo cosméticos, en productos alimentarios o como parte de medicamentos. Así, las partículas Ludox® son un material versátil y útil gracias a su estabilidad, biocompatibilidad, gran superficie y carga, que lo convierten en una herramienta valiosa para una variedad de industrias.

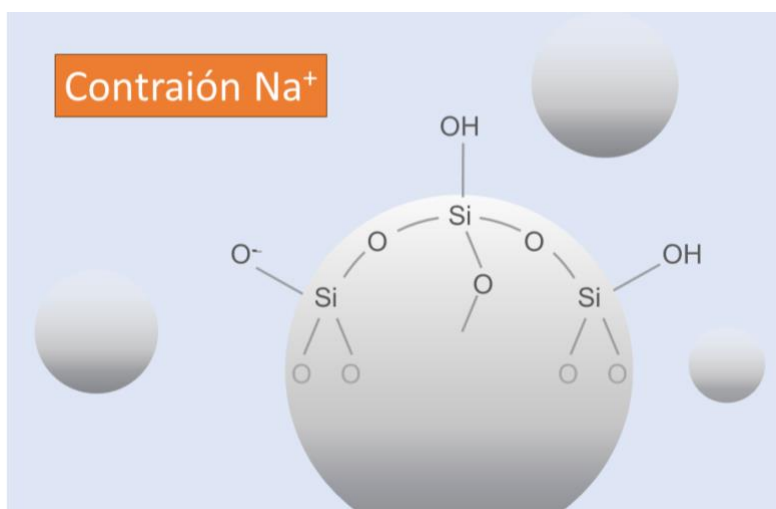


Figura I.7. Partículas de LUDOX 40

El látex es una dispersión coloidal de partículas de polímero en un medio líquido (generalmente agua), donde estas partículas de polímero están suspendidas en forma de partículas esféricas o elipsoidales. Sus propiedades y características pueden variar dependiendo del tipo de polímero utilizado y el método de producción

La goma arábiga (GA) es un polisacárido natural de tipo proteína arabinogalactana que se extrae de los troncos y ramas de los árboles Acacia Senegal y Acacia Seyal [40,41]. Como polisacárido aniónico ($pK_a = 2.2$), la goma arábiga es un material ventajoso para la microencapsulación debido a su notable solubilidad en agua, su baja viscosidad en disolución, actividad superficial efectiva y capacidad de emulsificación [42,43].

Por otro lado, el quitosano (CS), Figura I.8, es un polisacárido lineal que se obtiene a partir de la desacetilación parcial de la quitina y está compuesto por unidades aleatoriamente distribuidas de D-glucosamina y N-acetilglucosamina unidas por enlaces (1-4). Después de algunas modificaciones adecuadas en su estructura, se ha encontrado que es una materia prima eficiente para producir nanopartículas con beneficios tecnológicos [44,45]. Posee una carga positiva en un entorno ácido debido a su pK_a , que oscila entre 6.2 y 7.0. Esto conduce a la protonación de grupos amino en la estructura del polímero y a la presencia de abundantes grupos hidroxilo [46,47]. Sin embargo, la existencia de grupos NH_2 no protonados dentro del quitosano (CS) limita su solubilidad en escenarios fisiológicos, restringiendo así el rango de sus aplicaciones. Aprovechando la sinergia que se puede conseguir con la mezcla entre los dos biopolímeros anteriores, se pretenden preparar unas nanopartículas híbridas por medio de la coacervación compleja.

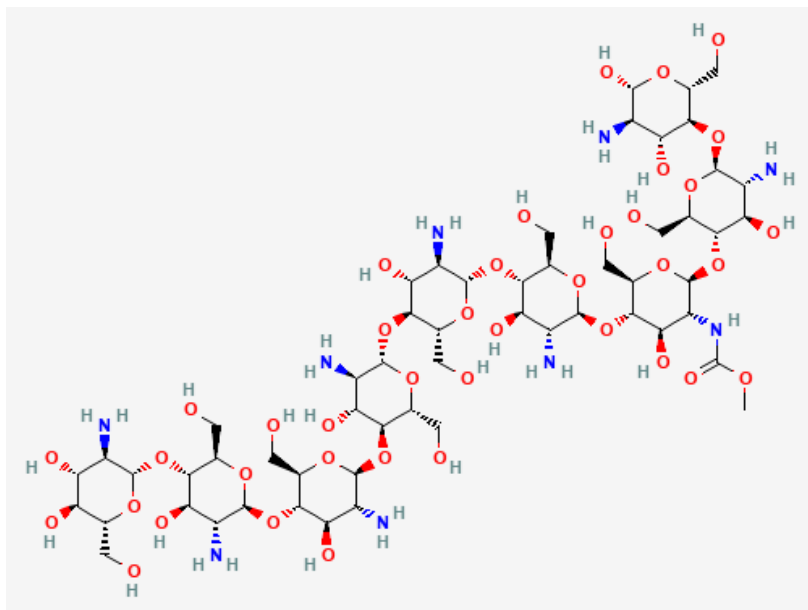


Figura I.8. Estructura del quitosano (PubChem).

La coacervación compleja es un fenómeno que depende principalmente del pH y se ha observado en sistemas que contienen dos coloides dispersos con cargas eléctricas opuestas [48]. Las condiciones óptimas para la coacervación compleja se logran cuando el pH se ajusta a un punto donde haya una cantidad equivalente de moléculas con carga opuesta de los dos coloides, ya que en este punto se forman la mayor cantidad de enlaces salinos.

Todos estos materiales empleados en la formación de cápsulas también deberán reunir una serie de requisitos en cuanto a su comportamiento medioambiental. En la actualidad, la normativa sobre la emisión de nanopartículas está en constante evolución a medida que se aprende más sobre los posibles riesgos para la salud y el medio ambiente.

Las regulaciones y normativas ambientales buscan garantizar que los materiales utilizados en la fabricación de cápsulas y otros sistemas de liberación controlada no representen riesgos significativos para la salud humana ni para el medio ambiente durante su producción, uso y disposición final. Se están estableciendo medidas específicas para evaluar y regular el uso de nanopartículas, dado que su tamaño diminuto puede tener implicaciones únicas en términos de toxicidad y comportamiento ambiental.

En la Unión Europea, la Directiva sobre emisiones industriales (IED) establece límites para las emisiones de nanopartículas de las instalaciones industriales. La IED clasifica las nanopartículas en función de su tamaño y toxicidad. Las nanopartículas de mayor tamaño (>100 nm) están sujetas a los mismos límites de emisión que las partículas

no nano. Las nanopartículas de menor tamaño (<100 nm) están sujetas a límites de emisión más estrictos.

Las investigaciones continuas y los avances en la comprensión de los posibles efectos de las nanopartículas en la salud y el medio ambiente influyen en el desarrollo de normativas más estrictas o específicas para su uso seguro. Los fabricantes y científicos que trabajan con nanopartículas y sistemas de liberación controlada deben mantenerse al tanto de estas regulaciones cambiantes para asegurar el cumplimiento de las normativas y contribuir a la seguridad tanto de los usuarios como del entorno ambiental.

De esta forma, se resalta la importancia de la medida previa de la biodegradabilidad de las partículas antes de que sean empleadas en la fabricación de cápsulas para la protección de diversos aditivos en la formulación de detergentes. Los compuestos biodegradables tienden a descomponerse en componentes más simples a través de procesos naturales en el medio ambiente, lo que reduce su persistencia y minimiza su impacto negativo en los ecosistemas acuáticos y terrestres. Esto es especialmente relevante en productos de limpieza, como detergentes, que se usan en grandes cantidades y pueden liberar sustancias químicas al ambiente.

6. Sinergias entre aditivos encapsulados y recubrimientos

En la optimización de la aplicación de las cápsulas con aditivos en su interior, se requiere la aplicación de recubrimientos adicionales para conseguir una liberación controlada de los ingredientes encapsulados en el momento deseado.

En el caso de materiales antimicrobianos, lo ideal debería ser que posean las siguientes características:

- Fácil y económico de sintetizar.
- Estable en uso a largo plazo y almacenamiento a la temperatura de su aplicación prevista.
- No soluble en agua si se utiliza para desinfección en sistemas acuosos.
- No se descompone y/o emite productos tóxicos.
- No debería ser tóxico ni irritante para quienes lo manejan.
- Puede ser regenerado tras la pérdida de actividad.
- Biocida para un amplio espectro de microorganismos patógenos en breves tiempos de contacto.

La plata y el cobre son dos metales que se utilizan comúnmente como agentes biocidas en detergentes. Actúan destruyendo a los microorganismos, como las bacterias, los hongos y las levaduras.

Así, el uso de la plata está ampliamente extendido como antimicrobiano en aplicaciones diversas. Este comportamiento es debido a la liberación de iones de plata Ag^+ cuando se expone la muestra a un ambiente acuoso [49]. En este sentido, se ha demostrado que las nanopartículas de plata son especialmente activas frente a las bacterias [50] o en la inhibición de virus como la hepatitis B o la influenza A H1N1 [49]. Además, Adelere et al. [51] han encontrado actividades antibacterianas y alguicidas de nanopartículas de plata y sugieren posibles aplicaciones como agente antimicrobiano en el tratamiento del agua, el desarrollo de fármacos y como aditivo antimicrobiano en la producción de detergentes. Su uso como aditivo en la formulación de detergentes, en concreto con aplicación médica contra la coagulasa estafilocócica sin afectar al colon también ha sido desarrollada [52].

Por otro lado, el cobre, de una forma similar a la plata, mediante la liberación de iones de cobre [53], se convierte en un agente biocida eficaz, siendo capaz de oxidar las membranas celulares de los microorganismos, provocando su destrucción. El factor principal para la acción del cobre como antimicrobiano puede ser su forma física y para el mecanismo de actuación se han propuesto dos mecanismos principales como la despolarización de la membrana y la generación de especies reactivas de oxígeno [54].

Su uso formando parte de recubrimientos de superficies ha demostrado ser eficaz contra bacterias, levaduras y virus, debilitando rápidamente a estos organismos en entornos sanitarios [49], otorgando gran valor en su inclusión en la formulación de detergentes de limpieza. Es importante resaltar que este comportamiento antimicrobiano de las nanopartículas de cobre es especialmente efectivo en entornos húmedos [55]. También se ha comprobado la eficacia del cobre contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* como parte champús, gel de manos o lavavajillas como sustitutos de conservante convencionales como las isotiazolinonas, que a menudo actúan como sensibilizadores provocando el desarrollo de dermatitis alérgica de contacto [56].

En el caso del quitosano se ha investigado como material antimicrobiano contra una amplia gama de organismos como algas, bacterias, levaduras y hongos en experimentos que involucran interacciones in vivo e in vitro con quitosano en diferentes formas (soluciones, películas y compuestos) [57].

El quitosano ha despertado un interés y atención considerables en las últimas décadas debido a sus potenciales campos de aplicación y sus ventajas únicas, entre ellas su propiedad antimicrobiana, por lo que las investigaciones sobre este tema están creciendo. Debido a la diversidad de áreas de aplicación y al aumento de la conciencia ambiental de la sociedad, los productos biodegradables y no tóxicos de fuentes naturales se están volviendo cada vez más atractivos para reemplazar compuestos sintéticos. En comparación con otros materiales antibacterianos, el quitosano es un material vegetal no tóxico, inofensivo y respetuoso con el medio ambiente. Por lo tanto, el estudio de aplicaciones que incluyan este material con aplicaciones será beneficioso para la explotación de una nueva generación de agentes antimicrobianos y podría servir de base para el desarrollo de nuevas biomedicinas.

Los biofilms son comunidades microbianas incrustadas en una matriz de polímeros extracelulares viscosos que presentan resistencia a los agentes antimicrobianos. Actualmente se están evaluando moléculas biológicas naturales por su actividad anti-biofilm con el fin de desarrollar estrategias preventivas o terapéuticas alternativas. En este contexto, se han comprobado propiedades bactericidas de compuestos de quitosano en biofilms con Gram-negativos y Gram-positivos [58], contra patógenos en la superficie dental [59,60], como recubrimiento antimicrobiano [61].

Sheng et al. [62] determinan la actividad antimicrobiana del quitosano por un método turbidimétrico encontrando una notable actividad en el orden *Staphylococcus aureus* > *Escherichia coli* > *Saccharomyces cerevisiae* y relacionan la eficacia microbiana con el producto de la viscosidad-peso molecular promedio, de manera a que un aumento de este parámetro disminuye su eficacia antimicrobiana.

7. Uso de aceites esenciales en la formulación de detergentes

Los aceites esenciales (AE) han demostrado ser una alternativa prometedora en la industria de detergentes debido a sus propiedades antimicrobianas[63,64], aromáticas [65,66] y biodegradables. destacando su eficacia en la eliminación de manchas, olores y microorganismos, además de su impacto ambiental positivo en comparación con los ingredientes químicos convencionales.

Se discuten diversos estudios científicos que respaldan la efectividad de los AE, como el aceite de árbol de té, eucalipto, lavanda, entre otros, en la eliminación de manchas y microbios en prendas textiles. Además, se resalta la capacidad de los AE para combatir

olores persistentes, a la vez que aportan fragancias naturales, lo que los convierte en una opción atractiva para detergentes amigables con el medio ambiente.

Debido al impacto antimicrobiano y antifúngico de los aceites esenciales, las preparaciones cosméticas como cremas, geles y ungüentos no necesariamente requieren un conservante químico adicional si contienen un aceite esencial [67].

El uso de aceites esenciales en detergentes es una tendencia emergente que ofrece una serie de beneficios potenciales. Los aceites esenciales pueden ayudar a mejorar la limpieza, la fragancia y la biodegradabilidad de los detergentes, lo que los convierte en una opción más saludable y sostenible para los consumidores.

En lo que se refiere al aceite esencial de orégano (OEO), este es extraído de la planta de orégano, *Origanum vulgare*, y es conocido por sus atributos antifúngicos y antibacterianos [68,69]. No representa ningún peligro para la salud humana o el medio ambiente [70]. Los componentes principales del aceite son el carvacrol, γ -terpineno, timol, β -citronelol, 1,8-cineol, etc. [68], los cuales exhiben características antioxidantes potentes que pueden ayudar a proteger contra toxinas y combatir infecciones fúngicas. Por lo tanto, estas propiedades hacen que el OEO sea un compuesto atractivo para las formulaciones de detergentes [70].

8. Hipótesis de partida y justificación

En la realización de la presente tesis doctoral se plantean las siguientes hipótesis:

- a. La incorporación de enzimas en las formulaciones mejora la eficacia del lavado, permite trabajar a menores temperaturas y pH, con tiempos más cortos.
- b. Es posible la disminución de la carga contaminante de las aguas de lavado para una misma eficacia de la formulación, reduciendo la concentración de tensioactivos e incorporando enzimas.
- c. Es necesaria la separación física de las enzimas del resto de componentes de las formulaciones para aumentar su estabilidad, actividad y eficacia.
- d. La encapsulación de enzimas mediante técnicas de silicificación bio-inspiradas y en coloidosomas son alternativas viables para dicha separación.
- e. La combinación de partículas coloidales que pueden agregarse en coloidosomas, así como materiales y técnicas de sellado, que pueden incluir la adición de una

capa adicional, permite modificar las propiedades de las microcápsulas, y particularmente la permeabilidad del recubrimiento.

- f. Las técnicas de encapsulación son adaptables a otros aditivos a incorporar en las formulaciones detergentes.
- g. La optimización de las técnicas de encapsulación permitirá mejorar la actuación de los aditivos por el control de su liberación.

La selección de componentes para la formulación de detergentes está limitada por la pérdida de eficacia con el tiempo de aditivos como enzimas y peróxidos, así como por las interacciones que se producen entre los distintos compuestos, que condiciona su uso conjunto.

Una parte importante de la carga contaminante de las aguas residuales es debida a detergentes. La adecuada selección de los componentes permitiría una reducción de esta carga contaminante. Es importante que uno de los criterios a la hora de seleccionar los materiales a utilizar en el proceso de encapsulación sean lo más biodegradables posible.

Las técnicas de encapsulación necesitan ser optimizadas para mejorar el rendimiento, incrementar la estabilidad durante el tiempo de almacenamiento reduciendo interacciones entre componentes y controlar la velocidad de liberación. Esta etapa de optimización implica medidas de eficacia de lavado usando estos aditivos encapsulados.

II. OBJETIVOS DE LA TESIS

El objetivo general de esta investigación es el desarrollo de metodologías de encapsulación para la incorporación de aditivos en formulaciones detergentes de base tensioactiva que ayuden a reducir su impacto ambiental. Para alcanzar este objetivo se pretende estudiar las condiciones óptimas para encapsular estos aditivos que sean incorporados en dichas formulaciones, manteniendo o mejorando la eficacia de limpieza y minimizando la interacción entre componentes.

Para el cumplimiento de este objetivo general se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Explorar diferentes técnicas para la formación de cápsulas capaces de retener aditivos de interés en la formulación de detergentes.
- Emplear materiales coloidales biodegradables de diferente naturaleza que se adapten a las técnicas de encapsulación amigables con el medioambiente basadas en emulsiones de Pickering.
- Realizar la optimización de las variables que afectan a la preparación de cápsulas mediante emulsiones de Pickering.
- Desarrollar las técnicas para generar recubrimientos de distinta naturaleza para el sellado de las cápsulas formadas y con propiedades antimicrobianas.
- Encapsular de enzimas utilizando nanopartículas inorgánicas.
- Optimización de encapsulados multifuncionales (aceite esencial) utilizando las técnicas desarrolladas.
- Realizar el control de la liberación mediante diferentes mecanismos de los aditivos encapsulados.

III. MATERIALES

Para el desarrollo de la metodología seguida en la presente tesis se desarrollan a continuación todos los compuestos químicos y materiales que son necesarios. Todos los químicos utilizados son al menos de grado analítico.

En primer lugar, hay una parte importante de los compuestos químicos utilizados que son comunes a los procedimientos existentes. Todo el agua empleada en los experimentos se trata de agua ultrapura de Tipo I obtenida mediante el sistema patentado de Milli-Q de la empresa Millipore (Burlington, MA, USA).

El aceite de girasol empleado para la formación de emulsiones se adquiere de Mercadona (Valencia, España).

El tinte usado en la optimización de los métodos de encapsulación es el Allura Red AC, adquirido de Sigma en grado analítico, con número de producto 38213.

Por otro lado, en los ensayos de liberación planteados se emplea una membrana de diálisis Spectra/Por Dialysis Membrane MWCO: 6-8,000 (Nominal Flat Width 40 mm, Diameter 255 mm, Vol/Length 5.1 mL/cm), adquirida a Sigma-Aldrich.

Para llevar a cabo los ensayos de liberación se emplea una membrana de diálisis o ultrafiltración para retener las cápsulas en su interior y que no estén dispersas en la disolución acuosa para facilitar la toma de muestras y no tener la necesidad de centrifugar para medir directamente la absorbancia en el ensayo de liberación. El proceso de purificación de la membrana de diálisis empleada en los experimentos consiste en:

- Introducir la membrana en un baño de agua helada y mantenerla sumergida durante 2.5 horas.
- Traspasar a un recipiente con una disolución acuosa de ácido sulfúrico del 0.2%v/v.
- Transcurrido este tiempo, se deja entre 5 y 10 minutos en un recipiente con agua caliente.
- Se deja enfriar a temperatura ambiente y la membrana está limpia y preparada para ser utilizada en los ensayos de liberación.

A continuación, se procede a detallar los químicos necesarios en la experimentación con cada uno de los materiales coloidales estudiados para la formación de cápsulas.

Como materiales coloidales se emplean dos tipos de nanopartículas de sílice, por un lado, Aerosil® A200 proporcionadas por Evonik. AEROSIL® 200 es una sílice pirógena hidrófila con una superficie específica nominal de 200 m²/g. Por otro lado, se emplean nanopartículas Ludox® que se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Ludox® es una marca registrada de W.R. Grace & Co.-Conn.

También se emplean nanopartículas de látex sintetizadas a partir de tres monómeros: metil metacrilato, ácido acrílico y butil acrilato, todos adquiridos de Sigma Aldrich con una pureza superior al 99%. En el proceso de síntesis se requiere también el tensioactivo DOWFAX 2A1, facilitado por la empresa SPB, persulfato potásico (KPS) utilizado como iniciador de la reacción adquirido de Supelco, acrilato de estirilo (SA) usado como coestabilizador, suministrado por Sigma Aldrich, y NaHCO₃ para el control de la viscosidad de la emulsión proporcionado por Scharlau. En el proceso de encapsulación con látex se emplean, también, etanol absoluto con una pureza superior al 99.8%, suministrado por Baker, y el tensioactivo monooleato de sorbitano, Span® 80, marca registrada por Sigma.

El cloruro de calcio, CaCl₂, necesario en la encapsulación con las nanopartículas descritas hasta ahora se adquiere de Scharlau en forma anhidra y con una pureza superior al 95%.

Por último, para la formación de complejos de quitosano y goma arábica, se emplea quitosano en polvo de bajo peso molecular adquirido de Sigma-Aldrich (product No. 448869, Darmstadt, Alemania) con un grado de desacetilación del 91.7% y un peso molecular de 359 kDa; la goma arábica (Ph Eur, BP) fue adquirida de Merck (Darmstadt, Alemania); y el ácido acético glacial (ACS 99.7%) necesario para la disolución del quitosano se compró de PanReac (Barcelona, España).

En cuanto a los compuestos elegidos para su encapsulación se emplean una enzima proteasa proveniente de *Bacillus sp. adquirida de Sigma*, el aceite esencial de orégano fue facilitado por Essenciales (Barcelona, España) y el agente biocida Bronopol fue adquirido de Merck, bajo la marca PESTANAL®.

Para la formación de los diferentes recubrimientos probados de distinta naturaleza se requieren una serie de compuestos químicos que se enumeran a continuación. AgNO₃ y CuCl₂, en forma anhidra, se adquieren de Sigma. El CuSO₄·5 H₂O es suministrado por Panreac y las sales de carbonato Na₂CO₃ y CaCO₃ se adquieren de Scharlau y Panreac,

respectivamente, en forma anhidra. También se emplea el quitosano de bajo peso molecular empleado en la formación de complejos con la goma arábica.

Para la medida de la concentración y actividad enzimática se usa el kit PierceTM BCA de Thermo Scientific, tampón de Sorensen preparado por las sales NaH_2PO_4 y KH_2PO_4 , adquiridas ambas en formato anhidro y suministradas por VWR Chemicals, y azocaseína empleada como sustrato suministrada por Sigma Aldrich.

Por último, para la dispersión final de las cápsulas preparadas y facilitar su caracterización en SEM se emplea el tensioactivo SDS para evitar la agregación de las partículas formadas y se ha adquirido de Panreac en forma de polvo puro con una pureza superior al 99%.

Todos los químicos han sido utilizados tal cual han sido recibidos sin ninguna modificación.

IV. METODOLOGÍA

1. Caracterización

1.1. Medida de tamaño de partículas y potencial zeta

La medida de tamaño de partículas obtenidas en el rango comprendido entre 0.02 μm y 2 mm se lleva a cabo en el analizador de tamaño de partículas por difracción laser Mastersizer 3000 (Malvern Panalytical Ltd., Reino Unido), equipado con una unidad de dispersión Hydro 2000G, Figura IV.1. Este equipo es un banco óptico que permite realizar la medida de partículas en el rango de 10 nm a 3,5 mm mediante una sola ruta de medición óptica, que lo hace adecuado para una amplia variedad de aplicaciones. La muestra dispersada pasa a través de la zona de medición del banco óptico, donde un haz de láser rojo (4 mW máximo, He-Ne, 632.8 nm) y azul (10 mW máximo, LED, 470 nm) ilumina las partículas y la luz dispersada se mide con, una serie de detectores en una amplia variedad de ángulos entre 0.015 y 144 grados. Los datos se analizan mediante el software para calcular el tamaño de las partículas que crearon el patrón de dispersión.



Figura IV.1. Equipo de medida de tamaño de partícula por difracción laser, Mastersizer 3000

Para la medida del tamaño de partículas en el rango 0.3 nm a 15 μm y el potencial zeta se utilizó un equipo Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical Ltd., Reino Unido), Figura IV.2. El tamaño se determina utilizando la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS), mientras que el potencial zeta se mide mediante dispersión de luz electroforética (ELS). Los ajustes del instrumento se optimizan automáticamente mediante el software ZS XPLOER v.3.2.1.11 (Malvern Panalytical Ltd., Reino Unido). Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente y los valores mostrados se calculan como el promedio de al menos tres réplicas.



Figura IV.2. Medida de tamaño de partícula Zetasizer Ultra con valorador automático.

En este equipo, la medida del tamaño de partícula se basa en el movimiento browniano de las partículas en el medio en el que se encuentran dispersas, así, las partículas más pequeñas tienen una mayor movilidad, por tanto, una velocidad más alta, mientras que en las de mayor tamaño la migración en la suspensión está más limitada. El equipo es capaz de obtener la información del movimiento de difusión de las partículas en el medio y obtener la distribución de tamaños presente. Para ello, el equipo realiza medidas a tres ángulos diferentes (173°, 13°, 90°) y lleva a cabo la optimización de los resultados para dar la información de forma más precisa, con el empleo de la técnica MADLS (Multi-Angle Dynamic Light Scattering).

El cálculo se realiza aplicando la relación de Stokes-Einstein que se muestra en la ecuación (3). Donde $d(H)$ es el diámetro hidrodinámico de las partículas obtenido por el equipo, k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta, η es la viscosidad dinámica de la muestra líquida medida y D es el coeficiente de difusión traslacional que se deriva del movimiento que tienen las partículas en la suspensión.

$$d(H) = \frac{k T}{3 \pi \eta D} \quad (3)$$

Valores de difusividad bajos implican tamaños grandes de partículas, limitando el movimiento de las partículas en la suspensión, por lo que serán de poca utilidad para el fin buscado en esta tesis doctoral que es la migración de las partículas hacia la interfase para la formación de emulsiones de Pickering. Aunque el tamaño no es la única propiedad

que define el movimiento de las partículas y por ello se estudian otras variables que pueden modificar el comportamiento de las partículas en suspensión.

Por otro lado, la medida del potencial zeta se basa en el movimiento electroforético de las partículas en suspensión. Para ello, se tiene una celda con dos electrodos de diferente carga que permite aplicar un campo eléctrico a la muestra, provocando que las partículas tiendan a moverse hacia el electrodo de carga opuesta determinándose el valor de su potencial zeta.

Por ello, con el Zetasizer Ultra se puede estudiar el comportamiento de las diferentes partículas usadas en función del pH, en concreto del potencial zeta que tiene una gran dependencia con el valor de pH y modifica las propiedades superficiales de las partículas, como es la afinidad por unas u otras partículas para quedar enlazadas que se detalla más adelante en la presente tesis doctoral.

Para ajustar el pH de la suspensión de partículas, se utilizan disoluciones de HCl y NaOH dosificadas por el propio equipo, para ajustar automáticamente el pH deseado y realizar la medida del potencial zeta, obteniendo las curvas de titración en un amplio rango de pH con medidas a cada intervalo de pH elegido en cada muestra.

1.2. Tensión interfacial y ángulo de contacto

Tanto la tensión interfacial entre la disolución acuosa de partículas y el aceite de girasol, como el ángulo de contacto de las nanopartículas con agua se miden empleando el tensiómetro de gota KSV CAM 200 (KSV Instruments Ltd., Finlandia), con la versión 4.04 del software propio del equipo que permite el procesamiento de la imagen para la determinación de la tensión interfacial y el ángulo de contacto.

El equipo consta de una fuente de luz azul de fondo, una cámara monocromática y un dispositivo para colocar la jeringa de la muestra con la que se generan las gotas que son medidas en el equipo (Figura IV.3).

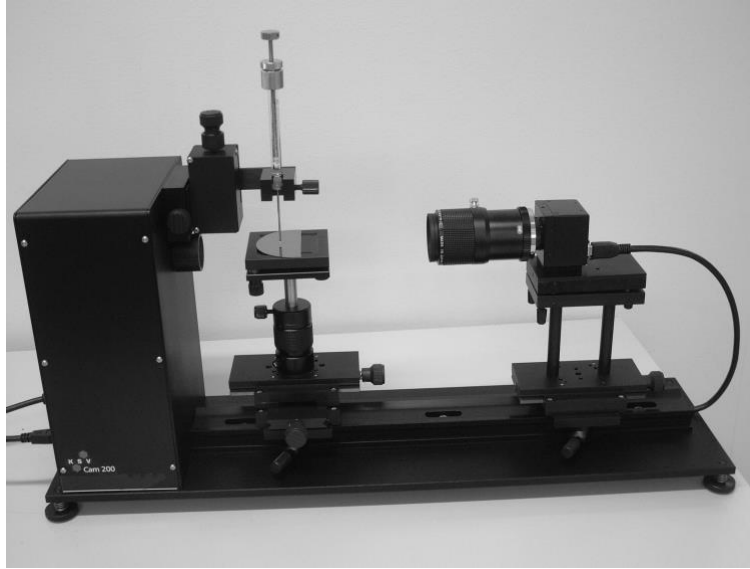


Figura IV.3 – Tensiómetro de gota KSV CAM 200 para la medida de la tensión interfacial y el ángulo de contacto

La tensión interfacial se determina usando el método de análisis de la forma de la gota pendiente, donde, en el equilibrio la gota obedece a la ecuación de Young-Laplace, que relaciona la presión de Laplace sobre la superficie con la curvatura en la interfase usando la ecuación (4). Donde γ representa la tensión interfacial, β es un factor que depende de la forma de la gota, $\Delta\rho$ es la diferencia de densidades entre los dos fluidos en la interfase, R_0 es el radio de la curvatura de la gota en el vértice y g es la aceleración de la gravedad.

$$\gamma = \frac{\Delta\rho \, g \, R_0}{\beta} \quad (4)$$

El equipo permite la determinación conjunta del radio de curvatura, R_0 , con una correcta calibración del equipo, y el factor de forma, β , mediante la ecuación de Young Laplace expresada mediante tres ecuaciones adimensionales de primer orden, como se muestra en la Figura IV.4. De esta forma, conociéndose la diferencia de densidades de los fluidos presentes en la interfase se puede determinar la tensión interfacial con el empleo del equipo KSV CAM 200.

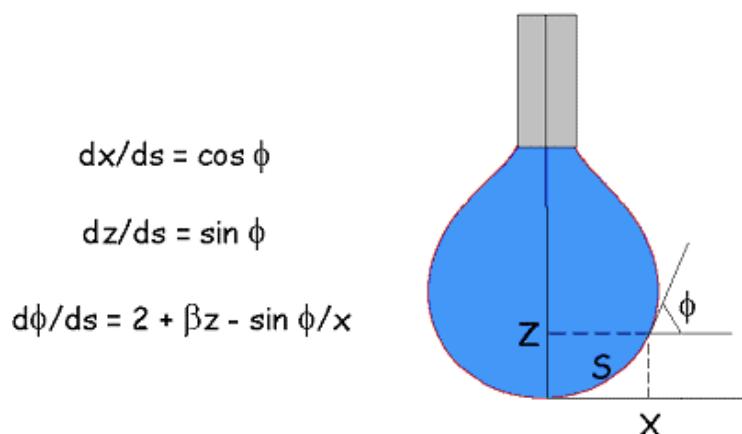


Figura IV.4 – Ecuaciones adimensionales obtenidas de la ecuación de Young-Laplace para la determinación del factor de forma de la gota según el método de la gota pendiente

Por otro lado, en la preparación de la muestra para la medida del ángulo de contacto, se deja secar una película delgada de una solución acuosa que contiene nanopartículas durante toda la noche sobre un portaobjetos de vidrio. Estas superficies sirven para la determinación del ángulo de contacto de las nanopartículas cuando se deposita sobre ellas una gota de agua como se muestra en la Figura IV.5, utilizando el equipo descrito.

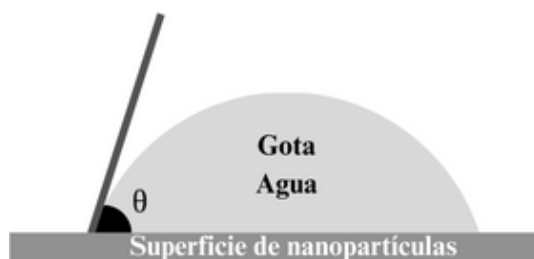


Figura IV.5– Representación del ángulo de contacto medido con el tensiómetro de gota

La medida del ángulo de contacto se basa en la goniometría, que analiza la forma de una gota de muestra líquida depositada sobre una superficie sólida. El ángulo de contacto podría estimarse directamente mediante la medida directa del ángulo formado entre el sólido y la tangente a la superficie de la gota.

No obstante, encontrar la línea tangente que determina el ángulo de contacto puede ser un aspecto que limite la capacidad de reproducir las mediciones de dicho ángulo. La goniometría tradicional se basa en la precisión del operador al establecer la línea tangente, lo cual puede generar errores considerables, según la experiencia pericia del operador en debidos a la medida por distintos usuarios. Para evitar este problema se emplea un análisis computarizado del perfil de la gota para obtener mediciones consistentes del ángulo de contacto. El software ajusta la forma de la gota a la ecuación de Young-Laplace utilizando

un número elevado de puntos en su perfil. La tangente se determina como la pendiente de la ecuación de Young-Laplace en el punto de intersección con la línea base.

1.3. Ensayo de biodegradabilidad

Para la determinación de la biodegradabilidad de los compuestos se pueden emplear dos ensayos diferentes, un ensayo estático y el ensayo respirométrico. La biodegradabilidad de las partículas de látex se evalúa siguiendo el ensayo estático y el resto se determinan siguiendo el ensayo respirométrico.

1.3.1. Ensayo estático

Se trata de un ensayo tipo “matraz abierto” según la norma *OECD 301F: Screening Test* (OCDE, 1992). Para llevarlo a cabo se inocula un volumen medido de medio mineral que contiene una concentración conocida de la sustancia de prueba como única fuente de carbono, con 0.5 mL de inóculo procedente del efluente secundario de la planta de tratamiento de aguas residuales de Granada. La mezcla se coloca en un matraz cónico de 2 L de capacidad y se airea en la oscuridad a 25°C. El grado de degradación se expresa como porcentaje de la concentración inicialmente presente.

El control de los microorganismos responsables de la biodegradación se realiza mediante ensayos paralelos a la muestra problema con benzoato sódico.

La disolución nutriente se prepara añadiendo a 1 L de agua destilada 1 mL de cada una de las cuatro disoluciones siguientes:

- a) Se disuelven en 1000 mL de agua:
 - 8.5 g de dihidrógenofosfato potásico (KH_2PO_4 , P.A.) de Panreac.
 - 21.75 g de monohidrógenofosfato dipotásico (K_2HPO_4 , P.A.) de Panreac.
 - 33.4 g de monohidrógenofosfato disódico dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, P.R.S.) de Panreac.
 - 1.7 g de cloruro amónico (NH_4Cl , P.R.S.) de Panreac.
- b) Se disuelven en 1000 mL de agua 22.5 g de sulfato magnésico heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, P.R.S.) de Panreac.
- c) Se disuelven en 1000 mL de agua 27.5 g de cloruro cálcico anhidro (CaCl_2 , P.A.) de Panreac Se disuelven en 1000 mL de agua 0.25 g de cloruro de hierro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, P.R.S.) de Panreac. La disolución nutriente se prepara inmediatamente antes de su uso en el ensayo de biodegradación.

1.3.2. Ensayo respirométrico

Los ensayos de biodegradación se llevan a cabo de acuerdo con el método “*OECD 301F: Ready biodegradability*”. Para ello usan las botellas suministradas por el proveedor con el sistema OXITOP®-IDS (v. 1.06), que monitorizan la biodegradación a través de la medida indirecta del consumo de O₂.

Como inóculo se utiliza el efluente secundario de una Estación Depuradora de Aguas Residuales de Granada. Para determinar la ThOD (Demanda Teórica de Oxígeno) del producto a ensayar se realiza un análisis elemental preliminar con el que se establece la cantidad óptima de muestra requerida para que las medidas sean satisfactorias. La duración del experimento es 28 días, durante los cuales se mide el oxígeno consumido por los microorganismos para llevar a cabo la biodegradación mediante el cambio de presión cuando el CO₂ producido es absorbido en una solución de hidróxido potásico. El material se puede clasificar como biodegradable cuando el porcentaje de biodegradación alcanzado al cabo de los 28 días excede el 60%. Como material de referencia se usa celulosa microcristalina. Todos los experimentos se realizan por duplicado.

1.4. **Técnicas de microscopia empleadas**

Se emplean diferentes técnicas de microscopía para la determinación de la morfología y tamaño de las cápsulas producidas, así como para los diferentes recubrimientos realizados sobre las mismas que se describen a continuación.

1.4.1. Microscopía óptica

Para una vista preliminar de la efectividad del método seguido y determinar si se han conseguido formar las cápsulas buscadas, se utiliza un microscopio binocular Zeiss Axio Lab.A1 equipado con una cámara Zuzi modelo UCMOS03100KPA de 3 MP conectada mediante USB a un ordenador que permite el seguimiento en tiempo real de la muestra observada y la toma directa de imágenes.

Para la visualización de la muestra en el microscopio, se toma una gota de muestra con una pipeta y se deposita sobre un porta muestras de vidrio. Tras esto, para fijar la muestra y mejorar su visualización en el equipo se coloca un cubre muestras de vidrio.

Se dispone de tres objetivos diferentes con aumentos de 20, 40, 63 y 100 que se eligen dependiendo del tipo de muestra.

1.4.2. Microscopía electrónica de transmisión, TEM (Transmission Electron Microscopy)

En el microscopio electrónico de transmisión un haz de electrones acelerado colisiona con una muestra delgada convenientemente preparada. En función del grosor y del tipo de átomos de la muestra, parte de los electrones son dispersados selectivamente, produciéndose una gradación entre electrones que la atraviesan sin desviarse y los que son totalmente desviados y otra parte da lugar a interacciones que producen fenómenos como emisión de luz, electrones secundarios y Auger, rayos X, etc. Todos ellos son conducidos y modulados por unas lentes para formar una imagen final sobre una CCD que puede alcanzar miles de aumentos con una alta definición. La información de transmisión/dispersión se traduce en una imagen con distintas intensidades de gris que se corresponden al grado de dispersión de los electrones incidentes, la difracción de los electrones permite obtener información acerca de la estructura cristalina y la emisión de rayos X característicos para conocer la composición elemental de la muestra. El microscopio de transmisión utilizado es de ultra alta resolución y HAAD FFEI Titan G2, con cañón de emisión de campo (FEG) de tipo Schottky, con una tensión de aceleración con pasos prefijados a 50, 100, 150, 200, 250 y 300 kV, una máxima resolución TEM 0.8 Å y resolución STEM 2 Å, detector de STEM de tipo HAADF, sistema de microanálisis EDX (mediante dispersión de energía de Rayos X) equipado con 4 detectores que permite la realización de análisis cualitativos y cuantitativos.

1.4.3. Microscopía electrónica de barrido, SEM (Scanning Electron Microscopy)

La microscopía electrónica de barrido (SEM) permite identificar morfologías y tamaños con alta resolución. El equipo utilizado ha sido un microscopio electrónico de barrido ambiental de emisión de campo de alta resolución QuemScan y criostación FEI, mod. QuemScan650F dotado de platina motorizada en 5 ejes, 150x150 mm en X/Y que permite intercambiar tres modos de vacío (0.6 mPa a 4kPa), que permite analizar muestras conductoras y no conductoras. Consta de tres detectores de electrones secundarios, ETD (detector en alto vacío), LF-GSED (detector en bajo vacío) y GESED (detector en modo ambiental). Permite un rango de potencial de aceleración entre 200 V y 30 kV, ajustable en continuo. Alcanza una resolución (medida como la separación entre

partículas de oro en un sustrato de carbono) de 1.0 nm a 30kV (modo alto vacío), 1.4 nm a 30kV, 3.0 nm a 3kV ((modo bajo vacío), 1.4 nm a 30 kV (modo ESEM).

Como detectores de electrones retrodispersados dispone de:

- Detector CBS: detector de electrones retrodispersados de estado sólido direccional, con una sensibilidad a partir de 500 eV, dividido en segmentos para la detección por separado de electrones emitidos desde distintos ángulos.
- GAD anular: detector de electrones retrodispersados de estado sólido con dos anillos concéntricos para la segmentación angular de la señal y con cono de rayos-X integrado. Permite obtener imágenes composicionales y realizar microanálisis en condiciones de bajo vacío.

Sistema de microanálisis de rayos-X, Dual EDS XFlash de Bruker con detector XFlash 6/30 dispone de dos detectores SDD con una resolución en energía: < 129 eV ($\text{MnK}\alpha$, a 100,000 cps) con áreas activas de 30 mm^2 cada detector, permite la detección de elementos desde el boro. Esta técnica se basa en la detección de radiación secundaria (rayos X) emitida cuando un haz de electrones de alta intensidad incide en los materiales situados en su trayectoria y proporciona información cualitativa y cuantitativa sobre la composición de la superficie. La técnica permite identificar los elementos y cuantificar el porcentaje en peso de cada elemento generando un espectro EDS para calcular su abundancia relativa.

El software Correlative Workflow, Maps Tiling & Stitching, permite la adquisición de imágenes y crear una visión general del área de la muestra, sin distorsión y de alta resolución.

Tamaño y morfología de las cápsulas

Dependiendo de la técnica de microencapsulación utilizada, se colocó una fina capa de microcápsulas sobre una base de carbono y se recubrió con carbono. Las imágenes SEM se capturaron con diferentes aumentos con un voltaje de aceleración de 5 kV.

1.5. Análisis termogravimétrico (TGA)

Para determinar el contenido en sólidos de la suspensión de nanopartículas de látex sintetizada se emplea la balanza termogravimétrica Shimadzu TGA-50H. Con capacidad para una muestra de hasta 1 g, con un rango de pesada de 20 mg. Se utiliza una rampa de

calentamiento de 10°C/min hasta llegar a una temperatura de 145°C suficiente para evaporar todo el agua presente en la suspensión de látex. El experimento se mantiene durante un tiempo total de 30 minutos. Durante el transcurso de la medida se inyecta un caudal de nitrógeno de 100 mL/min.

2. Procesos de homogeneización empleados para la formación de emulsiones

Dependiendo del método a seguir para la formación de emulsiones tipo Pickering con las que se producen las cápsulas de los diferentes materiales empleados en la presente tesis doctoral se utiliza un tipo u otro de homogeneizador diferente adecuándose a los materiales y procedimientos de cada uno.

2.1. Sonda de ultrasonidos

Para la preparación de la emulsión empleando las nanopartículas de sílice Aerosil® A200 se emplea el sonicador QSONICA Q500, mostrado en la **Error! Reference source not found.**, que cuenta con dos sondas de diferente diámetro que se usan dependiendo del volumen de emulsión a preparar. La sonda de 1/2” permite trabajar con volúmenes entre 20 y 250 mL, a una amplitud máximo del 75%. Por otro lado, con la sonda de 3/4” se pueden manejar volúmenes mayores, desde 50 hasta 500 mL, y permite utilizar la totalidad de la amplitud que el equipo es capaz de aportar. El equipo tiene una potencia 500 vatios y es capaz de aportar una frecuencia de 20 kHz a la muestra.



Figura IV.6 – Sonda de ultrasonidos empleada para la formación de la emulsión con las nanopartículas de sílice Aerosil® A200

2.2. Mezclado de alta velocidad y cizalla

Para la preparación de emulsiones empleando diferentes materiales se usa el agitador de alta potencia de la marca Silverson, modelo SL5 (Silverson[®], Chesham, UK). Se trata de un agitador del tipo rotor/estator de alto cizallamiento que permite una velocidad de agitación de hasta 8000 rpm (6000 rpm a plena carga) y con un volumen en el rango entre 0.5 a 12 L. Se emplea con el cabezal de desintegración general, Figura IV.7, con el que va equipado el sistema.



Figura IV.7 Cabezal de desintegración general del agitador Silverson

El mecanismo de funcionamiento del agitador se presenta en la Figura IV.8. La alta velocidad de rotación de las cuchillas en el rotor crea una succión potente que mueve líquidos y sólidos desde el fondo del recipiente hacia el centro del área de trabajo. Una vez allí, la fuerza centrífuga los impulsa hacia la periferia del cabezal, donde son dispersados en el espacio ajustado entre las cuchillas del rotor y la pared interna del estator. Esto produce un cizallamiento hidráulico intenso, empujando los materiales a alta velocidad a través de los orificios del estator y haciéndolos circular de nuevo en la mezcla principal.

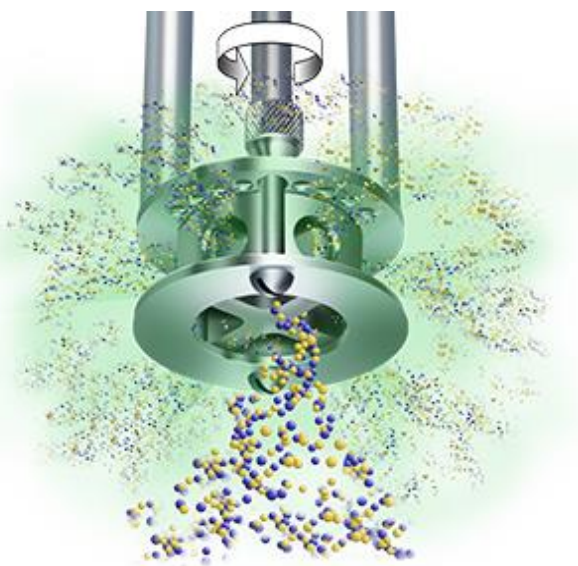


Figura IV.8 – Mecanismo de acción del agitador Silverson SL5

2.3. Vortex

Tanto para la mezcla general de disoluciones en diferentes momentos de los procedimientos descritos como para la formación de la emulsión usando nanopartículas de látex se utiliza un agitador tipo Vortex de la marca VWR que permite una velocidad de agitación de hasta 2500 rpm.

2.4. Homogeneizador de alta presión

Para la formación de la miniemulsión en la que posteriormente se lleva a cabo la reacción de polimerización que da lugar a la formación de las nanopartículas de látex se usa el homogeneizador de alta presión Nano DeBEE presentado en la Figura IV.9, donde se identifican las diferentes partes de las que consta el equipo.



Figura IV.9 – Homogeneizador de alta intensidad Nano DeBEE

3. Separación de fases

Para la separación de fases se utiliza una centrífuga refrigerada modelo Universal 320R de HETTICHLAB con una fuerza centrífuga relativa máxima (RCF) de 24900, a 16000 min^{-1} , que permite utilizar tubos de hasta 50 mL.

4. Medida de absorbancia

4.1. Espectrofotómetro

Para la medida de la absorbancia se ha utilizado un espectrofotómetro UV-Visible Cary 100 Bio VARIAN de Agilent Technologies de doble haz, con un rango de longitudes de onda entre 190 y 900 nm con una resolución $\leq 0.24 \text{ nm}$, precisión de $\pm 0.2 \text{ nm}$ y desviación estándar de 10 medidas < 0.02 .

4.2. Lector de placas

Para la lectura de microplacas se ha utilizado el lector de microplacas 2100-C, Optic Ivymen Systems™, de COMECTA®, equipado de serie con un sistema óptico bicromático con 5 longitudes de onda (405, 450, 492, 562, 630 nm) con un rango de lectura de absorbancia: 0 - 3500 A, exactitud: ± 0.007 A, precisión ± 0.005 A y resolución de 0.001 ABS (0.0001 ABS para el cálculo).

5. Control de pH de las reacciones de reducción de un metal

Para la dosificación de reactivos y control del pH se ha utilizado un titrador automático Titrino 736 GP de Metrohm que consta de un depósito para el agente valorante conectado a una bureta de 10 mL capaz de dosificar con una velocidad máxima de adición 25 $\mu\text{L/s}$ y una precisión de 1 μL . Dispone de software adecuado para realizar valoraciones, ajustar el pH, mantener el pH y llevar a cabo valoraciones potenciométricas.

6. Mecanismos de liberación

6.1. Reómetro

Se ha utilizado el reómetro Kinexus Lab+ de Malvern Panalytical, que permite trabajar en distintos modos de operación (Control de deformación directa, control de velocidad de cizalla (shear rate control), control del esfuerzo de cizalla (shear stress control), con un rango de torque de entre 0.01 y 200 mNm con una resolución de 0.1 nNm, con un rango de velocidad angular de entre 10 nrad/s a 628 rad/s.

6.2. Sonda de ultrasonidos

Además de usarse para la formación emulsiones, la sonda de ultrasonidos QSONICA Q500 se emplea como mecanismo de liberación adicional para la ruptura de las cápsulas y la liberación del tinte total contenido en las cápsulas para determinar la eficacia de encapsulación global. Para ello, se aplica un tiempo efectivo de ultrasonidos de 10 minutos con pulsos de 30 segundos de funcionamiento y 10 segundos de reposo, usando la sonda de 1/2" y una amplitud del 75%.

7. Optimización de los mecanismos de formación de cápsulas con nanopartículas de sílice Aerosil® A200

Dependiendo del tipo de partículas con los que se vayan a realizar las cápsulas, se siguen diferentes métodos que son descritos en los siguientes apartados.

Propiedades que deben tener estas cápsulas:

- Capacidad de retención
- Biodegradables o inocuas para el medioambiente
- Duraderas

7.1. Procedimiento de encapsulación con nanopartículas de sílice Aerosil® A200

7.1.1. Metodología para la formación de las cápsulas

Siguiendo la metodología llevada a cabo por Bollhorst et. al. [71], se pretenden sintetizar coloidosomas mediante una emulsión de agua en aceite, W/O, quedando las nanopartículas de sílice en la interfase de la emulsión y protegiendo al núcleo del resto de la emulsión, formándose partículas del tipo “*core-shell*”.

Se preparan por separado las dos fases con las que posteriormente se formará la emulsión. La fase orgánica está constituida por 15 mL de una disolución 5mM de ácido esteárico en decano. Por otro lado, la fase acuosa consiste en 4 mL de disolución acuosa de nanopartículas de sílice al 3%wt. La función del ácido esteárico es la de, una vez formados los coloidosomas por la agregación de partículas, colocarse alrededor de los mismos, evitando la agregación de éstos, aportando una mayor estabilidad a la emulsión.

Para la formación de la emulsión se recurre a la aplicación de ultrasonidos, que aporta la energía necesaria al sistema para la formación de los coloidosomas. El equipo usado es el sonicador QSONICA modelo Q500 con 500 w y 20kHz. La sonda funciona en ciclos de 15 s aportando energía y 5 s de reposo, para evitar un calentamiento excesivo de la disolución, aun así, la temperatura sube bastante por lo que el tubo Falcon donde se lleva a cabo el proceso de emulsificación se introduce en un baño de agua helada. A partir de 10 min, la emulsión se vuelve más estable, aunque se prologa hasta los 15 min el tiempo de aplicación de ultrasonidos para asegurar la estabilidad de la emulsión. El método se resume en la Figura IV.10.

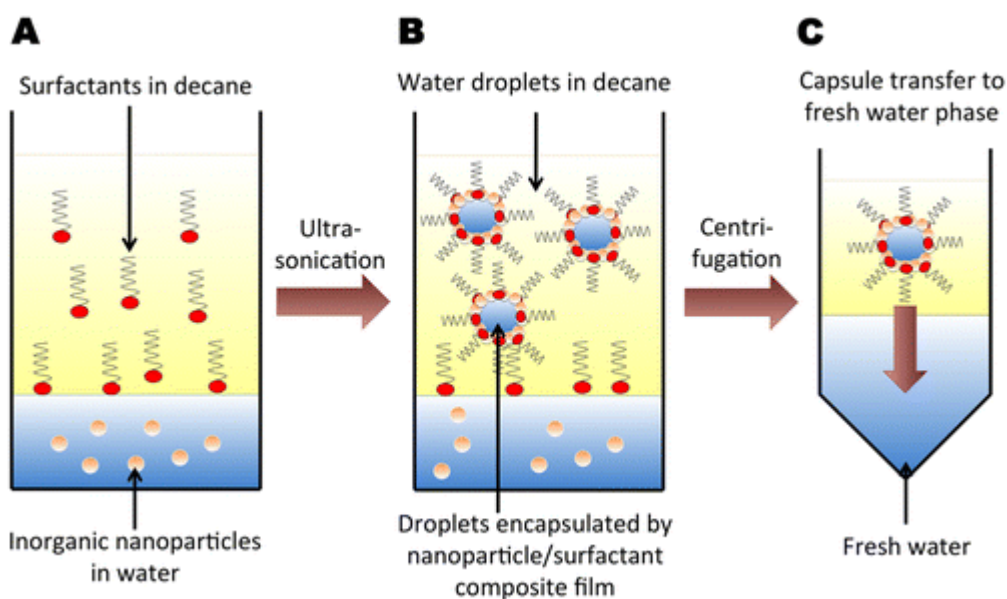


Figura IV.10 – Preparación de coloidosomas. (A) Sistema antes de la generación de coloidosomas que consiste en una solución de aceite (arriba) y una suspensión acuosa de nanopartículas (abajo). (B) Autoensamblaje de lípidos y nanopartículas en la interfase agua-aceite después de una emulsificación de agua en aceite inducida por ultrasonidos. (C) Transferencia de coloides auto ensamblados a una nueva fase acuosa por centrifugación. Fuente: Bollhorst et al.[71].

7.1.2. Sustitución del disolvente orgánico en la formación de la emulsión

El problema del método descrito en el punto anterior es la utilización de un disolvente orgánico como el decano en la preparación de la emulsión. Aunque la toxicidad del decano no es tan alta si se compara con la de otros compuestos alcohólicos o hidrocarburos [72], se trata de un compuesto que se engloba dentro del grupo de los COV. Por este motivo, su uso debe ser reducido por las implicaciones ambientales que puede originar. Si en su emisión a la atmósfera, el decano contribuye a la formación de ozono en la superficie terrestre y cuando se emite a la atmósfera, bajo la influencia de la luz solar, reacciona con los óxidos de nitrógeno, dando lugar a la generación de más ozono. Los niveles elevados de ozono pueden tener efectos nocivos en la salud humana y los ecosistemas, ocasionando problemas respiratorios y daños a la vegetación.

En situaciones de derrame o escape, el decano tiene el potencial de contaminar fuentes de agua, representando una amenaza para la vida y los ecosistemas acuáticos. Es crucial manejar y transportar el decano con extrema precaución para prevenir liberaciones accidentales que puedan resultar en la contaminación del agua. Estos derrames también pueden ocasionar la contaminación del suelo, afectando la fertilidad del mismo y potencialmente dañando la vida vegetal. La persistencia del decano en el suelo puede

obstaculizar el crecimiento de la vegetación y perturbar el delicado equilibrio de los ecosistemas.

Por todo esto, una vez puesto a punto el método, se procede a sustituir el disolvente orgánico por aceite de girasol, cuyo comportamiento ambiental mejora considerablemente respecto al decano. La introducción de aceite de girasol conlleva una mayor dificultad en cuanto a una eliminación más difícil. Por ello, se plantea un proceso de lavado que consiste en lo siguiente:

- Centrifugación emulsión obtenida: 30 min, 5000 rpm, 25°C
- Retirada de todo el sobrenadante y redispersión en 10 mL de agua milli-Q y agitación suave en Vortex durante 15 s.

El ciclo se puede repetir tantas veces como sea necesario, pero presenta el inconveniente de deteriorar la muestra si se realiza demasiadas veces, por lo que 2 o 3 ciclos de lavado se considera suficiente para retirar todo el aceite presente en el exterior de las cápsulas.

7.1.3. Recubrimiento inorgánico con CaCO_3

Para mejorar la impermeabilidad de las cápsulas formadas con las nanopartículas de sílice Aerosil® A200, se ensaya el recubrimiento de las cápsulas de sílice con carbonato cálcico, que se forma poniendo en contacto carbonato sódico y cloruro cálcico. Para ello se añaden 0.5 mL de disolución de Na_2CO_3 a los 4 mL de fase acuosa y se mezclan; para hacer la emulsión se toman 4 mL de esta mezcla para mantener la relación entre la fase acuosa y la orgánica.

Se prueban diferentes concentraciones de la disolución de sal para comprobar su efecto, se ensaya con disoluciones al 3, 6, 9 y 12% de la sal. Una vez formada la emulsión, tras la aplicación de ultrasonidos, se añade una disolución al 8%wt de CaCl_2 y se agita suavemente la emulsión para provocar la precipitación en forma de CaCO_3 para generar la capa de recubrimiento alrededor de las cápsulas.

En cuanto al volumen de adición de la disolución de cada una de las sales se realiza de la siguiente forma, para la disolución al 3%wt de Na_2CO_3 se añade el mismo volumen (0.5 mL) de la disolución al 8%wt de CaCl_2 . Esta misma proporción se mantiene cuando se aumenta la concentración del carbonato sódico.

7.1.4. Ensayos de liberación

Para estudiar el comportamiento de las cápsulas con y sin recubrimiento se llevan a cabo diferentes ensayos de liberación.

7.1.4.1.Liberación por dilución en membrana de diálisis

Una vez preparada la emulsión, se somete a centrifugación para separar las cápsulas del resto del líquido, quedando las cápsulas formadas en la parte inferior del tubo. Estas cápsulas se diluyen en 20 mL de agua y se introducen en la membrana de diálisis. El resto de volumen de agua hasta completar el volumen total de dilución, 200 mL se añade en el recipiente donde se lleva a cabo el ensayo de liberación.

7.1.4.2.Liberación en sistema BSF

Para reproducir unas condiciones más similares a las que se tendrían en un ensayo de lavado real, se recurre al sistema BSF (Bath-Sustrate-Flow) [73]. El dispositivo experimental se detalla en la Figura IV.11, las diferentes partes que se indican son:

1. Depósito de vidrio de 250 mL de capacidad donde se introduce el agua de dilución.
2. Columna de vidrio donde se introduce la suciedad y se hace pasar la disolución para comprobar la efectividad del lavado.
3. Baño termostático para controlar la temperatura del proceso.
4. Bomba peristáltica que controla el caudal de recirculación de la disolución de lavado.
5. Agitador mecánico para aumentar la turbulencia en el reactor.

De esta forma, las cápsulas se introducen igualmente en la membrana de diálisis y se colocan en el reactor, se completa hasta tener un volumen de agua de 200 mL y se hace recircular la disolución acuosa. Se toman muestras de la disolución de lavado con el paso del tiempo para comprobar el proceso de liberación de tinte desde el interior de las cápsulas, mediante medida directa en el espectrofotómetro.

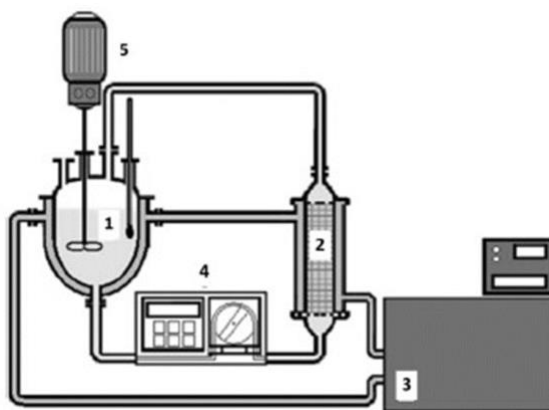


Figura IV.11 – Dispositivo experimental para el ensayo de liberación con el sistema BSF

Mediante este sistema se pueden controlar diferentes variables, Figura IV.12, de forma simultánea para comprobar su efecto en el ensayo de lavado. De esta forma, se puede estudiar la influencia de variables como la concentración de nanopartículas en la formación y estabilidad de la emulsión o la velocidad de agitación y temperatura en el ensayo de liberación en dichos experimentos.

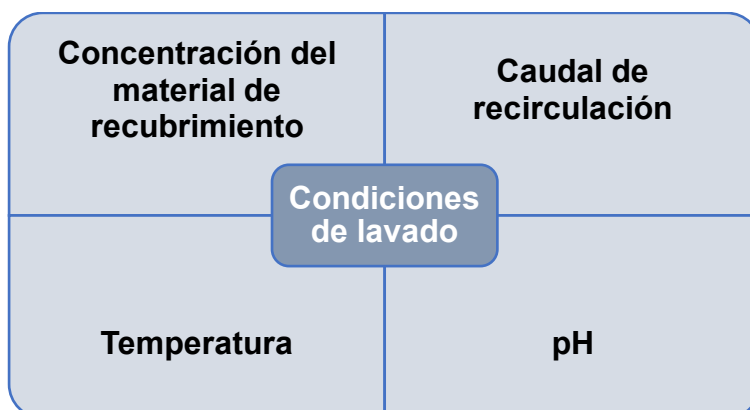


Figura IV.12 – Variables controladas durante la liberación en el sistema BSF

8. Proceso de encapsulación utilizando nanopartículas de sílice Ludox

Se detalla en los siguientes apartados la metodología seguida con el empleo de las nanopartículas de sílice Ludox®.

8.1. Objetivo

El principal objetivo para el que se quieren obtener cápsulas de sílice a partir de la disolución comercial de nanopartículas Ludox® es que sean capaces de retener en su interior un biocida comercial como es el Bronopol y su liberación se lleve a cabo de forma controlada en el momento deseado.

Para ello, se recurre a la formación de las cápsulas a partir de una emulsión de agua en aceite, donde el biocida se añade en la fase acuosa junto con las nanopartículas de sílice.

8.2. Preparación de las cápsulas de sílice

Para la formación de las cápsulas con las nanopartículas Ludox[®] se emplean diferentes sistemas de homogeneización. A lo largo de la experimentación llevada a cabo, se utilizan Vortex, Ultraturrax y Silverson L5M como equipos para conseguir la formación de la emulsión y, por tanto, la obtención de las cápsulas. En la sección de discusión de resultados se detalla lo obtenido mediante cada uno de ellos.

El método general de preparación de las cápsulas se basa en el método desarrollado por Brossault et al. [74]. El procedimiento seguido se detalla a continuación.

Se toma 1 mL de la disolución comercial de Ludox[®] por cada 100 mL de emulsión a preparar. El volumen total de emulsión se define en función del tipo de homogeneizador a utilizar:

- 30 mL para Vortex
- 100 mL para Ultraturrax
- 200 mL para Silverson

Se preparan cápsulas con y sin presencia del tensioactivo Span 80, para corroborar su efecto y estudiar si facilita la formación de las cápsulas. Cuando se añade el tensioactivo, se añade en un 1%v en el aceite de girasol. Se agita en el mismo homogeneizador que se vaya a utilizar para dispersar bien el tensioactivo y obtener una disolución homogénea previamente a la formación de la emulsión. Posteriormente se añade lentamente la disolución de nanopartículas.

En el siguiente paso, se forma la emulsión con la utilización de alguno de los homogeneizadores descritos. Los tiempos de agitación de cada uno son:

- La emulsificación en Silverson se lleva a cabo durante 1 minuto a 5000 rpm.
- En el caso del Ultraturrax, la emulsificación se consigue tras 1 minuto a 12000 rpm.
- En Vortex, se utiliza la máxima potencia, que equivale a 2000 rpm y se agita también durante 1 minuto.

Tras esto, una vez finalizado el tiempo necesario para la formación de la emulsión, se añade gota a gota el mismo volumen de una disolución 1M de CaCl_2 que el volumen añadido de Ludox® al inicio del procedimiento, tras completar la adición, se agita suavemente la emulsión. En este paso se consigue la precipitación de las nanopartículas de sílice en cada una de las gotas de agua que forman parte de la emulsión cuando se ponen en contacto con la sal añadida.

Este paso es especialmente importante porque se trata del momento en el que las cápsulas de sílice pueden atrapar en su interior las moléculas de la especie que se pretende encapsular. Es justo en el momento de la precipitación, donde las partículas presentes en la fase acuosa de la emulsión pueden retenerse en el interior de las cápsulas formadas. El mecanismo de formación se describe en la Figura IV.13.

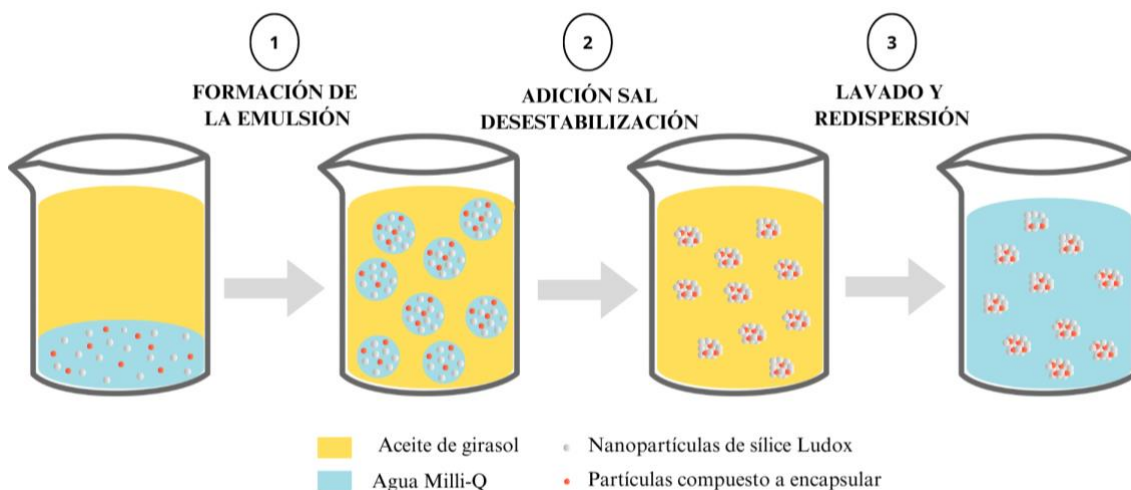


Figura IV.13 – Mecanismo de formación de las cápsulas de sílice (Adaptación de Brossault et al.[75])

En este punto, las cápsulas ya se han formado y el siguiente paso es llevarlas a una fase acuosa que permite un mejor manejo y aplicabilidad. Para ello, el volumen total de emulsión se divide en tubos Falcon para introducirlos en la centrifuga. El proceso de centrifugación se lleva a cabo a 3000 rpm durante 5 minutos. Por diferencia de densidades, el aceite queda en la parte superior y es fácilmente retirable utilizando una pipeta de plástico. Para eliminar totalmente las posibles trazas de aceite restante, se añaden 10 mL de etanol y se procede a un segundo ciclo de centrifugación a 500 rpm durante 5 minutos.

Finalmente, tras este último paso, las partículas se dispersan en 5 mL de agua Milli-Q. Las cápsulas formadas son caracterizadas utilizando las técnicas de microscopía descritas en el apartado IV.1.4.

8.3. Adición de una sal insoluble en el proceso de formación de las cápsulas

Alternativamente, se prueba la sustitución del cloruro cálcico como sal que provoca la desestabilización coloidal de las partículas de sílice motivando su agregación por una sal insoluble en agua que a la vez que origine la precipitación se pueda quedar formando una capa de recubrimiento alrededor de las nanopartículas de sílice.

La sal escogida es el carbonato cálcico, CaCO_3 . Tras el estudio de su solubilidad, se decide utilizar una concentración de la sal de 1 g/L. Así tras la formación de la emulsión, se añade el mismo volumen de disolución de carbonato cálcico que el que se añadiría de cloruro cálcico. Los resultados obtenidos se estudian mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

8.4. Ensayos de liberación

Para el ensayo de liberación se sigue el mismo procedimiento que el indicado para las nanopartículas de sílice Aerosil[®]A200. Por lo que se obtienen los perfiles de liberación de las diferentes cápsulas preparadas con tinte y bronopol. Para comparar los diferentes resultados de liberación y poder determinar las cantidades de tinte perdido en el proceso de emulsificación, se prepara un experimento control, donde se añade la misma cantidad de tinte que para la preparación de la emulsión que sirve como referencia para determinar la eficacia en el proceso de encapsulación.

La inclusión del tinte o el bronopol se lleva a cabo en la fase acuosa de Ludox[®] antes de añadir el aceite de girasol. Para 200 mL de emulsión, se añaden sobre 2 mL de Ludox, 0.5 mL de agua Milli-Q en el que previamente se ha disuelto 0.1g de tinte. En el caso del bronopol, se añade el mismo volumen de disolución, pero, en este caso, a una concentración de 0.15 g/L, ambas concentraciones se eligen de forma que al llevar a cabo la dilución hasta 200 mL de agua para el ensayo de liberación puedan ser medidas en el espectrofotómetro.

8.5. Recubrimiento con sales inorgánicas

Para dotar a las cápsulas de un recubrimiento extra que mejore la impermeabilidad de las cápsulas, se recurre en primer lugar a la utilización de unas sales inorgánicas para comprobar su efecto. Así, siguiendo con el procedimiento anteriormente descrito, se introducen algunas modificaciones para estudiar el efecto de la adición de carbonato

sódico y carbonato cálcico en proceso de formación de las cápsulas y si es posible crear una capa de recubrimiento a su alrededor.

8.5.1. Carbonato sódico

Para estudiar el efecto de la adición de carbonato sódico en la formación de las cápsulas y comprobar si se consigue formar una capa extra que cubra la superficie de las cápsulas se realiza una variación en el procedimiento original de formación de las cápsulas (apartado 8.2).

La adición de la sal se realiza en la fase acuosa previamente a la formación de la emulsión. Al tratarse de una sal, se realiza un estudio para optimizar la concentración y el volumen de disolución de sal a añadir a la disolución acuosa de las nanopartículas de sílice Ludox.

Una vez elegida la mejor proporción de la mezcla entre el Na_2CO_3 y la disolución de Ludox, se somete esta mezcla al procedimiento original, homogeneizándose en Silverson durante 1 minuto a 5000 rpm. Después se añade el CaCl_2 y se mantiene una agitación suave durante un minuto más.

De la misma forma, el proceso de separación y dispersión de las cápsulas formadas es el mismo que el indicado anteriormente.

8.5.2. Carbonato cálcico

Alternativamente a la prueba para sustituir al cloruro de calcio en el proceso de formación de la emulsión, se utiliza el carbonato cálcico para la formación de una posible capa de recubrimiento alrededor de las cápsulas de sílice formadas.

Debido a que la adición de la sal provoca una solidificación instantánea de la disolución de Ludox, se añade después de la formación de la emulsión. Así, se preparan diferentes muestras para determinar la influencia del carbonato cálcico en la emulsión. Finalmente se forma la emulsión con 1.5 mL de la disolución de Ludox® hasta completar 150 mL de mezcla con aceite de girasol, formando la emulsión con el agitador Silverson, tras esto se añaden los volúmenes indicados a continuación de diferentes disoluciones para estudiar su efecto. Tras cada adición se sigue de una agitación suave para homogeneizar bien la mezcla.

La disolución de carbonato se prepara a una concentración de 1 g/L en medio ácido para favorecer la disolución de la sal antes de añadirla a la emulsión. Las muestras probadas son las siguientes:

- C1: 1.5 mL CaCl_2 1M + 1 mL CaCO_3 1 g/L (pH 5.5) L+ 1 mL NaOH 1M
Se añade cloruro cálcico para la agregación de las nanopartículas de sílice y seguidamente se añade 1 mL de la disolución de carbonato cálcico. Una vez se ha mezclado se añade 1 mL de sosa 1M para provocar la precipitación de la sal en la emulsión.
- C2: 1 mL CaCO_3 1 g/L (pH 5.5) + 1 mL NaOH 1M
Se añade directamente la disolución de carbonato cálcico a la emulsión y posteriormente se añade la sosa
- C3: 1.5 mL CaCl_2 1M + 1 mL CaCO_3 1 g/L (pH 5.5)
Se añaden las dos sales en el orden indicado, pero sin añadir al final la sosa.

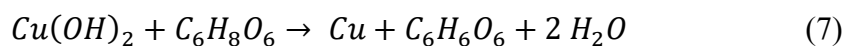
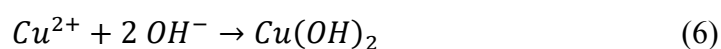
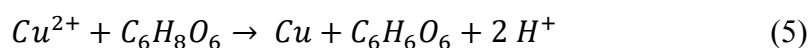
Las tres muestras se someten al proceso de lavado y redispersión de las cápsulas formadas en agua y se preparan para el ensayo de liberación.

8.6. Recubrimiento metálico

Para la formación de un recubrimiento inorgánico de carácter metálico se procede a la reducción in situ de la sal de metal añadida en la mezcla mediante ácido ascórbico. Se utilizan sales de cobre y plata para este fin, llevando a cabo la optimización de las concentraciones de los metales y el ácido para la correcta formación de la capa de recubrimiento. Para determinar la presencia del metal sobre la superficie de las cápsulas las muestras son analizadas mediante SEM y su herramienta de análisis mediante EDS.

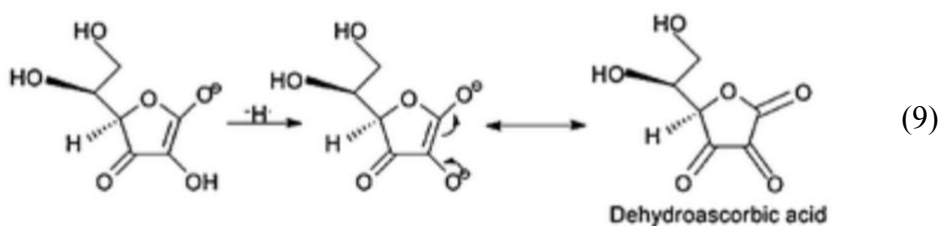
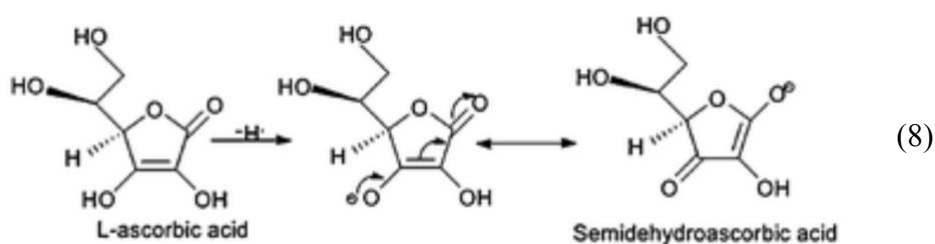
8.6.1. Reducción del metal a un pH controlado

Las reacciones de reducción redox de los metales en presencia de ácido ascórbico son complejas. Así, la reacción de reducción del cobre, según Wu [76] tendría el siguiente mecanismo:

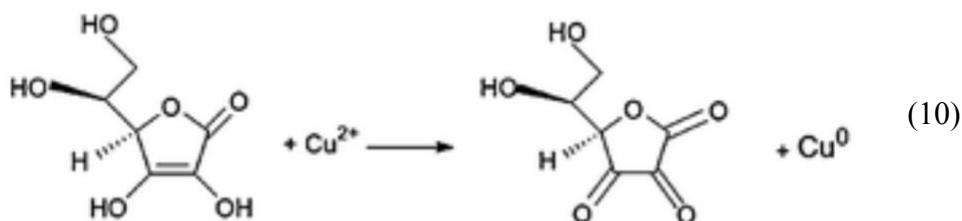


En la reacción (4) se puede observar que en medio básico, en este caso NaOH 0.5M, se forma hidróxido de cobre. Este hidróxido cúprico al reaccionar con el ácido ascórbico presente en el medio origina la formación de las nanopartículas de cobre.

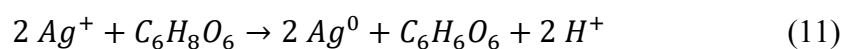
Por otro lado, en el artículo de Xiong et al. [77] se detalla de una forma más completa el proceso de oxidación del ácido ascórbico como se presenta en (8) y (9), donde en cada etapa el ácido ascórbico libera el protón de un grupo hidroxilo para finalmente formar el ácido deshidratado, $C_6H_6O_6$.



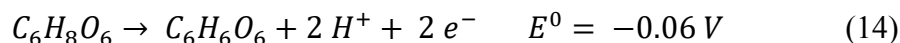
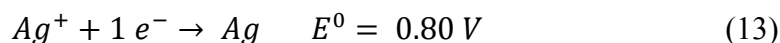
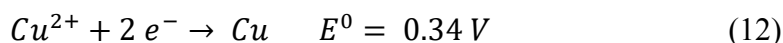
La reacción global se presenta en la ecuación (10).



En el caso de la plata se sigue un mecanismo similar para la formación de las nanopartículas de plata mediante la reducción de su sal, $AgNO_3$. Donde Piñero et al. [78], establecen la reacción global de reducción:



Los potenciales reducción de cada una de las reacciones que intervienen en el proceso Redox, son:



Por lo que, electroquímicamente, el transcurso de las reacciones de reducción de los metales está favorecido cuando están en contacto los metales con el ácido ascórbico, ya que el potencial de reducción de los metales es mayor que en el caso del ascórbico y por tanto se puede llevar a cabo la reducción de los metales cuando reaccionan con el ácido ascórbico.

Una vez definido el mecanismo de reacción, se requiere de un control de pH para que la reacción se lleve a cabo en las mejores condiciones. Se requiere disponer de una base que se vaya dosificando lentamente para mantener el pH en el valor elegido ya que la formación del hidróxido cúprico retira OH^{-} del medio y por tanto baja el pH. Para ello, se emplea el valorador Titrino con una disolución de sosa 0.5 M.

En este punto, que ya se ha comprobado la viabilidad de la formación de nanopartículas cobre y plata mediante la reducción con ácido ascórbico, se requiere que estas partículas producidas se depositen sobre la superficie de las cápsulas de sílice. Para ello, es necesario que las partículas metálicas tengan afinidad por las de sílice, atrayéndose y ubicándose sobre ellas. Este proceso va a estar muy influenciado por el potencial zeta. Si se tienen valores opuestos de potencial zeta, la atracción electrostática se verá favorecida y, por tanto, se podría llevar a cabo la formación de la capa de recubrimiento.

En el caso de las partículas de sílice, su punto isoelectrico se encuentra a un pH cercano a 2. Después, a valores más altos de pH se tiene una clara carga negativa, como lo demuestran sus valores de potencial zeta. En el caso de los metales, suelen tener el punto isoelectrico a valores más altos de pH. Los perfiles de valoración para el cobre y la plata [79] se muestran en la Figura IV.14, de donde se pueden extraer los valores para el punto isoelectrico de cada metal, siendo a un valor de pH de 7 para el cobre y de 5.5 para la plata.

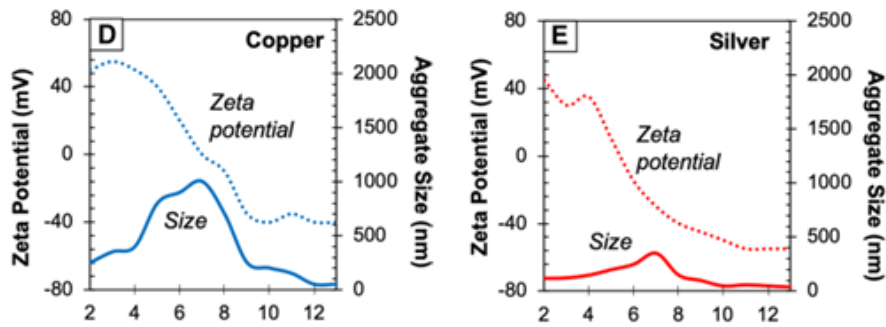


Figura IV.14 – Variación del potencial zeta de las nanopartículas de cobre y plata en función del pH.
Fuente [79]

Así pues, para favorecer la deposición del metal sobre la superficie de las cápsulas, se tiene que trabajar en el rango de pHs que entre los puntos isoeléctricos del metal y de las partículas de sílice. Como se presenta en la Figura IV.15, la formación de la capa de recubrimiento sería viable si se trabaja en la zona de pH marcada con las líneas verdes, donde se obtienen cargas superficiales opuestas entre sílice y los metales. El pH óptimo de trabajo con el cobre se establece en 6 y un valor más bajo, a pH 4 para la plata maximizarían la diferencia entre las curvas y, por tanto, asegurarían una mayor atracción entre las partículas.

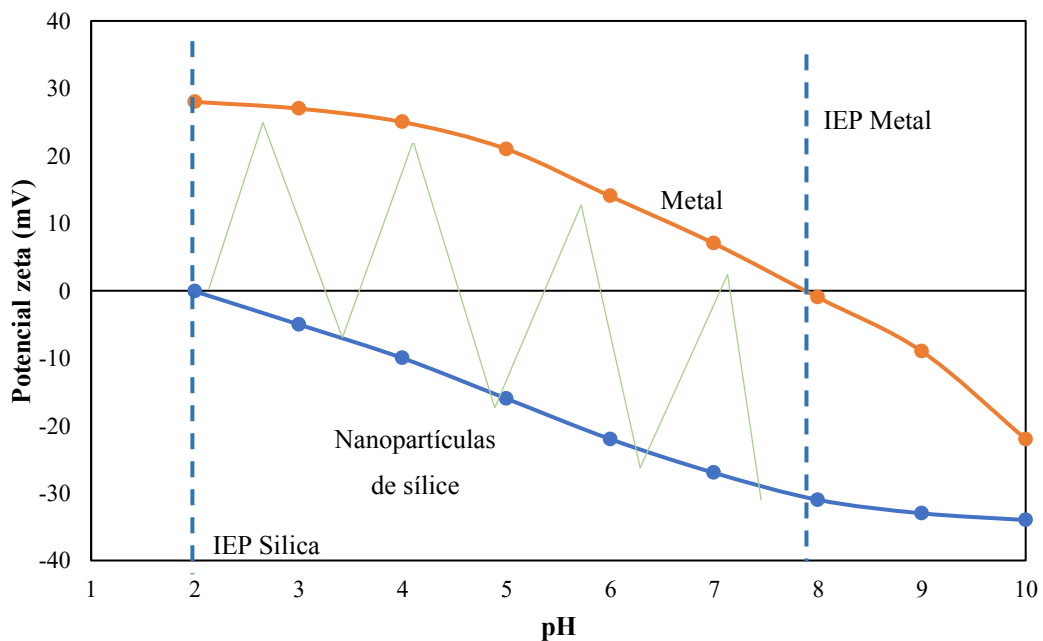


Figura IV.15 – Rango de pH óptimo para la deposición del metal sobre la superficie de las cápsulas de sílice

8.6.2. Preparación de las muestras para la formación de un recubrimiento metálico

La creación de una capa extra de recubrimiento con metal sobre la superficie de las cápsulas de sílice se lleva a cabo realizando alguna modificación sobre el procedimiento original de preparación de las cápsulas de sílice Ludox.

Se ensaya añadir el metal tanto en la disolución acuosa de las nanopartículas de sílice Ludox, previamente a la formación de la emulsión, como después de formar la emulsión y una vez que ya se ha añadido el CaCl_2 para provocar la agregación de las nanopartículas de sílice.

Para añadir el metal previamente a la formación de la emulsión, interesa disolver la sal en el mínimo volumen posible para no variar en exceso la concentración de las partículas de sílice, incluso se plantea la adición de la sal del metal directamente sobre la disolución comercial de Ludox.

Por otro lado, si se añade una vez formadas las cápsulas de sílice, estas, se someten al proceso de lavado y separación de todo el aceite sobrante y la redispersión se realiza en una disolución acuosa del metal. A continuación, se detallan las concentraciones y los métodos concretos utilizados para el recubrimiento con cada uno de los metales.

8.6.2.1. Recubrimiento con cobre

En la preparación de las cápsulas de sílice para los ensayos de recubrimiento con cobre se emplean el Ultraturrax y el agitador Silverson como sistemas de homogeneización, el utilizado en cada uno de los casos ensayados se detalla en la sección de Discusión de Resultados.

Una vez formadas las cápsulas, a partir de 200 mL de emulsión, se centrifuga y se retira todo el líquido. Paralelamente se preparan 10 mL una disolución de CuCl_2 al 0.25%wt que se añaden a las cápsulas de sílice. Para dispersar bien las cápsulas de sílice en la disolución metálica, se agitan suavemente en Vortex. Una vez se encuentran suspendidas las cápsulas, se añaden 2 mL de una disolución de ácido ascórbico al 2.5%wt, cantidad estequiométrica en exceso para llevar a cabo la reducción completa de las partículas de cobre.

Como se ha indicado anteriormente, la reacción de reducción se lleva a cabo a un pH controlado mediante el valorador automático Titrino. Mediante la adición de una disolución de NaOH 0.5M a una velocidad lenta de dosificación, se mantiene el pH de la

disolución a unos valores de pH de 4 y 6. Para comprobar la formación de la capa de recubrimiento de cobre, se preparan las muestras para SEM. Para ello, se toma una muestra de la disolución metálica que contiene las cápsulas de sílice y se centrifuga a 3000 rpm durante 5 min para separar las cápsulas de la disolución metálica. Las cápsulas se redispersan ahora en una disolución de tensioactivo para evitar la agregación entre ellas, se añaden 10 mL de SDS al 1%wt. Se toma una gota de esta disolución y se deja secar sobre el porta muestras del SEM. Para proteger la muestra y mejorar las imágenes obtenidas en SEM, se le realiza un recubrimiento con carbono a la muestra.

Se realizan diferentes experimentos variando el tiempo de reacción y las concentraciones de metal usadas, pero siguiendo la misma metodología.

También se prueba a la modificación del orden de adición del metal, añadiéndolo junto con la disolución Ludox. Para ello, se pesa la misma cantidad de metal que la necesaria para preparar los 10 mL de disolución de cobre al 0.25%wt, que equivale a 2.5 g de la sal del metal, y se añade directamente con las nanopartículas de sílice. Para homogeneizar bien la disolución se agita en Vortex antes de añadirlo sobre el aceite de girasol.

Por último, se ensaya con la aplicación de temperatura durante la reacción de reducción del metal, calentando la disolución hasta una temperatura de 45°C.

En todos los casos, la caracterización de las cápsulas obtenidas se lleva a cabo mediante SEM para corroborar si se ha conseguido formar la capa de recubrimiento metálico alrededor de la superficie de las cápsulas de sílice.

8.6.2.2. Recubrimiento con plata

La adición de la sal de plata se realiza una vez formada la emulsión y se ha añadido el CaCl_2 . A las cápsulas separadas por centrifugación se les añaden 10 mL de disolución acuosa de AgNO_3 al 0.1%wt. La mezcla se agita suavemente en Vortex hasta que se consigue la suspensión completa de las cápsulas en la disolución acuosa. Tras esto, se añaden 2 mL de disolución de ácido ascórbico a una concentración del 2.5%wt. La mezcla se mantiene en agitación a 800 rpm durante dos horas a temperatura ambiente.

Una vez transcurrido este tiempo, se centrifuga a 3000 rpm durante 5 minutos y las cápsulas se redispersan en una disolución de SDS al 1%wt. Se toma una gota de esta disolución y se deja secar sobre el porta muestras del SEM para analizar los resultados

obtenidos. Se le aplica un recubrimiento de carbono a la muestra antes de ser introducida en el microscopio.

8.7. Recubrimiento de las cápsulas con partículas de quitosano

De forma similar a lo planteado con las sales de cobre y plata para la formación de un recubrimiento metálico alrededor de las cápsulas de sílice, se plantea la adición de quitosano para que se deposite sobre la superficie de las cápsulas.

En primer lugar, el quitosano tiene una marcada carga positiva en su superficie. Para corroborarlo, se estudia su comportamiento en cuanto a su variación del potencial zeta con el pH, obteniendo su curva de valoración mediante el empleo del Zetasizer.

Así, una vez establecidas las mejores condiciones de pH para llevar a cabo el experimento se procede a crear una capa de recubrimiento alrededor de las cápsulas. Para este fin, una vez preparadas las cápsulas se centrifugan y se dispersan en una disolución de quitosano al 0.25%wt con una viscosidad que permite la agitación para suspender las cápsulas de sílice para interactuar con las moléculas de quitosano.

Para comprobar el efecto obtenido, se lleva a cabo una ensayo de liberación con la inclusión de tinte en el interior de las cápsulas. En total se plantean cuatro curvas diferentes para estudiar el comportamiento de liberación de las cápsulas.

1. Ensayo control con tinte, añadiendo la cantidad máxima de tinte que se podría liberar si no se pierde nada de tinte en los pasos sucesivos y se liberara la totalidad de este.
2. Mezcla de la misma cantidad de tinte empleada para la formación de cápsulas y las partículas de sílice sin realizar ninguna modificación extra.
3. Formación de las cápsulas de sílice con tinte en su interior. Añadiendo 0.1 g de tinte disuelto en 1 mL de agua Milli-Q junto con la disolución Ludox® para formar la fase acuosa de la emulsión.
4. Formación de las cápsulas de sílice con tinte en su interior y recubrimiento con quitosano. Siguiendo los pasos realizados en el experimento 3. La disolución de quitosano al 0.25%wt se pone en contacto con las cápsulas una vez formadas.

Las curvas de liberación para cada uno de los casos mencionados se muestran en la sección de Discusión de resultados y se valoran los datos de absorbancia obtenidos para cada curva con el tiempo.

8.8. Liberación del tinte total retenido mediante otros mecanismos de liberación

Una vez comprobado el tinte que las cápsulas son capaces de retener en su interior mediante los diferentes recubrimientos aplicados se procede a la liberación del tinte restante que puede haber sido retenido en el interior de las cápsulas y que no ha sido liberado mediante el ensayo de liberación por dilución. Para ello se aplican tres técnicas diferentes utilizando los equipos detallados en el apartado 6 de la sección de Metodología.

Usando el reómetro se pueden aplicar a la muestra de cápsulas esfuerzos cortantes que provoquen la ruptura de las cápsulas y su capa de recubrimiento para así liberar el tinte retenido.

El reómetro requiere de un volumen de muestra mínimo 1.2 mL, por tanto, se diluye la muestra de cápsulas preparadas y centrifugadas en este volumen de agua y se depositan sobre el plato del equipo. Durante 30 segundos se aplican esfuerzos crecientes y se toman muestras del líquido que se diluyen en la misma medida que se hacía en el ensayo por dilución para su medida en el espectrofotómetro y compararlos con los obtenidos en el ensayo por liberación.

8.8.1. Adición de una disolución ácida

Mediante la adición de una disolución ácida 0.5N de ácido acético, se pretende la disolución de la carcasa de recubrimiento creada alrededor de las cápsulas y poder así liberarse el tinte contenido en el interior.

Se añade el ácido y se dejan las muestras en agitación mientras se toman muestras para ser medida en el espectrofotómetro para determinar el porcentaje de liberación.

8.8.2. Aplicación de ultrasonidos

Por último, se recurre a la aplicación de ultrasonidos mediante la sonda disponible descrita en el apartado IV.2.1. Se lleva la muestra de cápsulas a un volumen de 20 mL de agua Milli-Q y se somete a la aplicación de ultrasonidos durante un tiempo efectivo de 10 min, con ciclos de 30 segundos de funcionamiento y 10 segundos de reposo para evitar el calentamiento excesivo de la muestra.

Igualmente, se toma una muestra y se diluye según el ensayo de liberación por dilución y se mide en espectrofotómetro para comparar los resultados obtenidos.

9. Proceso de encapsulación utilizando nanopartículas de látex

9.1. Objetivo

La utilización de nanopartículas de látex tiene como objetivo la formación de emulsiones de agua en aceite, W/O, de tipo Pickering donde las partículas del polímero queden en la interfase agua-aceite y se formen cápsulas capaces de retener compuestos interesantes en la formulación de detergentes como pueden ser enzimas, blanqueantes o desinfectantes para su liberación controlada.

9.2. Formación de las nanopartículas de látex

Para la formación de las nanopartículas de látex que van a ser utilizadas para la encapsulación de aditivos interesantes en la formulación de detergentes se lleva a cabo una reacción de polimerización implicando a tres monómeros diferentes, metil metacrilato, butil acrilato y ácido acrílico. El proceso de producción se detalla más adelante, pero en primer lugar se enumeran las diferentes propiedades de cada uno de estos monómeros empleados en la formación del látex.

9.2.1. Reactivos de la polimerización

Los diferentes reactivos empleados en la formación de las nanopartículas de látex son fundamentales para determinar las propiedades y el comportamiento, tanto funcional como ambiental, que tendrán una vez formadas. En este estudio, se emplean tres monómeros diferentes, así como otros compuestos que se describen a continuación:

- Metil metacrilato (MMA)

El metil metacrilato (MMA), también conocido como metacrilato de metilo, es un polímero termoplástico que se utiliza en una variedad de aplicaciones industriales y comerciales. La estructura molecular se presenta en la Figura IV.16

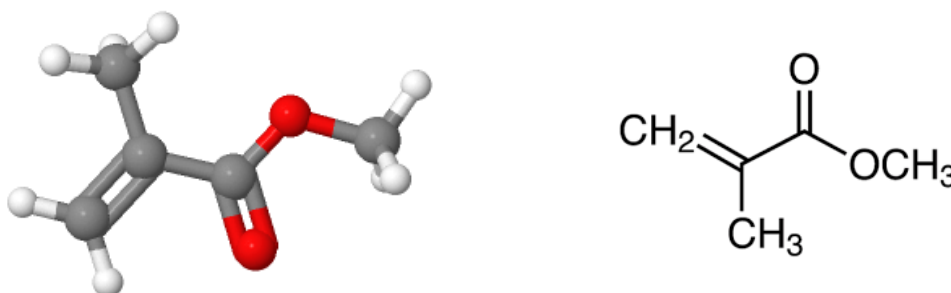


Figura IV.16 – Estructura química del metil metacrilato

A continuación, se mencionan algunas de las principales propiedades del metil metacrilato:

- **Transparencia:** El MMA es conocido por su alta transparencia y claridad óptica, lo que lo hace adecuado para aplicaciones en las que se requiere un alto grado de transmisión de luz. Es utilizado en la fabricación de productos como láminas de acrílico y paneles transparentes.
 - **Resistencia a la intemperie:** El metil metacrilato tiene una buena resistencia a la intemperie y a la radiación ultravioleta, lo que lo hace adecuado para aplicaciones al aire libre. No se degrada fácilmente por la exposición prolongada al sol.
 - **Buena resistencia química:** El MMA es resistente a muchos productos químicos, incluyendo ácidos y bases suaves, lo que lo hace útil en aplicaciones donde se requiere resistencia química.
 - **Buena estabilidad dimensional:** El MMA tiende a mantener sus dimensiones y forma original bajo diversas condiciones de temperatura y humedad, lo que es beneficioso para aplicaciones que requieren tolerancias ajustadas.
 - **Peso ligero:** El MMA es más ligero que el vidrio, lo que lo convierte en una opción atractiva para aplicaciones en las que se requiere reducir el peso, como en la fabricación de componentes de aeronaves y automóviles.
 - **Propiedades eléctricas:** El MMA tiene propiedades dieléctricas razonablemente buenas y se utiliza en la fabricación de aislantes y componentes eléctricos.
- Butil acrilato (BA)

El butil acrilato es un éster metacrílico que se utiliza en una variedad de aplicaciones industriales, especialmente en la síntesis de polímeros acrílicos. Su estructura molecular se presenta en la

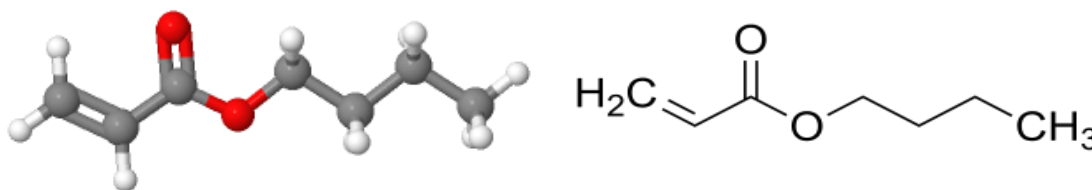


Figura IV.17 – Estructura molecular del butil acrilato

A continuación, se presentan algunas de las propiedades clave del butil acrilato:

1. **Estado físico:** El butil acrilato es un líquido claro e incoloro a temperatura ambiente.
2. **Peso molecular:** El peso molecular del butil acrilato es de aproximadamente 128.17 g/mol.
3. **Punto de ebullición:** El butil acrilato tiene un punto de ebullición de alrededor de 145-146°C.
4. **Solubilidad:** Es soluble en disolventes orgánicos comunes, pero es inmisible en agua.
5. **Polimerización:** El butil acrilato puede polimerizar en presencia de iniciadores, lo que lo hace útil en la producción de polímeros acrílicos. Esta capacidad de polimerización es una propiedad clave para su uso en la fabricación de adhesivos y recubrimientos.
6. **Uso industrial:** El butil acrilato se utiliza en la fabricación de una variedad de productos químicos, incluyendo polímeros acrílicos que se emplean en pinturas y recubrimientos, adhesivos, selladores, productos de cuidado personal y textiles.
7. **Estabilidad:** Debe evitarse la exposición a temperaturas elevadas y condiciones adversas para mantener su estabilidad y evitar la degradación.

- Ácido acrílico (AA)

El ácido acrílico es un compuesto químico orgánico con la fórmula $\text{CH}_2=\text{CHCOOH}$, cuya estructura se presenta en la. Tiene varias propiedades físicas y químicas que son importantes en diversas aplicaciones industriales.

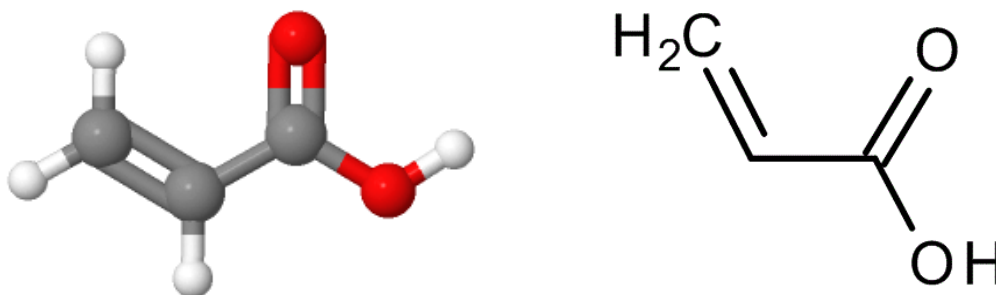


Figura IV.18 – Estructura molecular del ácido acrílico

A continuación, se presentan algunas de las propiedades clave del ácido acrílico:

1. **Estado físico:** El ácido acrílico es un líquido incoloro o ligeramente amarillo a temperatura ambiente.
2. **Peso molecular:** El peso molecular del ácido acrílico es 72.06 g/mol.
3. **Solubilidad:** El ácido acrílico es soluble en agua y en muchos disolventes orgánicos comunes. Esta solubilidad en agua es útil en la fabricación de polímeros acrílicos y otros productos químicos.
4. **Reactividad química:** El ácido acrílico es altamente reactivo debido a la presencia del grupo funcional ácido (COOH) y del enlace doble (C=C). Puede reaccionar con diversas sustancias químicas, lo que lo hace útil en síntesis orgánica.
5. **Punto de ebullición:** El ácido acrílico tiene un punto de ebullición de alrededor de 141°C.
6. **Polimerización:** El ácido acrílico puede polimerizar en presencia de iniciadores, lo que da lugar a polímeros acrílicos, como el polímero superabsorbente utilizado en pañales y productos absorbentes.
7. **Usos industriales:** El ácido acrílico y sus ésteres se utilizan en la fabricación de productos químicos, plásticos, adhesivos, recubrimientos, resinas y textiles. También se emplea en la producción de polímeros acrílicos que se utilizan en pinturas y recubrimientos, así como en productos de cuidado personal y en la industria de la construcción.
8. **Tendencia a la polimerización:** Debido a ello, el ácido acrílico a menudo se almacena con inhibidores para prevenir la formación de polímeros no deseados durante el almacenamiento.
 - Acrilato de estearilo

Como co-estabilizador de la emulsión se utiliza el acrilato de estearilo (SA) es un éster metacrílico que se deriva del ácido esteárico

El acrilato de estearilo actúa como un agente estabilizador de emulsiones al reducir la tensión interfacial entre las fases acuosa y oleosa, lo que evita que las gotas de una fase se fusionen o se separen de la otra. Esto contribuye a mantener la estabilidad y la apariencia deseada de las emulsiones a lo largo del tiempo.

En la industria cosmética y los productos de cuidado personal, el acrilato de estearilo se utiliza como un estabilizador en productos como cremas, lociones, protectores solares y maquillaje. Ayuda a mantener los ingredientes aceitosos y acuosos de estos productos bien mezclados, evitando que se separen con el tiempo.

9.2.2. Procedimiento de síntesis

El proceso de formación de las nanopartículas de látex consta de dos etapas bien diferenciadas y se basa en el método desarrollado por Goikoetxea et al. [80]. El primer paso es la formación de una miniemulsión con los tres monómeros y el coestabilizador. Una vez formada se procede a la etapa de polimerización con el que se consiguen obtener las nanopartículas de látex utilizadas para el proceso de encapsulación. Cada una de las etapas para la formación de 200 g de disolución de látex se detalla a continuación.

9.2.2.1. *Miniemulsión*

Para la formación de la miniemulsión se tiene por un lado una fase orgánica formada por los tres monómeros MMA, BA y AA y el co-estabilizador. Por otro lado, la fase acuosa cuenta con un tensioactivo que favorece la formación de la emulsión y de NaHCO_3 . La relación de cantidad entre los diferentes compuestos se basa en la desarrollada por Yow et al. [81] cuya disolución tiene un 43.1% de contenido total de sólidos basado en la fase orgánica, es decir, la cantidad de sólidos presentes en la disolución está determinada por el contenido de su fase orgánica. Por tanto, para la preparación de 200 g de disolución, 86.2 g vienen dados por la fase orgánica de los monómeros y el resto lo forma la fase acuosa. En la

Tabla IV.1 se presentan las diferentes cantidades utilizadas para cada uno de los compuestos que intervienen en el proceso. Hay que indicar que, tanto la concentración en peso de los compuestos de la fase acuosa como la del iniciador se indican con respecto a la cantidad de monómeros. De la misma forma, la cantidad de co-estabilizador añadida de acrilato de estearilo se indica sobre la cantidad total de fase orgánica, por ello es necesario hacer una corrección en la masa de los monómeros para ajustar el contenido en sólidos total presente en la disolución.

Tabla IV.1 – Cantidades de reactivos necesarias para la formación de las nanopartículas de látex

Síntesis de Látex			
Cantidad de disolución, g	Contenido en sólidos, %	Fase orgánica, g	Fase acuosa, g
200	43.1	86.2000	113.8000
Fase orgánica			
	Concentración, % wt	Cantidad, g	Cantidad ajustada, g
SA co-estabilizador	4	3.4480	3.3154
MMA	60	51.7200	49.7308
BA	39	33.6180	32.3250
AA	1	0.8620	0.8288
	Total	89.6480	86.2000
Fase acuosa			
	Concentración, % wt	Cantidad, g	
Dowfax 2A1	3	2.4865	
NaHCO3	1	1.1380	
Iniciador			
	Concentración, % wt	Cantidad, g	
KPS	0.5	0.4144	

Así, la fase orgánica está formada por los monómeros MMA, BA y AA en la relación 60/39/1 junto al co-estabilizador al 4% sobre la cantidad total de fase orgánica. La fase acuosa consta de un 3%wt de tensioactivo Dowfax 2A1 en agua destilada para favorecer la formación de la emulsión. Además, para controlar la viscosidad de la miniemulsión mediante la reducción de las interacciones electrostáticas, se añade NaHCO₃ al 1 %wt.

El procedimiento de formación de la miniemulsión se detalla a continuación:

1. Inicialmente se mezclan entre sí los componentes de la fase orgánica y fase acuosa de forma independiente.
2. Una vez se tienen disueltos los reactivos en las correspondientes fases, ambas se mezclan entre sí mediante agitación magnética durante 10 minutos a 1000 rpm, con el objeto de formar la miniemulsión.
3. La mezcla resultante se sonica durante 15 minutos a una amplitud de trabajo del 90% sobre la potencia total. Los ciclos de trabajo del equipo se fijan en 8 segundos de funcionamiento con paradas de 2 segundos.
4. Finalmente, la miniemulsión se trata con el homogeneizador Nano deBee de alta presión realizando 6 ciclos a 41 MPa y 1 ciclo a la presión más baja.

9.2.2.2. Polimerización

Una vez formada la miniemulsión, comienza la reacción de polimerización con la que se consigue la formación de las nanopartículas de látex. El proceso de polimerización consta de los siguientes pasos:

1. La reacción de polimerización se lleva a cabo en un reactor encamisado de vidrio de 250 mL de capacidad. El equipo está equipado con un condensador de reflujo, agitación, dispositivo de muestreo y entrada de nitrógeno.
2. La temperatura de reacción se fija en 70°C controlando la temperatura del fluido en la camisa con un baño termostático.
3. Se añade la miniemulsión manteniendo la agitación (180 rpm) y una atmósfera de nitrógeno (12-15 mL/min). Cuando la miniemulsión alcanza la temperatura de reacción se añade la solución de KPS al 0.5 % peso en forma de inyección.
4. La polimerización se deja durante una noche para asegurar una buena conversión.

Una vez concluida la reacción el líquido se guarda en una botella de vidrio topacio y se conserva en frío, para evitar la desestabilización de la muestra con la luz y el calor.

Se realizan diferentes ensayos para la caracterización de las nanopartículas de látex sintetizadas:

- Se obtiene la distribución de tamaños de partícula presentes en la muestra mediante la utilización del Mastersizer.
- Con el análisis termogravimétrico se determina el porcentaje de sólidos totales en suspensión en la muestra de látex.
- Determinación del potencial zeta de las nanopartículas de látex mediante la obtención de la curva de titración respecto al pH con el Zetasizer.
- Medidas del ángulo de contacto para determinar la mojabilidad de las partículas de látex en el tensiómetro de gota KSV CAM 200.
- Medida de la tensión interfacial entre la interfase de la disolución acuosa de nanopartículas de látex y el aceite de girasol con el tensiómetro de gota KSV CAM 200.

9.3. Ensayo de biodegradabilidad

Para corroborar el uso ventajoso de este tipo de nanopartículas en formulaciones detergentes se somete a un ensayo de biodegradabilidad. Este se lleva a cabo según el método estático desarrollado en el apartado 1.3.1. Para ello, se realizan medidas de carbono total durante 28 días en una disolución de 15 mg/L de látex inoculada según indica la norma OCDE 301 E (OCDE, 1992).

9.4. Encapsulación con las nanopartículas de látex sintetizado

Para la obtención de cápsulas con las nanopartículas de látex se siguen dos métodos diferentes:

9.4.1. Método inclusión etanol en aceite de girasol

Basado en el método desarrollado por Keen et al. [82] para la formación de cápsulas de látex consiste en lo siguiente:

- Se mezclan 1.28 mL de etanol con 30.4 mL de aceite de girasol en Vortex durante 1 min y se deja reposar durante 5 min.
- Por otro lado, se mezclan 0.4 mL de una disolución acuosa al 0.1%wt de alginato sódico y también al 1% de tinte (Allura Red) para realizar ensayos de liberación con 0.6 mL de la disolución de nanopartículas de látex (40 %wt).
- Se añaden 0.5 mL de la disolución anterior a la disolución de aceite y etanol una vez transcurrido el tiempo de reposo. Se agita usando el Vortex durante 1 minuto y se deja reposar durante 1 min más. La presencia de etanol provoca que las partículas de látex se agreguen, originando la formación de las cápsulas en la emulsión.
- Para el sellado de las cápsulas, se añaden 4 mL al 8 % wt de CaCl_2 para provocar la precipitación de la sal sobre la superficie de las cápsulas.
- Tras esto, se lava la muestra para obtener las cápsulas en medio acuoso, una vez retirado todo el aceite.

Estas cantidades se han optimizado en base a varias series de experimentos eligiendo las que mejor se adecuan para el método seleccionado y el objetivo deseado. Se prueba también a un cambio en el sistema de homogeneización de la emulsión obtenida, empleando el Ultraturrax a 12000 rpm durante 2 minutos en sustitución de la agitación

mediante Vortex para observar el efecto producido. Las cápsulas obtenidas son caracterizadas en el microscopio óptico.

9.4.2. Formación de cápsulas de látex con Silverson

Este método alternativo para la formación de cápsulas de látex se basa en el desarrollado por Qian et al. [83] con alguna pequeña modificación. La principal diferencia con el método anterior es el cambio en el sistema de homogeneización, ya que ahora se emplea el agitador de alta intensidad Silverson. El procedimiento general para la síntesis de las cápsulas de látex es el siguiente:

- La fase orgánica la forman 200 mL de aceite de girasol a los que se añaden 4 mL del tensioactivo Span 80 que favorece junto con las partículas la formación de la emulsión. La mezcla es agitada durante 1 min en Silverson a 5000 rpm.
- Por otro lado, la fase acuosa está formada por las nanopartículas de látex sintetizadas. Para ello, se toman 0.3 mL de la disolución de látex producida (con aproximadamente el 40%wt de sólidos totales) y se diluye con agua Milli-Q hasta un volumen total de 2 mL de fase acuosa, por lo que la disolución de látex es de un 5.7%wt en la disolución acuosa.
- La adición de la fase acuosa sobre la orgánica se lleva a cabo durante 30 s y seguidamente se somete la mezcla a cinco ciclos de agitación con 1 minuto de funcionamiento del agitador a 5000 rpm y 30 segundos de reposo.
- Una vez concluido el proceso de agitación, se separa la muestra en diferentes tubos Falcon y se introduce en un baño de agua a una temperatura de $50 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. El propósito de este procedimiento es llevar a cabo una sinterización de las partículas de látex. Se trata de un proceso de calentamiento cercano a la temperatura de fusión de las partículas que las funde parcialmente para que queden unidas entre sí formando una estructura más sólida y cohesiva.
- Cuando se concluye el proceso de calentamiento, se toman 20 mL de emulsión y se centrifuga a 2500 rpm durante 10 minutos. Con esto se consigue eliminar el aceite presente en las cápsulas, aislándolas y permitiendo que sean dispersadas en el medio deseado.

De esta forma las cápsulas estarían preparadas y disponibles para su uso en diversas aplicaciones. La caracterización de las cápsulas formadas se lleva a cabo en SEM y mediante ensayos de liberación para la determinación de la eficacia de encapsulación.

9.5. Ensayos de liberación con enzima proteasa

En primer lugar, se detallan los métodos empleados para la determinación de la concentración y la actividad de la enzima durante el ensayo de liberación.

9.5.1. Determinación de la actividad enzimática mediante el método de la azocaseína

Para la determinación de la actividad enzimática se sigue el método de la azocaseína que se detalla a continuación.

El primer paso es la preparación de un tampón fosfato de Sorensen a pH igual a 8. Para ello, para 500 mL de tampón se añaden 4.4962 g de Na_2HPO_4 y 0.2268 g de KH_2PO_4 .

Tras esto, se prepara la disolución de azocaseína al 2%w/v en el propio tampón, que debe prepararse diariamente. Antes de usar la disolución se debe centrifugar a 9000g durante 20 minutos.

Para comenzar la medida de actividad, se toman 0.25 mL de disolución de azocaseína sobre los que se añaden 0.15 mL de disolución que contiene enzima y se incuba a la temperatura elegida, 25 o 40°C durante un tiempo comprendido entre 4 y 30 minutos.

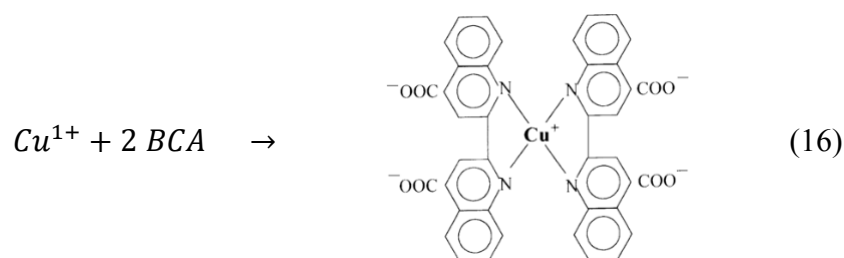
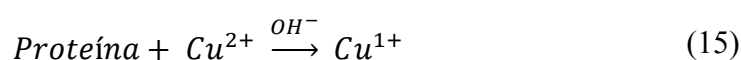
Una vez transcurrido el tiempo designado, se termina la reacción mediante la adición de 1.2 mL de disolución de ácido tricloroacético al 10%w/v. Tras 15 minutos se lleva a centrifugación durante 5 minutos y 8000g. Para la medida en espectrofotómetro, se toman 1.2 mL del sobrenadante y se añaden 1.4 mL de NaOH 1M. Las muestras son medidas a 440 nm.

Para la determinación de la concentración de enzima mediante la medida de la actividad, se preparan curvas patrón de concentraciones conocidas de enzima en el rango entre 0.05 y 0.25 g/L para la determinación de su actividad enzimática a diferentes tiempos y temperaturas. Los blancos del método para cada concentración de enzima se preparan añadiendo ácido tricloroacético sobre 1.2 mL de la disolución de enzima y posteriormente se añade el sustrato (azocaseína).

Todas las muestras se miden por triplicado.

9.5.2. Determinación de la concentración de la enzima mediante el método BCA

Con este método se permite la medida de la concentración enzimática en un rango entre 20 y 2000 µg/mL. El método se basa en la combinación de la reacción de Biuret, reducción del Cu^{2+} a Cu^{1+} en presencia de proteínas en medio alcalino, con la detección específica del catión Cu^{1+} utilizando el ácido bicinconínico (BCA). El producto resultante de esta reacción genera un complejo púrpura formado por el BCA unido al ion Cu^{1+} . Este complejo, que es hidrosoluble, muestra una absorción lineal a 562 nm en proporción al aumento de la concentración de proteína, dentro de un rango de medida del método. El proceso de reacción se presenta en las reacciones (15) y (16).



Utilizando el kit de determinación de proteína Pierce™ BCA de Thermo Scientific, se sigue el siguiente procedimiento para la determinación de la concentración de enzima:

- Se toman 25 µL de muestra que contiene a la enzima proteasa cuya concentración se pretende determinar y se depositan sobre una placa de 96 pocillos compatible con el equipo lector de placas.
- A la muestra se añaden 200 µL de la disolución de trabajo (WR) del método y se agita en Vortex durante 30 segundos. Para obtener la WR se mezclan 50 partes del reactivo A con 1 parte de reactivo B disponibles en el kit, para preparar el volumen total de disolución necesario. Se debe preparar diariamente cuando vaya a ser utilizado.
- La mezcla se incuba a 37°C durante 20 minutos en ausencia de luz.
- La placa es introducida en el lector de placas IVYMEN RT-2100C, se agita durante 15 segundos y se realiza la medida de absorbancia a 562 nm.

Para calcular la concentración de enzima de la muestra, previamente se prepara una recta patrón utilizando una disolución madre de enzima de 25 g/L disuelta en tampón fosfato de Sorensen, que mediante distintas diluciones permite encontrar una relación lineal entre la absorbancia y la concentración de enzima en el rango comprendido entre 0.25 y 5 g/L. El blanco de la recta se realiza añadiendo disolución tampón libre de enzima y realizando el mismo procedimiento. Cada concentración se mide por triplicado.

9.5.3. Ensayo de liberación de enzima proteasa por dilución

Se toma una muestra de nanopartículas de látex formadas según el procedimiento descrito en el apartado 9.4.1 pero cambiando la composición de la fase acuosa de la emulsión. En este caso estará formada por:

{	0.2 mL enzima proteasa	(se toman 0.5 mL para formar la emulsión)
	0.2 mL alginato sódico 0.01%wt	
	0.6 mL látex 40%wt	

Una vez preparadas las cápsulas con contenido enzimático, se dispersan en 20 mL de disolución tampón y se introducen en la membrana de diálisis. Se completa hasta un volumen total de 200 mL de tampón y se inicia el ensayo de liberación. Se toman muestras para la medida de actividad y concentración cada intervalo de tiempo durante todo el transcurso del experimento.

9.6. **Ensayos de recubrimiento metálico**

Para mejorar la impermeabilidad de las cápsulas de látex formadas siguiendo el procedimiento descrito usando el agitador Silverson, se plantea la formación de un recubrimiento metálico con plata y cobre siguiendo la teoría planteada para el recubrimiento de las cápsulas de sílice Ludox.

El primer paso es la medida del potencial zeta de las nanopartículas de sílice en función del pH con el Zetasizer. De esta forma, se determina el rango de pH en el que las partículas de látex y los metales tienen una mayor afinidad. Así, para cada metal se establece el pH óptimo al que llevar a cabo la reacción de reducción, eligiendo de nuevo un pH igual a 4 para la plata y un pH de 6 para el cobre.

A continuación, se describen las modificaciones necesarias para llevar a cabo la formación del recubrimiento inorgánico partiendo del procedimiento original descrito en el apartado 9.4.2.

9.6.1. Método de formación de un recubrimiento con plata

Para la creación del recubrimiento de las cápsulas de látex con plata, se parte de las cápsulas de látex ya formadas, una vez se ha retirado todo el aceite sobrante mediante centrifugación.

Las cápsulas sedimentadas en la parte inferior del tubo Falcon se dispersan en 24 mL de disolución acuosa de AgNO_3 al 0.1%wt, a los que se añaden 2 mL de disolución de SDS al 1%wt para evitar la agregación de las cápsulas presentes en la disolución. El volumen total de mezcla se agita en Vortex durante 30 segundos.

Una vez se han dispersado todas las cápsulas de látex presentes en la disolución acuosa de sal de plata y tensioactivo, se añaden 2 mL de disolución de ácido ascórbico al 15%wt y se deja reaccionar durante 30 minutos manteniendo la muestra con una agitación suave. La cantidad de ácido ascórbico añadida está en exceso con respecto a la cantidad estequiométrica necesaria para la reacción completa del nitrato de plata para asegurar la reducción completa del metal.

Cuando transcurre el tiempo de reacción indicado, se centrifuga la mezcla a 2000 rpm durante 10 minutos para separar las cápsulas con el recubrimiento metálico del resto de la disolución acuosa. Finalmente, las cápsulas son dispersadas en 10 mL de disolución al 0.1%wt de SDS mediante agitación manual.

La caracterización del tamaño y la morfología de las cápsulas obtenidas se lleva a cabo mediante SEM y el comportamiento de liberación se determina mediante un ensayo de liberación por dilución para determinar su eficacia de encapsulación y el porcentaje de tinte liberado con el transcurso del tiempo. La metodología seguida para este ensayo de liberación se describe con mayor profundidad en el apartado 9.7.

9.6.2. Método de formación de un recubrimiento con cobre

En el caso del cobre, el recubrimiento metálico se consigue cuando la sal de cobre se añade junto con la disolución de látex previamente a la formación de la emulsión para formar la fase acuosa junto con las nanopartículas de sílice.

Se describe el procedimiento cuyas condiciones permiten la formación de la capa de recubrimiento de cobre alrededor de las cápsulas de sílice. En experimentos previos, se sigue un procedimiento similar al detallado anteriormente para la plata, dispersando las cápsulas obtenidas en 24 mL de disolución acuosa de CuCl_2 al 1%wt, pero sin conseguir que se forme la capa de cobre alrededor de las cápsulas.

En este caso se recurre a añadir las partículas metálicas en la disolución acuosa antes de formar la emulsión. Para ello, se añade la misma cantidad de cloruro de cobre pesada para la preparación de la disolución anterior, 0.24 g, y se añaden a 2 mL de disolución de Ludox[®]. La mezcla se agita hasta su homogeneización en Vortex. La disolución se añade lentamente sobre la fase orgánica de la emulsión formada por 200 mL de aceite de girasol y 4 mL del tensioactivo Span 80 previamente agitados.

El procedimiento de formación de la emulsión es el mismo al descrito en el apartado 9.4.2. Una vez centrifugadas las cápsulas y separadas del resto del líquido sobrenadante, se añaden 4 mL de disolución acuosa de ácido ascórbico al 15%wt. Por cada mol de sal de cobre que reacciona se consume un mol de ácido ascórbico, ya que la reacción es 1 a 1, por lo que la cantidad de ácido se añade en exceso para que la reducción del cobre sea completa.

Para favorecer la producción del cobre metálico, la reacción se controla adicionando lentamente la base mediante el Titrino y se fija un valor de pH de 6, que una vez se alcanza provoca un cambio de color en la reacción, tomando un color muy característico de cobre metálico.

La mezcla se deja reaccionar durante 30 minutos en agitación suave. Una vez concluido el tiempo de reacción se centrifuga la disolución a 3000 rpm durante 5 minutos y se vuelve a dispersar en 10 mL de disolución acuosa de SDS al 0.1%wt para evitar la agregación de las cápsulas formadas.

Del mismo modo, se realiza la caracterización del tamaño y la forma de las cápsulas obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Además, se evalúa el comportamiento de liberación empleando un ensayo de liberación por dilución para determinar la eficacia de encapsulación y el porcentaje de tinte liberado a lo largo del tiempo. La metodología detallada para este ensayo de liberación se encuentra descrita con mayor profundidad en la sección 7.7.

9.7. Ensayos de liberación por dilución de las cápsulas con tinte y recubrimiento metálico

Para determinar el comportamiento de liberación de las cápsulas de látex que han sido recubiertas mediante una capa metálica de cobre o plata, se lleva a cabo un ensayo de liberación por dilución de cápsulas con tinte en su interior.

Para ello, se añaden 0.1 g de tinte Allura Red junto con la disolución diluida de látex. Para la formación de las cápsulas con recubrimiento de plata y cobre, se sigue el resto de los procedimientos descritos en los apartados 9.6.1 y 9.6.2 respectivamente.

Las muestras de capsulas preparadas y separadas del resto del líquido sobrenadante se diluyen en 20 mL y se introducen en la membrana de diálisis para llevarlo a un volumen total de dilución de 200 mL. Se sigue la evolución de la concentración de tinte con respecto al tiempo mediante la medida directa de la absorbancia de la disolución acuosa de dilución en el espectrofotómetro a 500 nm.

9.8. Ruptura de las cápsulas mediante otros mecanismos de liberación

Para la ruptura de las cápsulas de látex con recubrimiento metálico para liberación del posible tinte retenido en su interior se emplean los mismos tres mecanismos descritos en el apartado 8.8. Se prepara una nueva tanda de cápsulas con y sin recubrimiento mediante los procedimientos descritos para ello y se realiza una comparación con lo obtenido en el ensayo de liberación por dilución.

De esta forma, se puede calcular la eficacia global de encapsulación del proceso de encapsulación y la capacidad de retención de tinte de las cápsulas.

10. Formación de cápsulas por coacervación compleja de quitosano y goma arábica mediante secado por atomización

10.1. Formación complejos quitosano – goma arábica. Coacervación compleja

Se preparan nanopartículas híbridas CS–GA mediante coacervación compleja. Las disoluciones de cada una de ellas se preparan a la concentración requerida, la goma arábica es diluida en agua Milli-Q y el quitosano en ácido acético 0.5 N.

La coacervación compleja es un proceso físico donde dos polímeros con cargas eléctricas opuestas se mezclan en una solución, dando lugar a la formación de una fase rica en polímeros conocida como coacervado, mientras que el resto de la solución

contiene menos polímeros. Esta separación de fases ocurre debido a la interacción entre las cargas eléctricas de los polímeros, lo que conlleva a la formación de complejos poliméricos.

Para la formación de las nanopartículas, la solución de goma arábiga se adiciona lentamente a la disolución de quitosano usando una bomba de jeringa (ASP-030, Syrris Ltd., Royston, UK) a una velocidad de adición de 1 mL/min. Se ensayaron diferentes concentraciones y relaciones de polímeros para analizar su influencia sobre las cápsulas formadas.

10.2. Encapsulación

En primer lugar, se preparan emulsiones de aceite esencial de orégano (AEO) en agua. La fase acuosa es una solución al 2% wt de nanopartículas de CS–GA, preparadas como se ha descrito en el apartado 2.2.1. Para la formación de la emulsión se utiliza un agitador de alta potencia Silverson L5M. En una primera etapa se añade tensioactivo Tween 80 (5%v) a la fase acuosa manteniendo la agitación durante 1 min a 5000 rpm. Después se añade el AEO lentamente aplicando 3 ciclos de 60 s y 5000 rpm, con 30 segundos de reposo entre cada ciclo, para conseguir una mezcla adecuada.

La encapsulación del AEO se realiza mediante secado por spray utilizando un secadero por spray a escala de laboratorio (Büchi B-190; Büchi Labortechnik, Flawill, Switzerland). Las condiciones de operación fueron 180/90°C temperaturas interior/exterior, respectivamente y un flujo de aire de 25 Nm³/h.

El sistema funciona en modo monoaxial, introduciendo la emulsión que va a ser secada y obteniendo las cápsulas que contienen el aceite en su interior en el colector del equipo, después de pasar a través del ciclón.

Las cápsulas se prepararon usando dos concentraciones de AEO: 0.5%v y 10%v.

10.3. Distribución de tamaño de las cápsulas formadas

Las distribuciones de tamaño de partícula y los diámetros promedio se determinaron midiendo más de 1000 cápsulas elegidas al azar, utilizando el software ImageJ v.1.54f (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). El área de las partículas medidas se ajustan al modelo BEST (Beerkan Estimation of Soil Transfer) [30], ecuación (17).

$$F(D) = \left[1 + \left(\frac{D_g}{D} \right)^N \right]^{-M} \quad (17)$$

Donde D es el diámetro de partículas (μm), $F(D)$ es la frecuencia acumulada asociada con el diámetro de las partículas, M y N son dos parámetros de forma adimensionales y D_g es un parámetro de escala (μm). Los últimos tres parámetros se optimizan ajustando los datos con la herramienta Solver MS Excel, minimizando los errores relativos de F .

10.4. Eficacia encapsulación AEO

Para calcular la cantidad de AEO almacenado en las cápsulas, se realizan medidas para la determinación del aceite que queda en la superficie de las cápsulas y del aceite total, empleando una misma cantidad de cápsulas preparadas. La diferencia entre esos dos valores permite determinar la cantidad de aceite presente en el interior de las cápsulas. Los procedimientos para su determinación son similares.

Para obtener las curvas de calibración se utilizó el método de etanol-ácido sulfúrico [31] preparando varias concentraciones de OEO en etanol. Se tomó la cantidad necesaria de la solución madre de aceite de orégano (0.25%v) en etanol, que, en una etapa posterior, se diluyó en etanol puro para alcanzar la concentración fijada. A esta alícuota se le añadió un volumen de 4 mL de HCl 2 M y se calentó la mezcla durante 30 min a 90 °C. Después de dejar que la mezcla se enfriara a temperatura ambiente, se agregó el resto del etanol hasta alcanzar los 2 mL. La mezcla se agitó, se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml y se centrifugó durante 5 min a 10.000 g. Se realizó un espectro de absorción utilizando el espectrofotómetro Varian Cary 100 Bio UV–vis encontrándose un máximo de absorción 279 nm.

Para determinar el aceite superficial de las cápsulas, se añadieron 2 mL de etanol puro a 10 mg de partículas cargadas con OEO agitando suavemente para disolver el aceite superficial de las cápsulas y centrifugando la mezcla a 10.000 g durante 5 min. Se tomó el sobrenadante y se le añadieron 4 mL de HCl 2 M. Se calentó durante 30 minutos a 90°C, se enfrió a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 279 nm.

Finalmente, para determinar el aceite total, se agregó ácido sulfúrico a la misma masa de cápsulas para disolver las cápsulas de CS-GA agitando y calentando al mismo tiempo. A continuación, se separan las cápsulas por centrifugación y se agregan 2 mL de etanol, se agita de nuevo y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro.

Para ambos procedimientos se prepare un blanco con 10 mg de nanopartículas de CS-GA para eliminar la influencia de las nanopartículas en los cálculos. Finalmente se calcula la eficacia de encapsulación mediante la ecuación (18).

$$\text{Efficiency, \%} = \frac{T - S}{T} \cdot 100 \quad (18)$$

Donde T es la masa total (g) de OEO extraído de las cápsulas y S es la masa (g) del aceite superficial extraído sin disolver las cápsulas. Las medidas se realizaron por triplicado.

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

1. Experimentación con partículas de sílice

Los principales experimentos han sido realizados con Aerosil® A200 y Ludox® SM (30%wt sílice). Los resultados obtenidos se detallan a continuación para cada una de las nanopartículas de sílice empleadas.

1.1. Aerosil®200

1.1.1. Caracterización

1.1.1.1. Tamaño y potencial zeta

Las partículas de Aerosil®200 tienden a aparecer en forma de agregados de gran cantidad de partículas. La ficha de datos aportada por el fabricante indica un tamaño de partícula medio del compuesto comercial de 12 nm. Para comprobar la formación de agregados y analizar la dispersión de nanopartículas, se realiza un estudio de la influencia de la concentración de nanopartículas y de la concentración salina presente en disolución en función del pH. También se estudia cómo influye la presencia de un tensioactivo.

a. Influencia de la concentración de NaCl

Se parte de una concentración de partículas del 1%wt en una disolución 0.5 M de NaCl. En la Figura V.1 se presenta la titración realizada desde el punto inicial al pH original de la disolución tanto de forma ascendente como descendente. Para verificar el resultado, se repite la medida en una zona intermedia que solape con las dos curvas.

Se puede observar que las nanopartículas presentan una carga superficial ligeramente positiva a valores de pH ácidos. A medida que aumenta el pH, esta carga se hace más negativa hasta alcanzar su máximo en torno a -20 mV a partir de un pH neutro donde se mantiene constante. El punto isoeléctrico se encuentra entorno a pH 4-4.5, que coincide con el pH inicial, de ahí a que las partículas se encuentren agregadas. En cuanto al tamaño medido, cuando la carga es neutra, se obtienen unos 200 nm, sin embargo, cuando la carga se hace negativa el tamaño aumenta hasta alcanzar casi el doble.

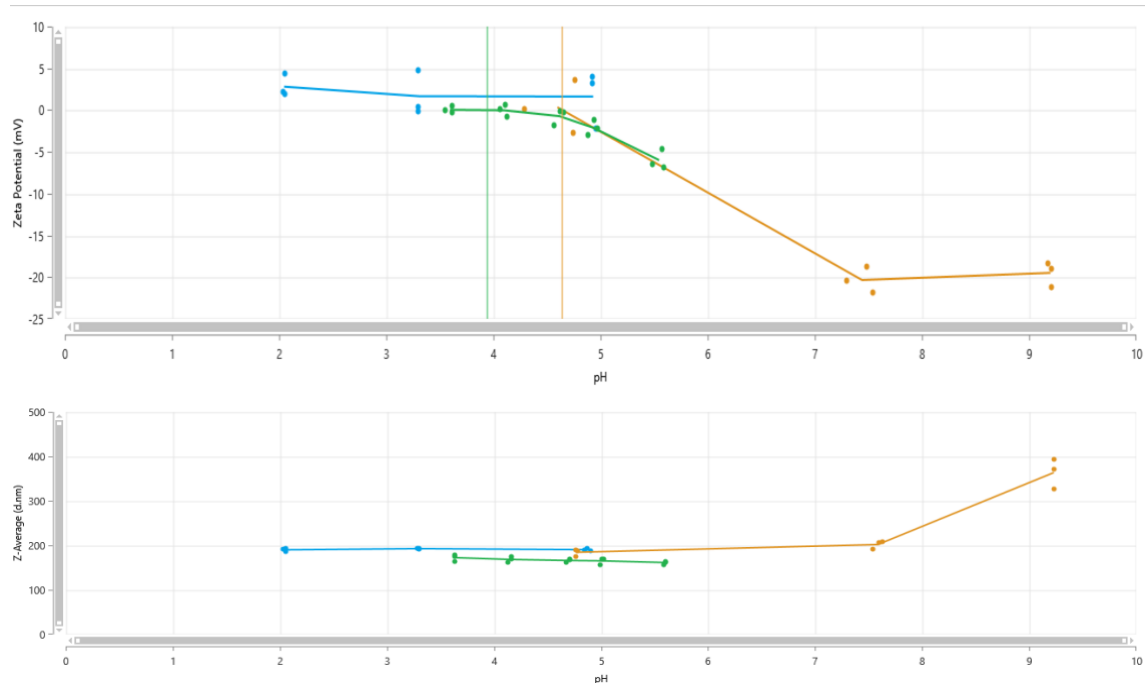


Figura V.1 – Titración de nanopartículas de sílice Aerosil® 200 al 1%wt en NaCl 0.5M

Se estudia ahora como influye la disminución de la concentración de sal hasta 0.15M. En la Figura V.2 se analiza la influencia de la concentración de NaCl, presentándose los mismos resultados que en la figura anterior y se comprueba que con respecto al potencial zeta, la disolución de partículas se comporta de una forma muy similar, salvo que el cambio de pendiente en la carga comienza a partir de un valor de pH de 5. El tamaño en este caso es algo inferior en todo el intervalo de medida, pero las nanopartículas aún se presentan agregadas y se obtiene un valor mayor al aportado por el fabricante.

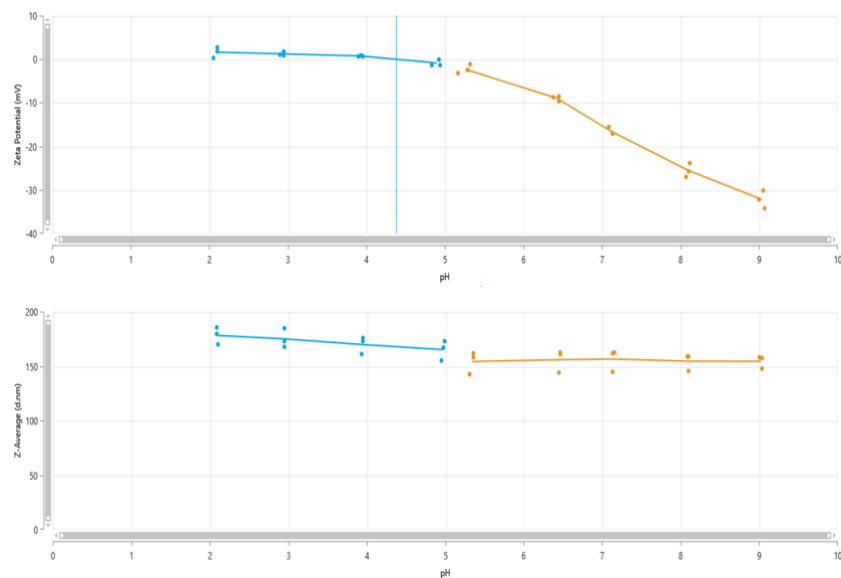


Figura V.2 – Titración de nanopartículas de sílice Aerosil® 200 al 1%wt en NaCl 0.15M

b. Influencia de la presencia de un tensioactivo

La presencia de tensioactivos en una suspensión de nanopartículas es previsible que reduzca la agregación cuando las moléculas de éstos se coloquen alrededor de las mismas en forma de micelas. Por ello, es una forma óptima para la determinación de las partículas aisladas en la suspensión.

Para la realización de medidas más exactas, se utiliza la herramienta MADLS del equipo Zetasizer, que utiliza los tres ángulos disponibles (45° , 90° , 173°) para la medida del tamaño y la interpretación que el software realiza de ésta. Se realizan medidas con agua y diferentes concentraciones de tensioactivo.

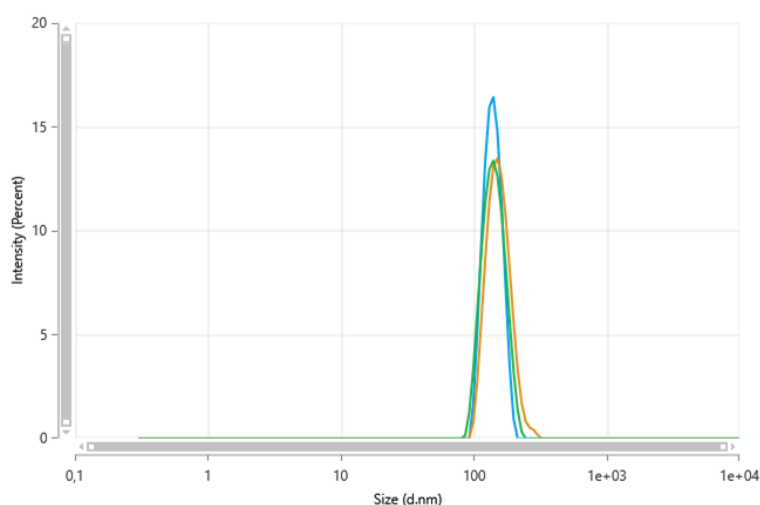


Figura V.3 – Medida de tamaño de nanopartículas de sílice en disolución acuosa con MADLS

Inicialmente se realizan medidas de distribución de tamaño a las nanopartículas suspendidas en agua tras someterlas a ultrasonidos para mejorar su dispersabilidad en el medio, obteniéndose la curva presentada en la Figura V.3. En las tres medidas realizadas se obtiene una curva estrecha lo que indica poca variación en el tamaño de partícula medido. Sin embargo, el tamaño obtenido, 250 ± 5 nm, se encuentra en concordancia con los valores obtenidos en los apartados anteriores, por lo que sigue estando lejos del tamaño de partícula indicado por el proveedor.

Por ello, se recurre a la adición de un tensioactivo en el medio acuoso para evitar la aglomeración de las partículas y obtener la medida de la nanopartícula aislada. La elección del tensioactivo es importante para evitar que la formación de micelas del propio tensioactivo afecte en la medida de las nanopartículas de sílice, en el caso que se

obtuvieran micelas mayores al tamaño de partícula, desvirtuándose la medida y obteniendo un tamaño de partícula superior al valor real.

Las micelas son agregados de moléculas de tensioactivo que se organizan en una estructura esférica o micelar en una solución acuosa. En el caso del SDS, tensioactivo elegido, en condiciones cercanas a la CMC, que es aproximadamente 8-10 mM a temperatura ambiente, las micelas suelen tener un tamaño promedio de alrededor de 1 a 4 nm de diámetro [84,85], quedando por debajo del valor teórico de diámetro de las nanopartículas Aerosil® 200 y, por tanto, evitando la interferencia por formación de micelas demasiado grandes. Este tamaño puede variar ligeramente dependiendo de las condiciones específicas en las que se realice la medida, pero este intervalo se obtiene en condiciones normales de laboratorio a temperatura ambiente.

La masa molecular del SDS, $C_{12}H_{25}SO_4Na$, es de 288.37 g/mol, para su equivalencia en %wt, la CMC equivaldría a:

$$8 \text{ mM} = \frac{0.008 \text{ moles SDS}}{1 \text{ L H}_2\text{O}} \cdot \frac{288.37 \text{ g SDS}}{1 \text{ mol SDS}} \cdot \frac{1 \text{ L H}_2\text{O}(25^\circ\text{C})}{997 \text{ g}} = 0.231 \text{ \%wt}$$

Se corrobora la medida del tamaño de micela formado por el SDS a una concentración del 0.75%wt, obteniéndose un tamaño de micela de 2.15 nm, en una distribución de tamaño estrecha con poca variabilidad que se muestra en la Figura V.4.

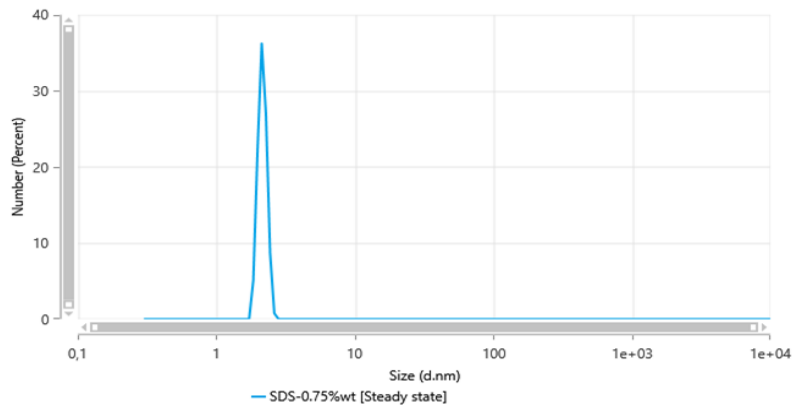


Figura V.4 – Medida del tamaño de micela del SDS al 0.75%wt en medio acuoso

Además, se ha demostrado que su presencia no afecta al tamaño de partícula obtenido[86], la repulsión entre las nanopartículas de sílice con carga superficial negativa con las micelas aniónicas de SDS previene la interacción física entre los dos componentes. Se trabaja a diferentes concentraciones de tensioactivo desde un valor ligeramente

inferior a la CMC hasta prácticamente triplicar su valor para analizar cómo afecta al tamaño de partícula obtenido. En la Tabla V.1– Tamaños (en nm) para diferentes concentraciones de partículas y tensioactivo con Zetasizer, se presentan los resultados obtenidos en Zetasizer, mediante MADLS, para las diferentes concentraciones de nanopartículas y tensioactivo utilizados.

Tabla V.1– Tamaños (en nm) para diferentes concentraciones de partículas y tensioactivo con Zetasizer

%wt SDS %wt NP	0.25 %wt	0.5 %wt	0.75 %wt
0.1 %wt	124.9	17.83	18.05
0.01 %wt	65.23	20.79	17.35
0.001 %wt	16.98	14.82	14.51

La tendencia es bastante clara, la disminución de la concentración de nanopartículas y el aumento en la de tensioactivo, como era de esperar, favorecen a la disminución del tamaño de partícula medido con el Zetasizer. Así pues, en la concentración más baja de nanopartículas, 0.001%wt y, a partir de un 0.5%wt de SDS presente en disolución, los valores obtenidos son muy cercanos a los aportados por el fabricante para las nanopartículas de sílice. También se observa que cuando se trabaja con una concentración de SDS superior a la CMC, disminuye mucho el tamaño de partícula medido incluso a la mayor concentración de nanopartículas, por lo que la formación de pequeñas micelas de tensioactivo en la disolución acuosa con nanopartículas de sílice ayuda a que éstas se encuentren dispersas y aisladas, colocándose sobre la superficie de las partículas y evitando que se agreguen.

Por último, para corroborar la medida realizada con el Zetasizer, se recurre a la medida de las nanopartículas mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM). En la Figura V.5 se pueden observar los agregados formados con las nanopartículas disueltas en etanol para facilitar su visualización en el microscopio. Realizando la medida sobre un par de partículas cuya periferia se puede diferenciar de forma más clara, se tienen dos medidas de 12.45 y 12.66 nm. Por lo que se encuentra en concordancia con los valores obtenidos en el Zetasizer y con el dato de tamaño indicado por el proveedor.

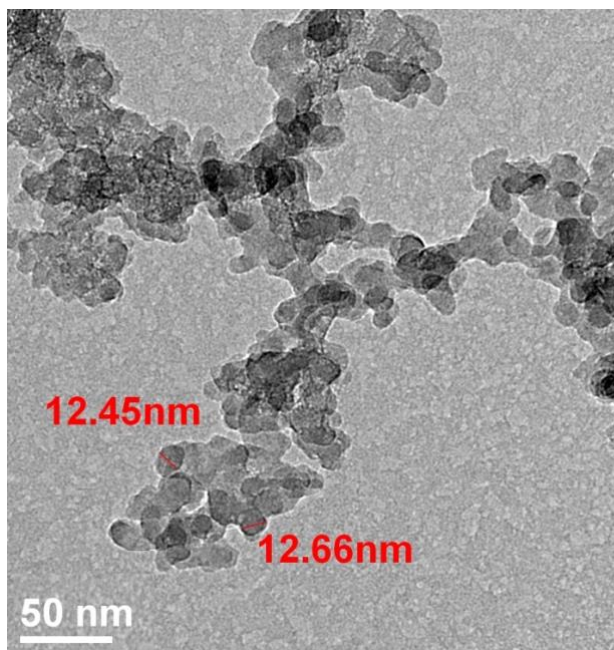


Figura V.5 – Imagen de nanopartículas de sílice Aerosil® A200 obtenida mediante TEM

1.1.1.2. Tensión interfacial y ángulo de contacto

En los experimentos realizados con el tensiómetro de gota para la determinación de la tensión interfacial y el ángulo de contacto se corrobora el alto carácter hidrofílico de las nanopartículas de sílice Aerosil®200.

En la Figura V.6 se presentan las curvas de tensión interfacial obtenidas para disoluciones acuosas de partículas al 2 y al 3%wt con una duración de 1 hora. En ambos casos, se observa que la presencia de las nanopartículas de sílice no influye prácticamente en la disminución de la tensión interfacial como podría ser esperado. Esto se explica por el alto grado de hidrofiliicidad presente en las nanopartículas de sílice que tienden a quedarse en el seno de la disolución acuosa en lugar de migrar a la interfase y provocar una mayor disminución en la curva de tensión interfacial.

Además, el aumento en la concentración de nanopartículas disminuye aún más el efecto que estas provocan en la interfase obteniéndose un valor uniforme de tensión interfacial en todo el intervalo de medida. Una mayor concentración de partículas va a provocar una mayor agregación de las mismas y, por tanto, a una disminución de las nanopartículas capaces de llegar a la interfase aceite-agua, explicando la no disminución en el valor de tensión interfacial.

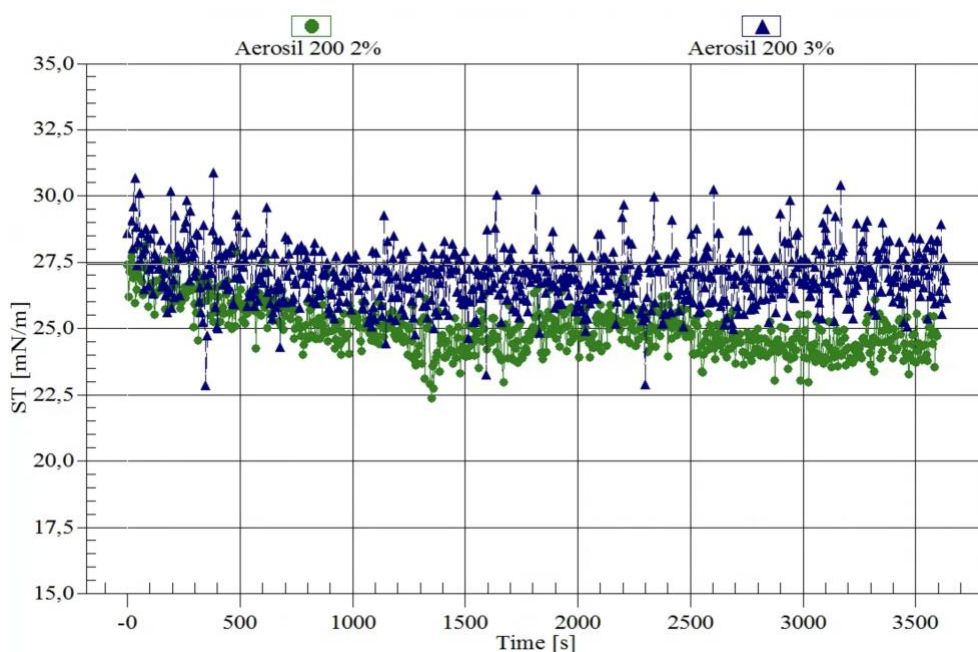


Figura V.6– Tensión interfacial para las nanopartículas de sílice A200 al 2%wt y 3%wt en agua

Por otro lado, en consonancia con los resultados de tensión interfacial, se intenta medir el ángulo de contacto, sin embargo, al poner en contacto la gota de agua formada con el equipo y la superficie preparada de nanopartículas de sílice A200, la gota de disuelve rápidamente sobre la capa de partículas, imposibilitando la medida del ángulo de contacto. Por consiguiente, se corrobora la gran hidrofiliicidad que poseen las nanopartículas, presentando un ángulo de contacto próximo a 0° y justificando la dispersión de la gota de agua al entrar en contacto con las partículas.

1.1.2. Comportamiento medioambiental

La toxicidad acuática de las nanopartículas de sílice Aerosil® A200 para bacterias bioluminiscentes *Vibrio fischeri* ha sido analizada en estudios previos [87]. A partir de los resultados obtenidos pueden considerarse como no tóxicas, ya que los porcentajes de inhibición del crecimiento no excedieron el 10% incluso para altas concentraciones, y se estimó un valor de EC20 de 1654 ± 398 mg/L, lo que corresponde con concentraciones altamente improbables en el medio acuático. Otros estudios sobre nanopartículas de sílice con peces y micro crustáceos *D. magna* concluyeron también que las nanopartículas de sílice pueden considerarse inocuas para el medio acuático [88].

1.1.3. Encapsulación

Siguiendo el método de encapsulación desarrollado en el apartado 7.1.1 de la sección de “*Metodología*” se procede a la caracterización de las cápsulas formadas en los siguientes apartados.

1.1.3.1. *Morfología y tamaño de las cápsulas formadas*

Se utiliza aceite de girasol en lugar de decano como se describía en el método de partida, tras el proceso de formación de cápsulas, separación y lavado de las mismas se dejan secar y se preparan para ver mediante SEM. Se obtuvieron imágenes, como las que se muestran en la Figura V.7. En apariencia se observa que se han formado las cápsulas con unos tamaños en torno a 1 μm . Sin embargo, se presenta una gran variabilidad de tamaños, la agregación de las cápsulas formadas es constante por el seno de toda la muestra y las imágenes tomadas representan una ínfima parte del contenido de las mismas.

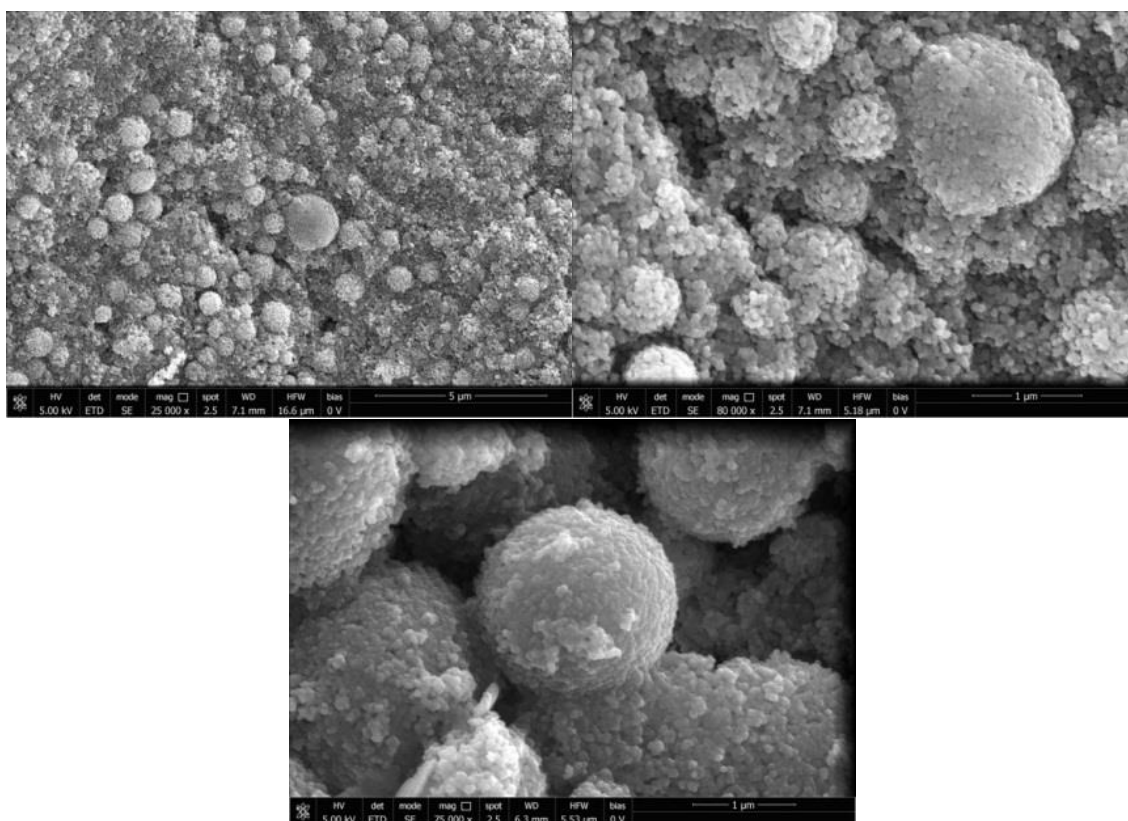


Figura V.7– Imágenes SEM de cápsulas formadas con nanopartículas de sílice (Aerosil®200). HFW: a) 16.6 μm , b) 5.18 μm , c) 5.53 μm

Por ello, se prueba a depurar el método mediante diferentes cambios en la preparación de la muestra que no son efectivos, obteniéndose una emulsión con poca

estabilidad, que incluso a veces ni siquiera llega a formarse. Además, en las diferentes imágenes tomadas de las muestras siguientes, se encontró una presencia de aceite muy elevada, que hace que las muestras no puedan verse con claridad en el microscopio. Con el objetivo de eliminar el exceso de aceite se introduce en el ciclo de lavado la adición de un disolvente orgánico capaz de arrastrarlo, como éter de petróleo o hexano. Siguiendo este protocolo las muestras observadas en el microscopio contienen menor cantidad de aceite, pero siguen presentando algunas trazas de aceite y no se consigue la formación de cápsulas.

1.1.3.2. Ensayos de liberación

Una parte fundamental en el estudio de la formación de cápsulas es su comportamiento a la hora de liberar el ingrediente que tienen en su interior ya que el objetivo para el que son formadas requiere una liberación controlada. Para ello, los primeros experimentos se realizan utilizando un colorante en la disolución acuosa para simular el comportamiento posterior de otros compuestos de interés que se puedan encapsular, teniendo, en primer lugar, dos curvas de liberación:

- Cápsulas formadas con tinte en su interior siguiendo la metodología descrita en el apartado 7.1.1 de la sección II de Metodología.
- Mezcla de las nanopartículas y el tinte en la misma proporción que se utilizan en la formación de la emulsión y, por tanto, de las cápsulas que sirve como blanco para comprobar la eficacia a la hora de transportar y liberar el tinte contenido en su interior.

En la Figura V.8 se presentan las curvas para los dos casos presentados, donde se observa una diferencia bastante clara entre ambas curvas. La curva del tinte con las nanopartículas muestra el caso claro de un perfil de liberación de primer orden, mientras que la cantidad de tinte liberado por las cápsulas es mínima, esto es, con el proceso de encapsulación mediante la utilización de las nanopartículas de sílice Aerosil®200 no se ha conseguido ni siquiera transportar el tinte, ya que la poca cantidad liberada en el ensayo de liberación se presenta en el medio acuoso desde el principio.

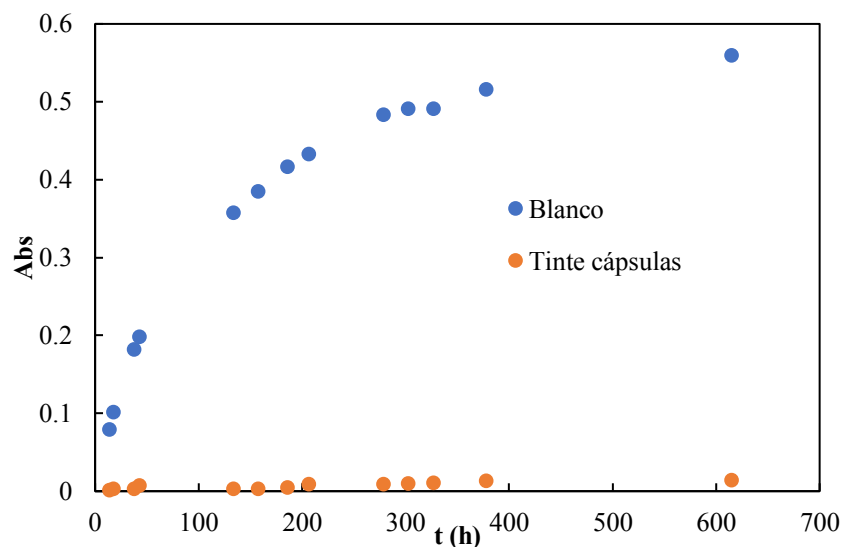


Figura V.8– Ensayo de liberación de cápsulas con Aerosil® 200 con tinte

Por tanto, se debe proceder a la formación de alguna capa extra con la que se mejore el rendimiento de encapsulación y conseguir la optimización del método.

1.1.3.3. Recubrimiento inorgánico

Como solución a la gran permeabilidad de las cápsulas y la mínima cantidad de tinte capaz de retener en el interior del núcleo de las cápsulas, se recorre al recubrimiento con carbonato cálcico, CaCO_3 .

Como se ha comentado, una de las variables que directamente influye a la hora de la liberación es el espesor del recubrimiento. Por ello, se prueban diferentes concentraciones de la disolución de carbonato sódico presente en la formación de la emulsión, que, posteriormente, reacciona con el cloruro cálcico para formar la capa de recubrimiento inorgánico. Esta concentración debería ser, a priori, inversamente proporcional a la capacidad de difusión del tinte a través de la pared de las cápsulas. Las concentraciones de sales utilizadas son:

- Na_2CO_3 : 1.5, 3, 6, 9, 12 % wt
- CaCl_2 : 8 % wt

Tras ensayar este procedimiento se observa que quedan muchas partículas en suspensión cuando se utiliza la concentración más alta de carbonato sódico, probablemente el CaCO_3 formado está en exceso, no se adhiere a las cápsulas y queda libre, por lo que se rechaza el uso de esta concentración en posteriores experimentos.

En la Figura V.9, se presentan tres experimentos variando la concentración de Na_2CO_3 y en ausencia de CaCl_2 , en este se puede destacar que la concentración más baja de carbonato es la que permite una liberación más rápida del tinte. Por otro lado, las otras dos concentraciones parecen no ser determinantes a la hora de la liberación. Sin embargo, las emulsiones formadas en estos casos no son muy estables y no se pueden extraer conclusiones claras respecto a las curvas.

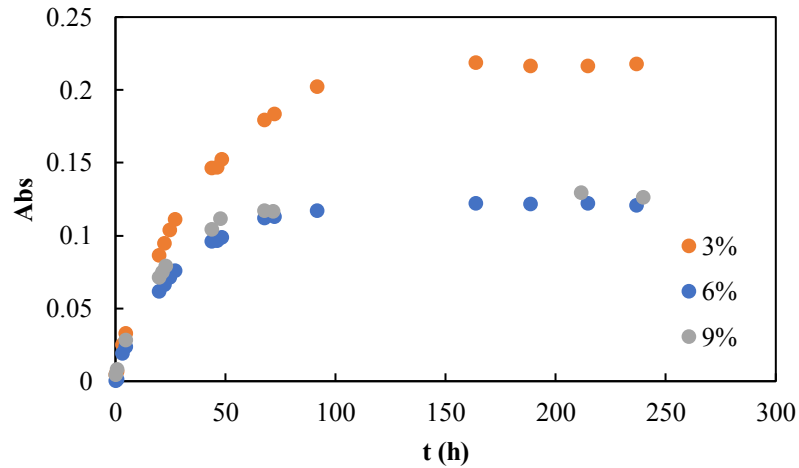


Figura V.9– Curvas de liberación para varias concentraciones de Na_2CO_3 en la fase acuosa

En una primera aproximación, si se ajustan los valores experimentales a la expresión presentada en la ecuación (1). Mediante la linealización de la ecuación se permite la obtención de un parámetro k relacionado directamente con la concentración de carbonato sódico y con la velocidad de liberación de la fase acuosa desde el interior de las cápsulas.

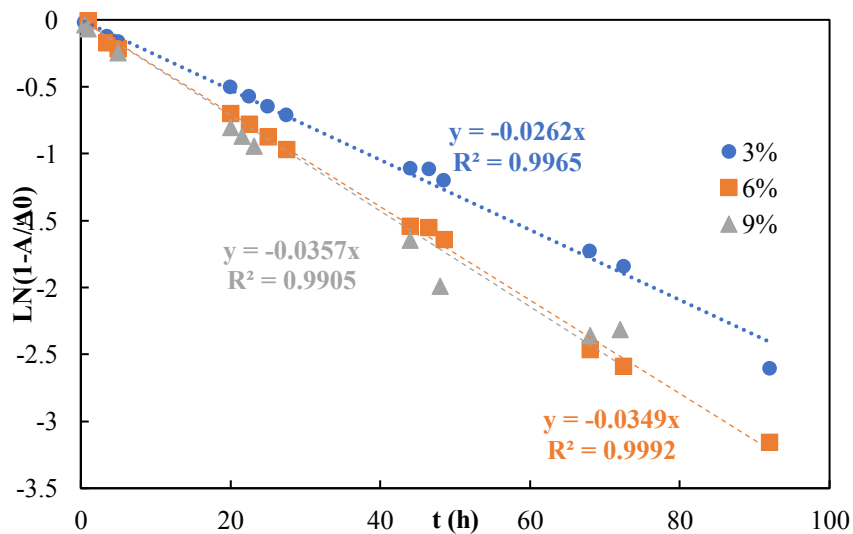


Figura V.10– Linealización de la curva para las diferentes concentraciones de carbonato sódico

En la Figura V.10, se observa que el coeficiente de correlación de las tres líneas de ajuste es mayor a 0.99, indicando que la liberación del tinte desde el interior de las cápsulas se puede explicar bastante bien con la ecuación de la curva planteada.

El parámetro k , pendiente de la curva, es similar para las concentraciones del 6 y 9%wt como era de esperar observando sus curvas de liberación que ya eran bastante parecidas. Por otro lado, en el caso del 3%wt, se obtiene un valor más bajo. esto es debido a que como se ha mencionado anteriormente el tinte se libera más rápido cuando la concentración de carbonato es más baja, la pared de sal tendrá un espesor más pequeño oponiendo menor dificultad a la liberación del tinte de su interior y la inversa de la constante k está relacionada con el tiempo de difusión del tinte hacia el exterior, por lo que valores más pequeños de k indican una liberación más rápida en las cápsulas.

Lo que está claro es que mediante la adición del carbonato sódico a la disolución acuosa de nanopartículas de sílice se mejora considerablemente la cantidad de tinte transportado, aun así, no se consigue retener el tinte en el interior y mediante la dilución de las cápsulas en agua, se lleva a cabo la liberación del tinte total presente en las cápsulas.

A partir de aquí, varias de las variables de partida se modifican para determinar su influencia en la liberación del tinte desde las cápsulas. En primer lugar, como una mínima diferencia en la adición del tinte en el ensayo de liberación provoca grandes diferencias en los valores de absorbancia medidos, en los siguientes experimentos se representa la absorbancia dividida por la masa de tinte añadido al experimento de liberación para obtener un parámetro comparable entre los distintos experimentos.

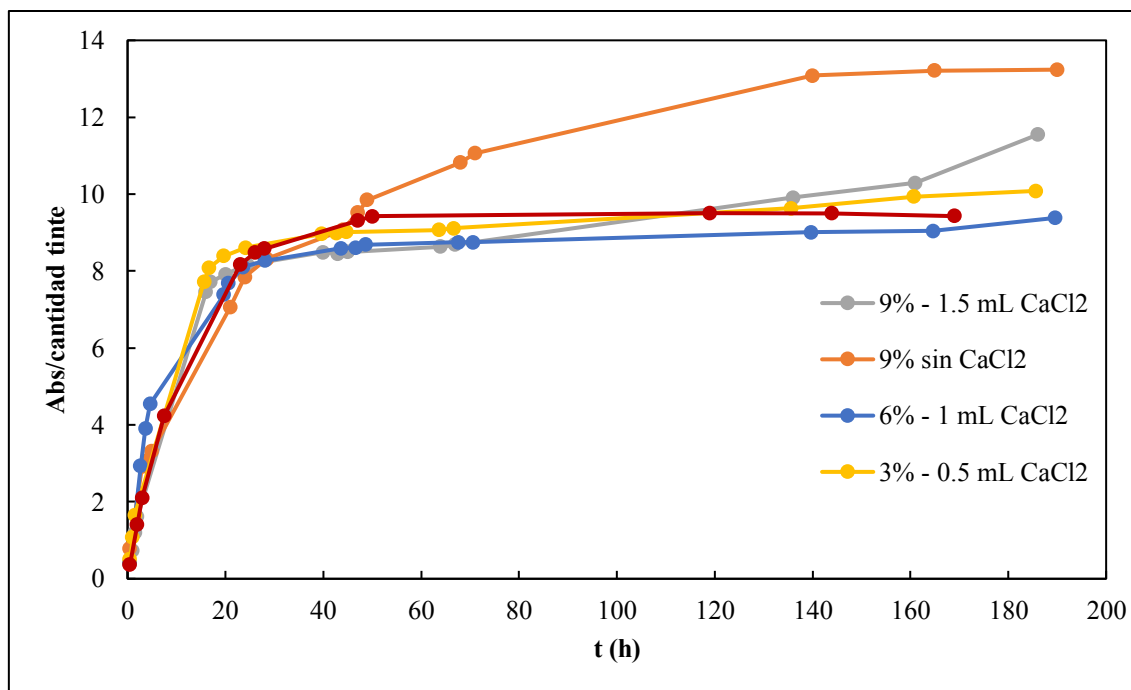


Figura V.11– Ensayos de liberación para diferentes condiciones inicial

En la Figura V.11, se presentan curvas de experimentos donde se varían la concentración de carbonato sódico y la cantidad de cloruro cálcico añadido en relación con lo anterior, para determinar su influencia. No hay diferencias claras en las curvas, exceptuando la curva del 9%wt de carbonato a la que no se añade CaCl_2 que muestra una mayor cantidad de tinte liberado con respecto al añadido en la formación de las cápsulas. En el resto, todas con cloruro de calcio, la cantidad final es similar y en todos los casos el perfil de liberación en los primeros instantes es muy pronunciado, y durante el primer día de ensayo se libera la totalidad del tinte contenido en las cápsulas.

Queda demostrado que la adición del cloruro de calcio para provocar la precipitación de las sales formando una capa de recubrimiento de carbonato cálcico no es efectivo y la permeabilidad de las cápsulas es bastante evidente

1.1.3.4. Liberación en sistema BSF

Por otro lado, para simular unas condiciones de lavado más cercanas a la realidad con el sistema BSF y variando la concentración de carbonato sódico como anteriormente, se estudia el comportamiento de las cápsulas en la liberación del tinte. En la Figura V.12, se muestran las curvas para las tres concentraciones de sal probadas para la formación de la emulsión. En este caso, se ajustan las curvas por el método de mínimos cuadrados

variando los valores de A_0 y k de la ecuación para minimizar el error absoluto entre el valor real y el calculado.

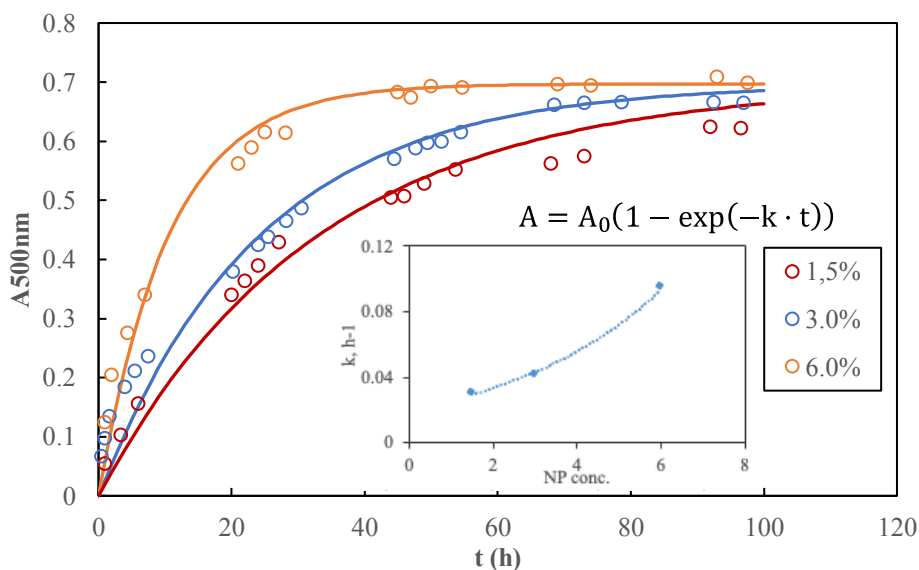


Figura V.12– Liberación en BSF con diferentes concentraciones de Na_2CO_3

A diferencia del experimento anterior, en este caso la constante k es directamente proporcional a la concentración de sal usada en los tres casos, sin embargo, la cantidad de tinte transportado aumenta de la misma forma. Por tanto, como se ha razonado anteriormente, el valor más alto de k , se traduce en una liberación más lenta en términos absolutos, el gradiente de concentración de tinte es mayor, así como la pendiente de la curva en los instantes iniciales, en la curva con mayor concentración de sal pero a la vez se consigue transportar una mayor cantidad de tinte. Probablemente debido a que parte del tinte se disuelva en la sal y se vaya liberando lentamente cuando es disuelto en agua, ya que el comportamiento de las tres curvas es muy similar.

1.1.4. Conclusión

A pesar de tener algunos indicios sobre la formación de cápsulas se descarta el uso de este tipo de nanopartículas para la formación de partículas capaces de retener algún compuesto interesante en la formulación de detergentes comerciales. Son varios los motivos que hacen que las nanopartículas de sílice no sean idóneas para el fin deseado:

- Grado de hidrofiliidad muy elevado obteniendo un valor del ángulo de contacto muy alejado de 90° .

- Alta tensión interfacial por lo que las nanopartículas no consiguen reducir la energía de la interfase y la migración de las partículas hacia la interfase para adsorberse no es efectiva para la estabilización de las emulsiones.
- El pequeño tamaño de las nanopartículas dificulta la caracterización de las propias nanopartículas y las cápsulas formadas.
- Con el método seguido, se obtiene una baja reproducibilidad ya que los resultados varían con la repetición de los experimentos en las mismas condiciones.
- La adición de cloruro de calcio no mejora la encapsulación. Por otro lado, el carbonato sódico aumenta la cantidad de tinte transportada, pero las cápsulas son muy permeables y el tinte se libera rápidamente una vez diluidas las cápsulas formadas.

Por ello se recurre a unas nanopartículas de sílice de distinta naturaleza cuyos resultados obtenidos se describen en el apartado siguiente.

1.2. Ludox® SM

Con la intención de mejorar los resultados obtenidos con las nanopartículas de sílice Aerosil®200, se plantea la utilización de nanopartículas de sílice, con nombre comercial Ludox® para realizar la suspensión coloidal. En los apartados siguientes se procede a la discusión de los resultados de los diferentes experimentos realizados utilizando estas nanopartículas.

1.2.1. Caracterización

Se procede a la caracterización de las nanopartículas de sílice Ludox® cuya viabilidad para formar cápsulas mediante la formación de emulsiones va a ser estudiada.

1.2.1.1. *Tamaño*

En primer lugar, se mide el tamaño de las partículas Ludox® para comprobar el tamaño de partícula aportado por el proveedor, que la define como una partícula amorfa de con diámetro de 7 nm. Para ello, se mide el tamaño de partícula usando Zetasizer al pH inicial de la disolución sin ningún tipo de alteración. La curva de distribución de tamaños obtenida se presenta en la Figura V.13. El tamaño medio es de 7.18 ± 0.21 nm con una anchura de curva de 1.75 nm, lo que indica una distribución estrecha y una baja

variabilidad de tamaños en la disolución. Por tanto, la medida está en concordancia con el tamaño indicado por el proveedor.

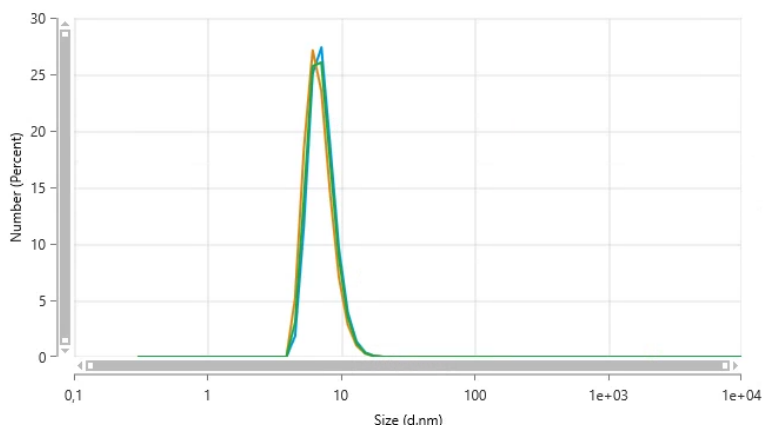


Figura V.13– Distribución de tamaño de partículas de Ludox® al pH inicial de la disolución

Además, se comprueba el comportamiento de las partículas una vez se añade la sal CaCl_2 , que provoca la desestabilización de la suspensión coloidal y la agregación de las partículas. Para ello, se toma una muestra de disolución de Ludox, se le añade la misma cantidad de cloruro cálcico que la que se utiliza en la formación de las cápsulas de sílice y se diluye en agua Milli-Q para permitir la medida en Zetasizer. La Figura V.14 muestra un aumento considerable del tamaño con respecto a la curva anterior, presentando un tamaño cercano a los 70 nm. Por tanto, se demuestra la agregación de las partículas mediante la adición de CaCl_2 .

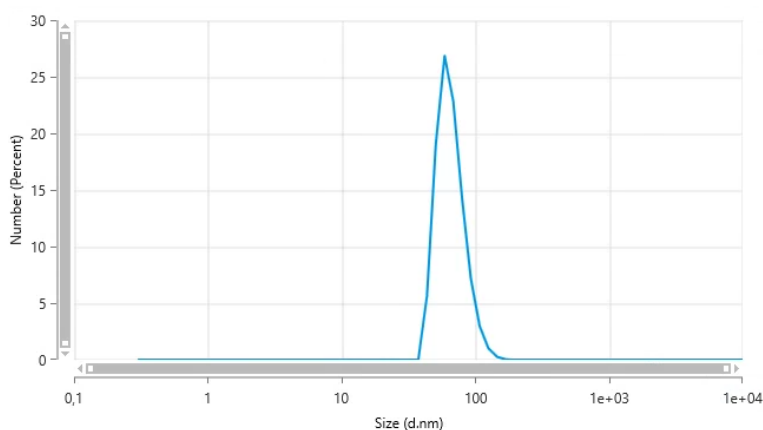


Figura V.14– Distribución de tamaño de partículas de Ludox® en presencia de CaCl_2

1.2.1.2. Potencial zeta

Utilizando el Zetasizer, se mide el potencial zeta de la muestra variando el pH en el rango 1-10 con la adición de HCl y NaOH. En la Figura V.15, se observa una clara

diferencia en el comportamiento de las partículas de sílice. En la curva de la derecha, se ve que al caer por debajo de un pH de 6.5, se produce la desestabilización de la suspensión coloidal de partículas de partida, provocándose la agregación de las partículas, creándose un gel, difícil de manejar y homogeneizar que hace que se produzca ese salto de pH grande, siendo complicado hacer variaciones más pequeñas con la adición de HCl, incluso con pequeñas inyecciones de HCl. Se hace la medida desde el pH más básico con la adición de sosa de concentraciones diferentes para permitir obtener los valores de potencial zeta y tamaño antes de formarse el gel e imposibilitar el resto de las medidas.

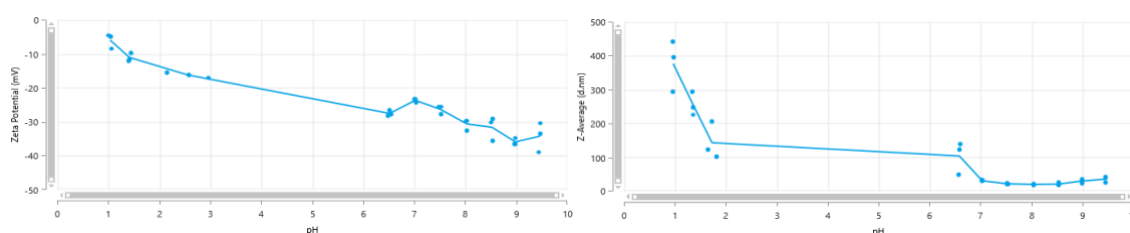


Figura V.15– Potencial zeta (izquierda) y tamaño medio (derecha) medido en Zetasizer para las partículas Ludox® en función del pH

Por otro lado, si se observa la curva de la izquierda, queda claro que las partículas poseen una carga superficial negativa en todo el rango de pH, presentando valores negativos cercanos o por debajo de -30 mV en el rango de pH básico, lo que indica una buena estabilidad de la suspensión en esas condiciones. En concordancia con la desestabilización y agregación de las partículas a pH ácidos, se observa un aumento elevado del potencial zeta al disminuir el pH, aproximándose a 0 y dejando claro que la estabilidad electrostática de la disolución se ha perdido.

De la misma forma que con la medida del tamaño, se estudia, además, el comportamiento de estas partículas en las condiciones en que se quiere producir la encapsulación con la adición de CaCl_2 . El comportamiento es similar al mostrado por la suspensión original cuando se varía el pH como se muestra en la Figura V.16.

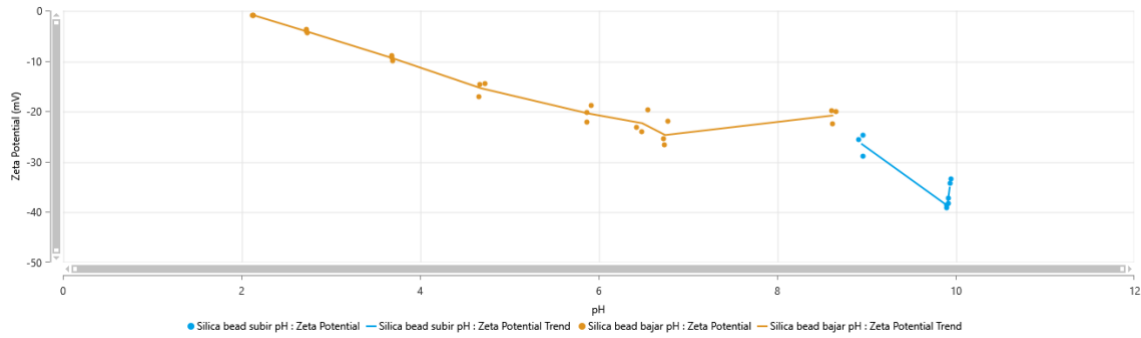


Figura V.16– Valores de potencial zeta de las cápsulas de Ludox® en función del pH

1.2.1.3. Tensión interfacial

Mediante la medida de la tensión interfacial usando el tensiómetro de gota KSV CAM200

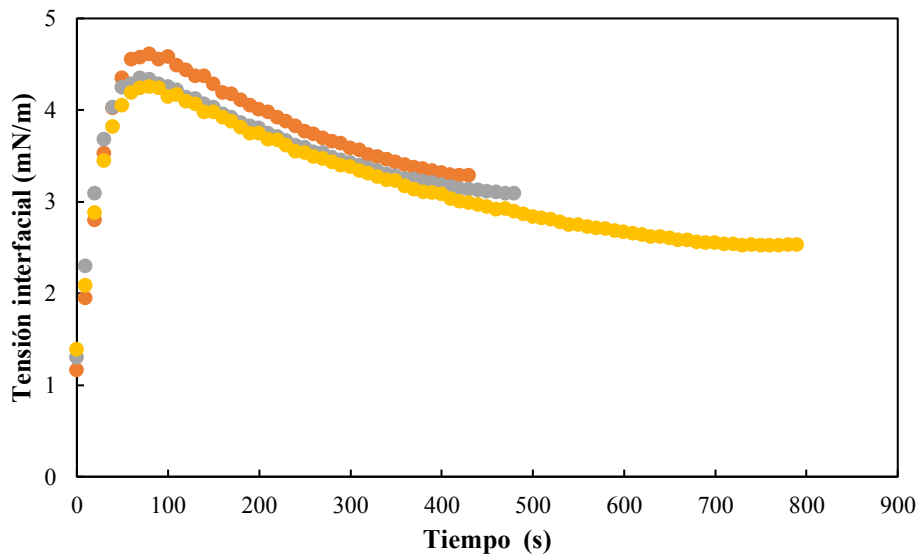


Figura V.17– Tensión interfacial nanopartículas de sílice Ludox

1.2.1.4. Biodegradabilidad y toxicidad de las partículas

Como es de esperar, al tratarse de partículas de sílice, son inertes en cuanto a su comportamiento de biodegradación. Como se observa en la Figura V.18, los resultados obtenidos con el método respirométrico para la determinación de la biodegradabilidad de las nanopartículas muestran que no se biodegradan con la presencia de microorganismos y los valores permanecen cercanos a cero durante todo el tiempo que se prologa el experimento. Se trata, pues, de una sustancia inerte de la que no se conocen productos de biodegradación [89].

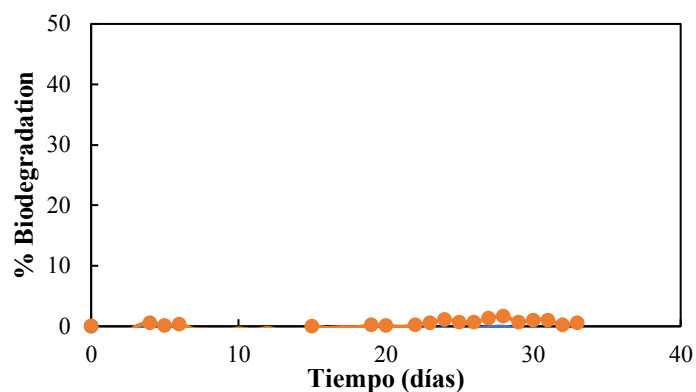


Figura V.18– Curva de biodegradación de las partículas de sílice (Ludox)

En lo que se refiere a su toxicidad, hay multitud de investigaciones sobre el comportamiento de las nanopartículas amorfas de sílice sobre varios microorganismos. Así, al igual que para otras nanopartículas de sílice, existen estudios que pueden provocar daños al ser inhaladas por el ser humano o efectos negativos sobre el medio ambiente. Sin embargo, la mayoría de estos estudios concluyen que para obtener estos efectos adversos se deben presentar en concentraciones demasiado elevadas.

1.2.2. Justificación de variables que afectan en la formación de las cápsulas

En este caso, el ángulo de contacto no es un parámetro fundamental a la hora de estudiar la formación de las cápsulas puesto que éstas se forman mediante la agregación de las partículas mediante la desestabilización de la suspensión coloidal original de partículas de sílice. Sin embargo, el resultado obtenido en la medida de la tensión interfacial, donde se observa la tendencia de las partículas de migrar hacia la interfase, para disminuir la energía presente en la parte de contacto de las fases acuosa y orgánica, va a ayudar a la formación de emulsiones más estables y posibilitar la formación de las cápsulas por la agregación final de las partículas.

1.2.3. Objetivo

Encapsulación de un agente biocida. Se hacen pruebas y se comprueba que el comportamiento del biocida (Bronopol) es similar al obtenido con el tinte. Se prueban carcacas de distinta naturaleza para mejorar el sellado de las cápsulas de sílice.

1.2.4. Caracterización de las cápsulas formadas

Se lleva a cabo la caracterización de las cápsulas formadas según el procedimiento descrito en el apartado 8.2 de la sección de Metodología tanto en microscopio óptico como en SEM de alta resolución para determinar el tamaño y morfología de estas.

1.2.4.1. *Microscopio óptico*

Para la caracterización de las cápsulas una vez formadas, se procede a su redispersión en diferentes condiciones para estudiar cómo afecta a las mismas y su visualización.

a. Agitación manual

En la Figura V.19, mediante una agitación suave tras la redispersión en agua Milli-Q, se observan las cápsulas formadas. Según se muestra, no se observa la presencia de muchas partículas, lo que significa que las partículas no se han dispersado en la fase acuosa y, por tanto, es necesaria una agitación más fuerte.

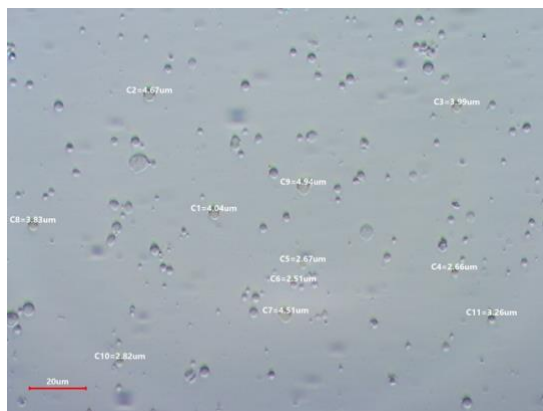


Figura V.19– Imagen de microscopio óptico de las cápsulas dispersas en agua tras agitación manual

b. Redispersión mediante Vortex

Para una redispersión más rápida y efectiva, se añade agua a la muestra centrifugada tras retirar todo el líquido sobrenadante y se agita en Vortex durante 15 s. Los resultados se muestran en las imágenes mostradas en la Figura V.20, aquí, se observa una mayor concentración de partículas que en la imagen anterior, sin embargo, parecen presentarse un poco agregadas y se procede a añadir un tensioactivo para comprobar si es efectiva para que las cápsulas se muestren de forma más aislada.

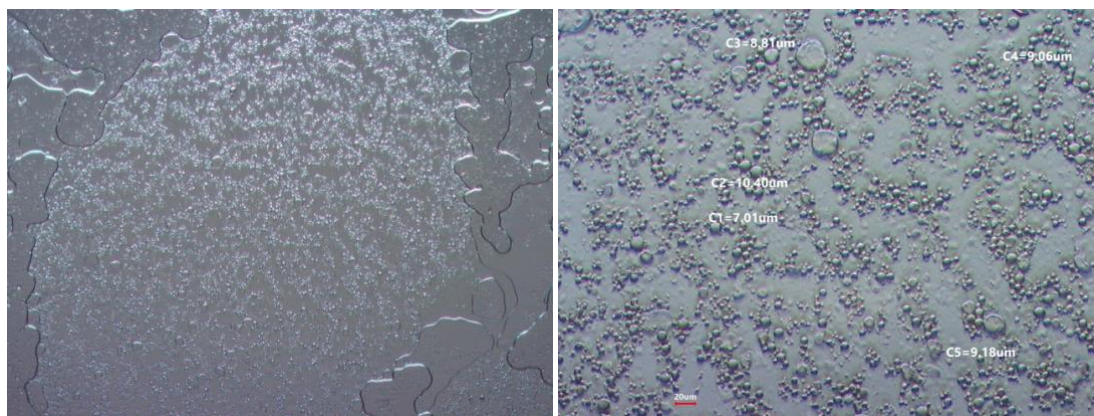


Figura V.20– Imagen de microscopio óptico de las cápsulas dispersas en agua tras agitación con Vortex

c. Redispersión en disolución al 1%wt de Tween 20

Por último, se prueba la redispersión de las cápsulas en una disolución acuosa de Tween 20. Como se observa en la imágenes de la Figura V.21, se muestran las imágenes para una agitación manual (izquierda) y agitación mediante Vortex (derecha). De nuevo, se observa una mayor concentración de partículas en las imágenes de la derecha, al igual que ocurría sin la adición del tensioactivo.

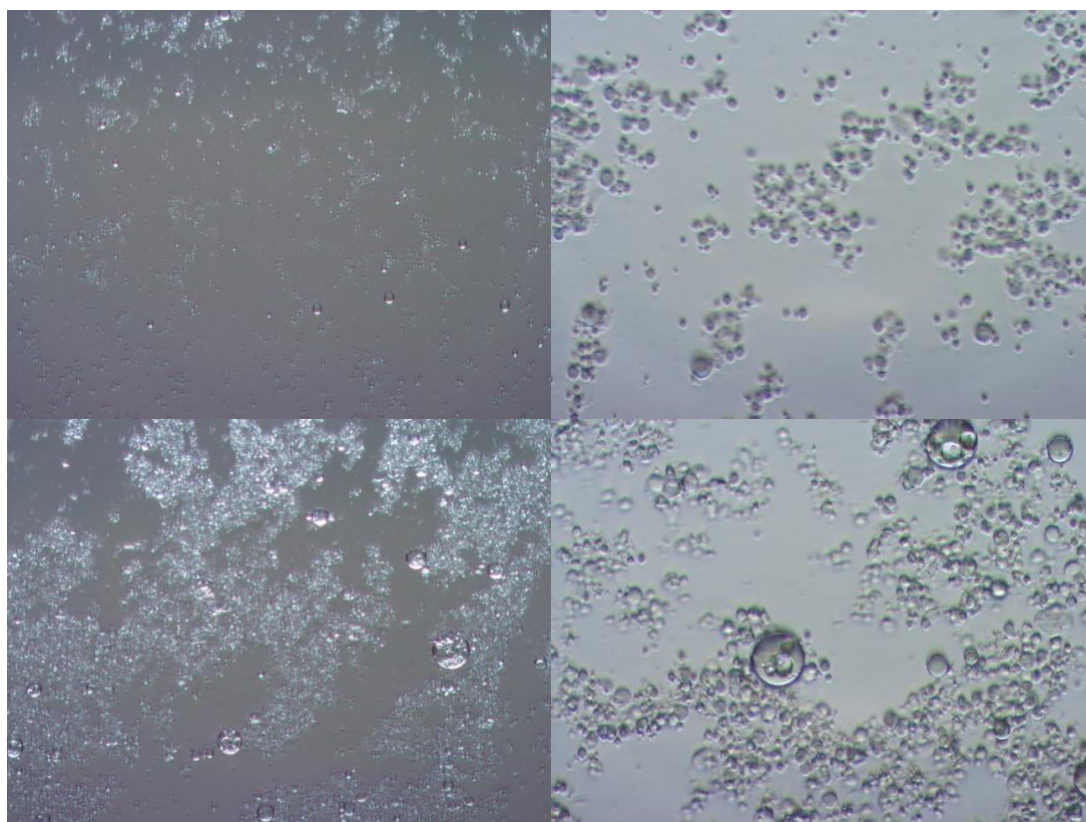


Figura V.21 – Imagen de microscopio óptico de las cápsulas dispersas en Tween 20 (1%wt) tras agitación manual (izquierda) y con Vortex (derecha)

Sin embargo, no se obtienen imágenes demasiado nítidas por la presencia de burbujas de aire, probablemente provocadas por la agitación en presencia del tensioactivo, por ello, se dejan reposar hasta el día siguiente y se vuelven a analizar en el microscopio. El resultado se presenta en la Figura V.22, las burbujas de aire ya no están presentes y la calidad de las imágenes es mucho mayor. En estas, se pueden observar partículas más pequeñas que las que se habían identificado en las muestras sin presencia de tensioactivo, en este caso, se obtienen cápsulas con un tamaño que oscila entre 4 y 7 μm .

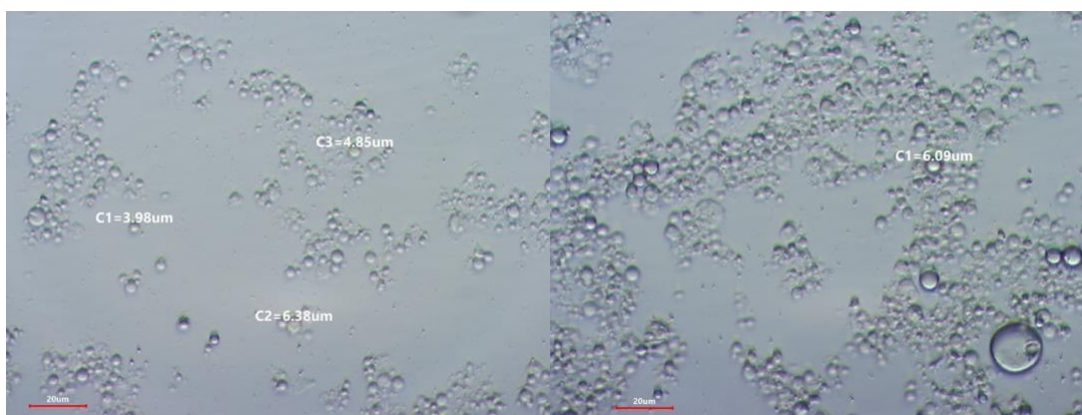


Figura V.22- Imagen de microscopio óptico de las cápsulas dispersas en Tween 20 (1%wt) tras agitación manual (izquierda) y con Vortex (derecha) a las 24 h

1.2.5. Adición de Span 80 en la fase orgánica de aceite de girasol

Alternativamente, se estudia el efecto que tiene la adición de un tensioactivo lipófilo no iónico como es el Span 80 en la formación de las cápsulas de sílice, siguiendo el procedimiento descrito con anterioridad con esta modificación. Después de seguir todos los pasos necesarios, se preparan muestras para poder analizarlas en el microscopio óptico y así determinar de forma preliminar si se favorece o no la formación de cápsulas con las partículas Ludox.

Tomando una muestra centrifugada y lavada de cápsulas, se observa que mediante una agitación manual no se consigue redispersar la muestra en agua y, por tanto, no se lleva a cabo la caracterización en microscopio óptico. Por ello, se recurre nuevamente a la agitación mediante Vortex y a la redispersión en una disolución tensioactiva.

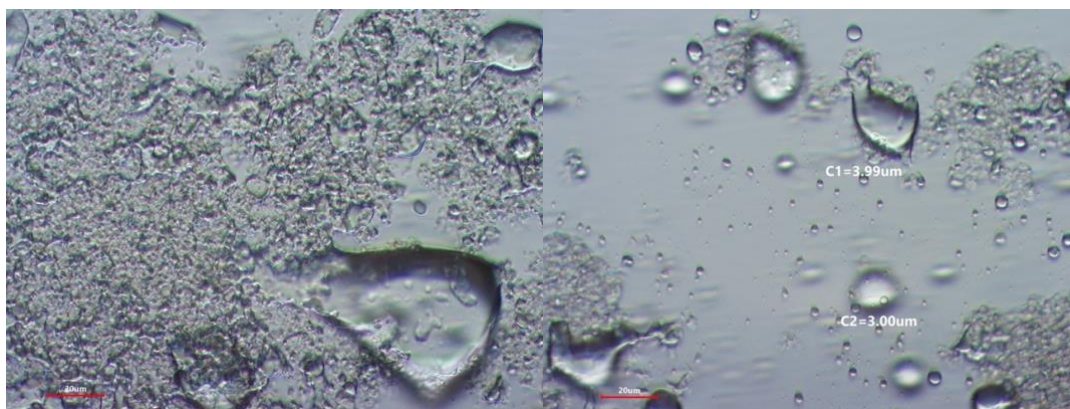


Figura V.23– Imagen de microscopio óptico de cápsulas con adición de Span 80 en la fase orgánica y redispersas en agua con agitación en Vortex

Agitando 25 segundos a 2000 rpm en Vortex tras añadir el agua Milli-Q (5 mL), se obtiene lo mostrado en la Figura V.23. En las imágenes se observa, en general, que hay una gran agregación de partículas. En la imagen de la derecha se puede ver una pequeña parte de la muestra donde se presenta un poco menos de agregación pero fue difícil encontrar dentro de la muestra. Para intentar resolver esto, se diluye la muestra a la mitad, añadiendo otros 5 mL de agua Milli-Q. Se observa una muestra con una agregación de partículas menor y donde el tamaño de partícula que se presenta es similar al obtenido anteriormente sin la presencia de Span 80 (Figura V.24). Aun así, las imágenes son menos nítidas que las obtenidas anteriormente.

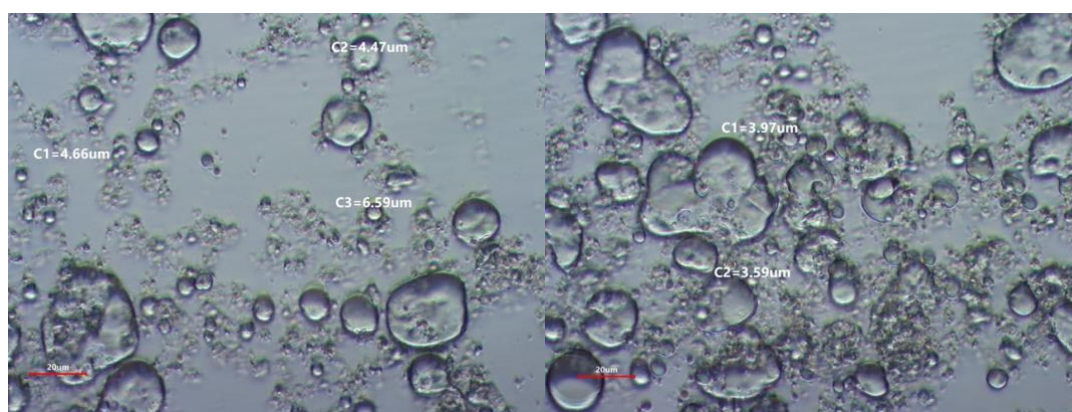


Figura V.24– Imagen de cápsulas formadas con Span 80 en la fase orgánica y redispersas en el doble de agua con agitación en Vortex

Por último, para comprobar el efecto de la adición de otro tensioactivo en la etapa de redispersión de las partículas en la fase acuosa, al igual que antes, se añade una disolución al 1%wt de Tween 20. Mediante agitación manual, se provoca la redispersión de las

partículas y se prepara una muestra para ver en el microscopio óptico. Los resultados se muestran en la Figura V.25. En este caso, se puede observar una muestra más compacta con una mayor aglomeración de partículas. Usando una magnificación mayor, es posible diferenciar algunas partículas aisladas pero el resto se sigue presentando en forma de conglomerados. El tamaño de partícula está en concordancia con los resultados anteriores.

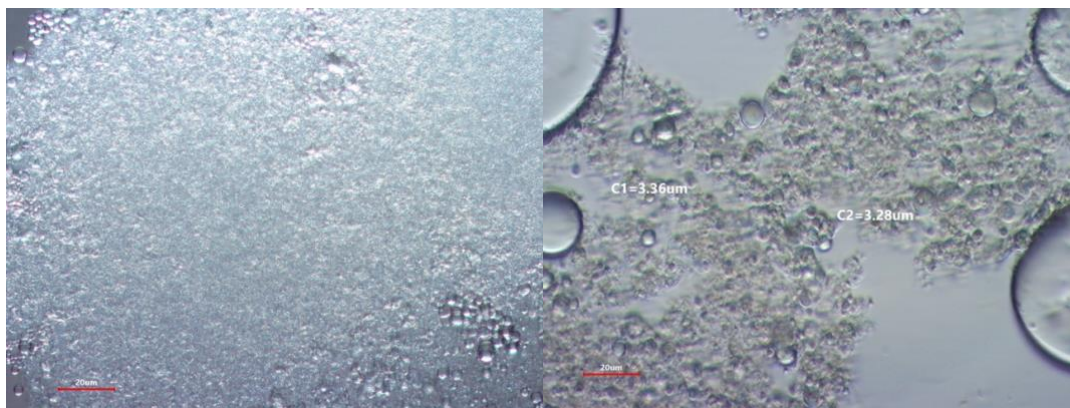


Figura V.25– Imagen de microscopio óptico decápsulas formadas con Span 80 en la fase orgánica y redispersas en disolución acuosa de Tween 20 al 1%wt

Por tanto, se puede concluir que se descarta la utilización de Span 80 como compuesto adicional en la fase orgánica a la hora de formar la emulsión puesto que dificultar la caracterización posterior de las cápsulas formadas y se ha determinado que no afecta de forma directa en el procedimiento, obteniéndose resultados prácticamente idénticos en cuanto a tamaño y morfología que los obtenidos sin la presencia de este tensioactivo disuelto en el aceite de girasol.

1.2.6. Caracterización de las cápsulas formadas mediante SEM

Al igual que se ha hecho con el microscopio óptico para la determinación de una visión preliminar sobre la formación de las cápsulas usando nanopartículas de sílice Ludox, se procede al estudio de las cápsulas a una mayor calidad de imagen con el empleo del microscopio de barrido electrónico, SEM. Se estudia la formación de las cápsulas con pequeñas modificaciones en el procedimiento para analizar su influencia.

En la Figura V.26, se puede confirmar que se consigue la formación de las cápsulas y con una densidad bastante alta, se puede observar un buen número de las cápsulas formadas, En cuanto a su morfología, se pueden considerar prácticamente esféricas y el tamaño obtenido es ligeramente inferior al que se podía extraer de las imágenes en microscopio óptico, rondando en un intervalo de entre 2 y 4 μm .

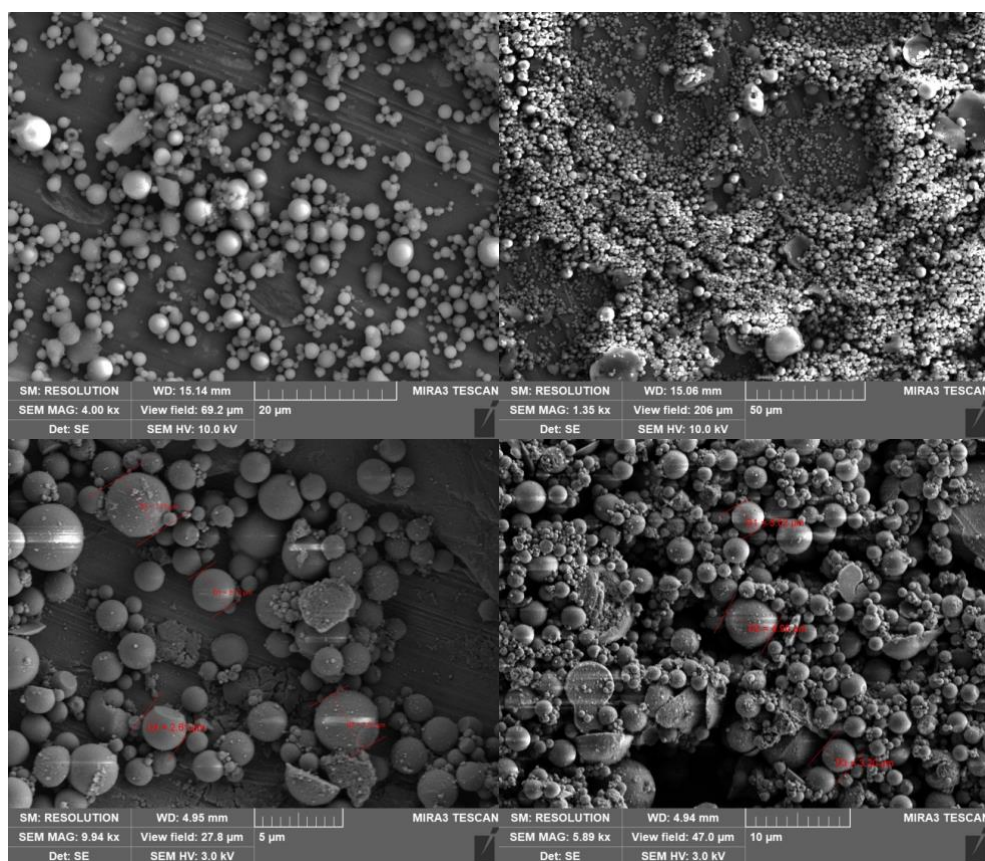


Figura V.26 – Imágenes de SEM con diferentes aumentos de las cápsulas formadas

Por otro lado, se prueba a formar las cápsulas en un medio básico que no provoque su agregación una vez formadas, puesto que en un pH por encima de 7 se ha demostrado que se favorece la repulsión entre ellas. Por ello, una vez provocada la agregación de las cápsulas con la adición de CaCl_2 , se añade 1 mL de NaOH 1M. Se centrifuga la muestra preparada y se deja secar en el portamuestras que después se introduce en el SEM. El recubrimiento se vuelve a hacer con cromo y se analiza en el microscopio. El resultado se puede observar en la Figura V.27. La morfología de las cápsulas formadas es similar a la comentada anteriormente, observándose una capa más rugosa en la superficie de las cápsulas. En cuanto al tamaño, parece ligeramente inferior, encontrándose las partículas en un intervalo de tamaños entre 1 y 3 μm . La densidad de partículas es bastante menor que en la muestra anterior, probablemente provocado por la presencia de sosa en la muestra, quedando las partículas más aisladas en disolución.

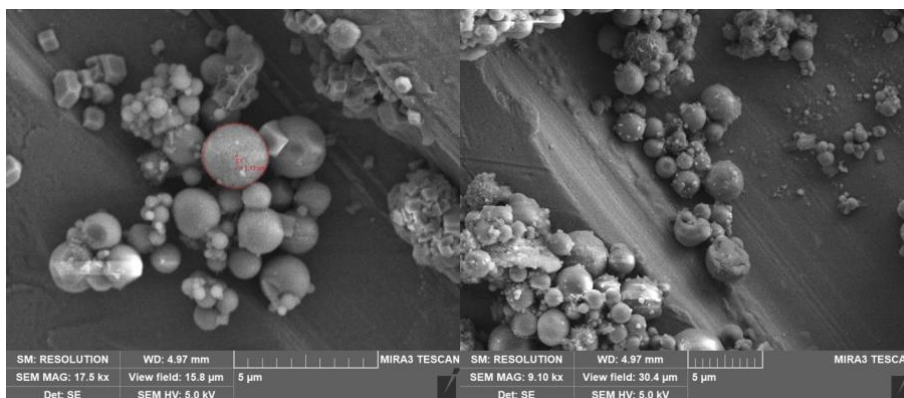


Figura V.27 – Imágenes de las cápsulas formadas con la adición de NaOH

En definitiva, se puede confirmar la viabilidad del método para la formación de cápsulas, con un diámetro de partícula medio dentro de una distribución de tamaños estrecha y con una forma esférica. La adición de NaOH no influye en la síntesis de estas y la formación se lleva a cabo de una forma similar.

1.2.7. Adición de sal para recubrimiento inorgánico

Adicionalmente, se prueba el efecto que tiene la adición de una sal insoluble en agua, como el CaCO_3 , en la formación de las cápsulas de sílice. Por ello, se sustituye el cloruro cálcico en la formación de las cápsulas y se añade carbonato cálcico tras la formación de la emulsión, siguiendo el procedimiento inicial. En la Figura V.28, se puede observar que se ha llevado a cabo la formación de las cápsulas, sin embargo, la gran densidad observada anteriormente con el CaCl_2 no se alcanza y el número formado es mucho más bajo en comparación. Lo que se puede ver también, es la deposición de pequeños trozos, previsiblemente, de sal precipitada sobre la superficie de las cápsulas de sílice. El tamaño va en concordancia con las imágenes previas, siendo de unas 4 μ m las cápsulas de mayor tamaño.

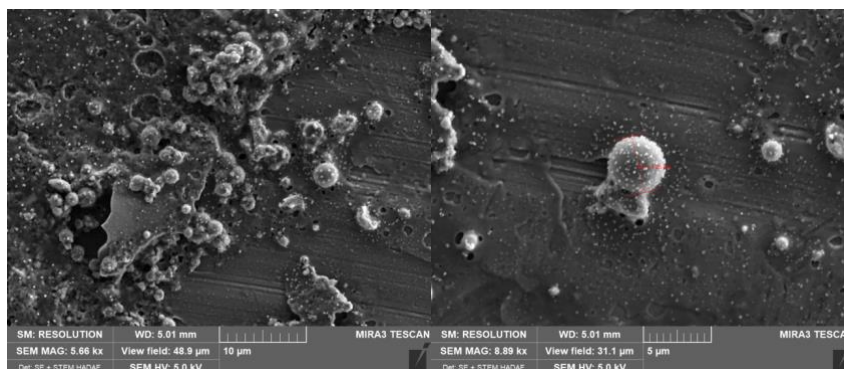


Figura V.28 – Imágenes de SEM en presencia de CaCO_3

Por tanto, el cambio de la sal empleada para provocar la desestabilización de las nanopartículas de sílice no mejora los resultados obtenidos anteriormente, por tanto, se sigue investigando en alternativas que permitan obtener mejores resultados.

Se estudia también, el efecto que tiene la adición de las dos sales conjuntamente en la preparación de las muestras, CaCl_2 y CaCO_3 . Se añade primero el CaCl_2 (1 mL) y una vez agitado se añade la misma cantidad de carbonato.

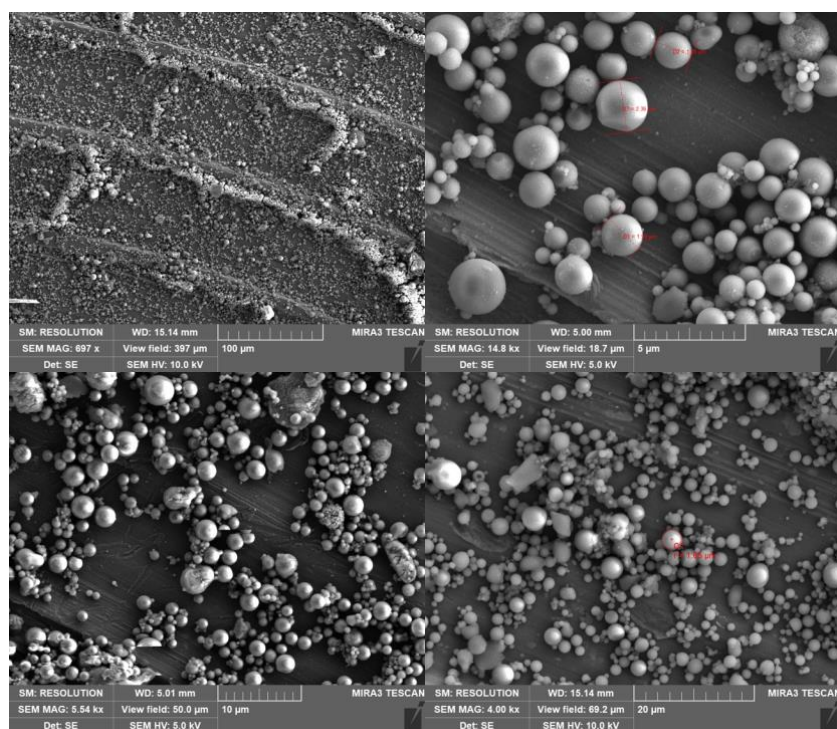


Figura V.29 – Imágenes obtenidas con SEM para la formación de cápsulas con CaCl_2 y CaCO_3

En la Figura V.29, se muestran los resultados obtenidos, imágenes muy similares a las obtenidas sin la adición de CaCO_3 . Se observa una gran densidad de partículas formadas, esféricas, de tamaño homogéneo entre 1 y 3 μm y con una superficie lisa con algunas imperfecciones, probablemente debido a fragmentos precipitados de CaCO_3 . Por tanto, se puede extraer que la adición del carbonato una vez formadas las cápsulas por la adición de cloruro cálcico no mejora en nada los resultados anteriores.

Por último, se prueba la adición de NaOH , tras la adición de las otras dos sales. Como se observa en la Figura V.30, no se obtienen buenas imágenes al analizar estas muestras, se presentan una especie de placas y la presencia de cápsulas esféricas es nula.

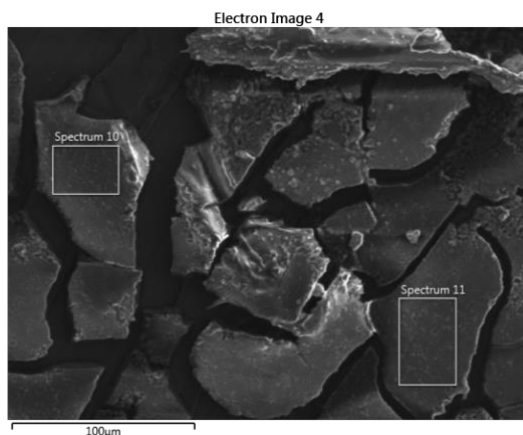


Figura V.30 – Imagen obtenida del SEM usando CaCO_3 en la formación de cápsulas

Para analizar en más profundidad lo ocurrido, se procede al análisis de la muestra mediante la herramienta EDS del SEM. El resultado se muestra en la Figura V.31. Los compuestos mayoritarios como era de esperar son el silicio y el oxígeno presentes en las partículas de sílice, SiO_2 , además del oxígeno presente en el carbonato cálcico. El resto de los picos presentes de Na, Ca y Cl son debidos a la presencia de sales en la precipitación de sólidos. Por último, el cromo es debido al recubrimiento metálico que se le ha hecho a la muestra.

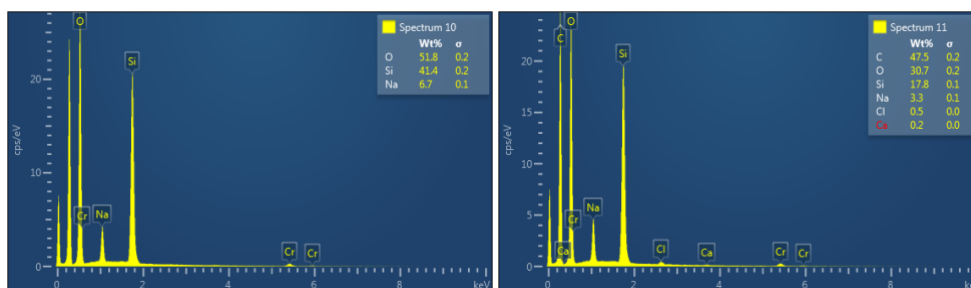


Figura V.31 – Análisis EDS de las cápsulas formadas con CaCO_3

Así pues, queda demostrado que la adición de carbonato cálcico para ayudar y mejorar el proceso de formación de las cápsulas a partir de las nanopartículas de sílice Ludox® no es efectiva y se desestima su uso.

1.2.8. Cambio sistema de homogeneización

Se pretende utilizar ahora Ultraturrax como medio de homogeneización de la emulsión para comparar con los resultados anteriores. Se comienza replicando el método y observando la formación de las cápsulas de sílice.

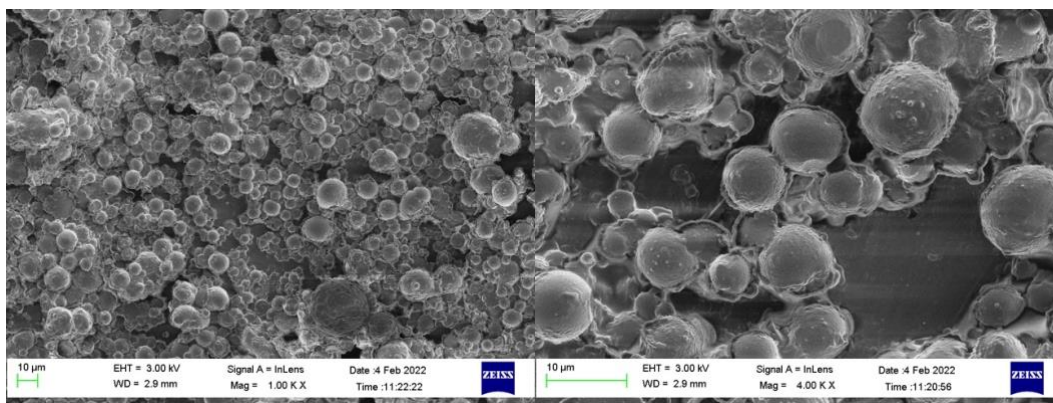


Figura V.32 – Imágenes SEM de las cápsulas formadas con Ultraturrax

La morfología de las cápsulas es similar a la obtenida usando el agitador de alta intensidad Silverson usando con anterioridad, Figura V.32. Lo que sí se puede observar es una superficie un poco más rugosa además de un tamaño de partícula ligeramente superior, cercano a las 10 µm.

Por tanto, se puede confirmar la formación de las cápsulas utilizando otro método de homogeneización, obteniéndose cápsulas de un tamaño un poco superior a las obtenidas anteriormente.

Por otro lado, se prueba también la sonda de ultrasonidos como método de homogeneización de la emulsión, pero los resultados no son buenos y no se lleva a cabo la caracterización en SEM.

1.2.9. Perfil de liberación

Como ya se ha comentado, una de las partes fundamentales de la formación de cápsulas para retener algún compuesto en su interior con una aplicación determinada es la de comprobar su comportamiento a la hora de la liberación hacia el exterior.

Como se indicó, el objetivo de la formación de las cápsulas con sílice era la de retener en su interior un compuesto biocida como el bronopol, entonces, se comprueba la curva de liberación realizando la encapsulación con este compuesto presente en la fase acuosa de la emulsión. Además, para estudiar su comportamientos se realiza la misma operación añadiendo un tinte, Allura Red, en la disolución acuosa de partículas.

El primer paso es comprobar la linealidad en la determinación de la cantidad de compuesto liberado ya sea el biocida o el tinte. Para ello, se preparan rectas de calibrado para cada uno por separado que se presentan a continuación. Previamente, se realiza un

estudio midiendo la longitud de onda en todas las longitudes del espectro para determinar la óptima a la que se realizar el resto de las medidas. De esta forma, se elige 235 nm para el bronopol y 503 nm para el Allura Red, longitudes de onda a las que se refieren todas las medidas que se indican a continuación en este trabajo.

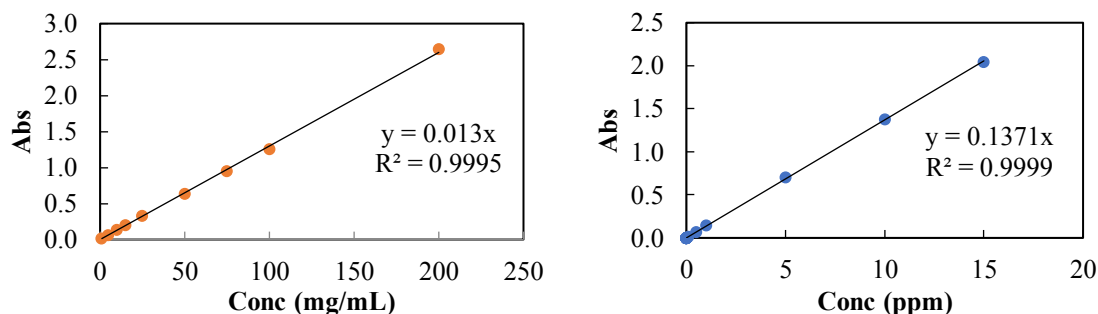


Figura V.33 – Rectas de calibrado para bronopol (izquierda) y tinte Allura Red (derecha)

La Figura V.33 demuestra la linealidad en la determinación de los dos compuestos mediante espectrofotometría, obteniendo valores proporcionales hasta valores por encima de una absorbancia de 2.

Retomando la liberación, en la Figura V.34 se puede observar que el comportamiento de los dos tintes es similar, por lo que se puede emplear Allura Red para la optimización del método y comprobar cómo sería el comportamiento en cuanto a liberación de las cápsulas de sílice formadas. La curva se representa dividiendo entre el valor máximo de absorbancia obtenido para cada una de las dos liberaciones.

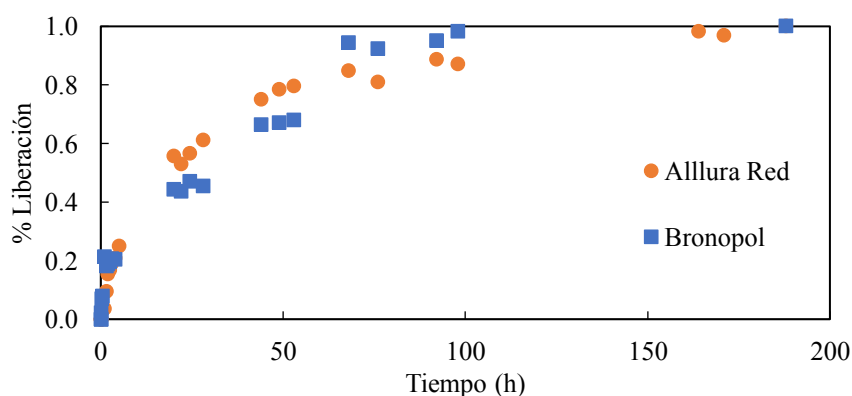


Figura V.34 – Curva de liberación para las cápsulas con Ludox

Ajustando las curvas para determinar su constante de liberación en función del valor máximo de absorbancia obtenido, mediante la linealización de la curva de liberación, se muestra en la Figura V.35.

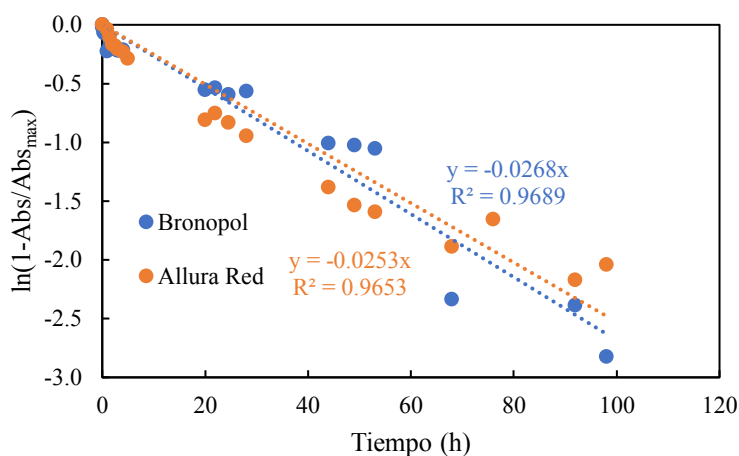


Figura V.35 – Linealización de las curvas de liberación

Aunque el valor del coeficiente de correlación es alto, el ajuste no es del todo bueno, porque hay muchos puntos que se salen de la recta tanto por encima como por debajo. Sin embargo, lo que se puede corroborar es que ambos compuestos se comportan de la misma forma como cabía esperar observando su curva de liberación. Por tanto, se puede volver a ratificar el uso de Allura Red para la optimización del método en los próximos experimentos cuyo manejo tiene más facilidad que en el caso del biocida.

1.2.10. Eficacia de encapsulación de las cápsulas formadas

Para comprobar la eficacia de encapsulación de las cápsulas formadas, se llevan a cabo diferentes ensayos de liberación con tinte. Se lleva a cabo por duplicado un experimento control añadiendo la misma cantidad de tinte y partículas que se utilizan para realizar la emulsión, pero sin llevar a cabo la homogeneización. Estas curvas sirven como comparación con el resto de las curvas obtenidas y se tomara como el tinte máximo que se podría liberar desde el interior de las cápsulas si todo el tinte presente se transportara en su interior y se liberara en el ensayo. Por otro lado, se preparan curva de liberación para cápsulas formadas empleando dos tipos de homogeneizadores, Silverson y Vortex. Todo ello se presenta de forma conjunta en la Figura V.36. Todos los experimentos se hacen disolviendo la totalidad de partículas en la misma cantidad de agua. Para el caso de las cápsulas se toma la muestra tras centrifugar la emulsión y retirar todo el líquido

sobrenadante. Las concentraciones en disolución se calculan usando la recta de calibrado calculada anteriormente en la Figura V.33.

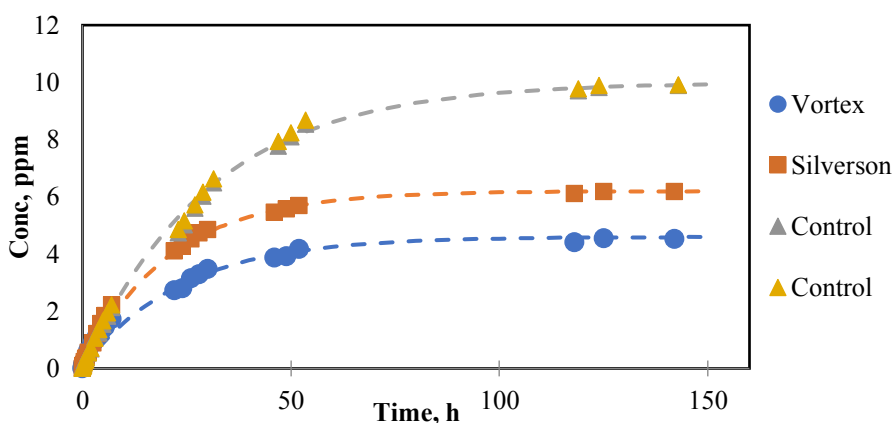


Figura V.36 – Curvas de liberación de tinte de las partículas de sílice en diferentes condiciones

Así pues, mientras el experimento control alcanza una concentración de tinte de unos 10 ppm, que coincide con los cálculos realizados previos a la liberación, y, por tanto, se puede afirmar que no se lleva a cabo ningún proceso de absorción del tinte en el seno de las nanopartículas. Por otro lado, en las muestras con cápsulas formadas con Silverson y Vortex, se alcanza un valor más alto, sobre 6 ppm, en el caso del Silverson, quedando por debajo la curva de cápsulas formadas en Vortex alcanzando una concentración final de 4.5 ppm. Si se compara con la concentración del experimento control, se calcula una eficacia de encapsulación del 60% para las cápsulas con Silverson y un 45% para las cápsulas con Vortex, valores que concuerdan con otros revisados en bibliografía para este tipo de encapsulación.

Las curvas discontinuas de ajuste a los valores experimentales se obtienen mediante la linealización de la ecuación (1):

$$A_t = A_0(1 - \exp(-k \cdot t))$$

$$\ln\left(1 - \frac{A_t}{A_0}\right) = -k \cdot t$$

Obteniendo el parámetro k con las rectas de ajuste y empleándolo para el cálculo de la absorbancia para cada tiempo. Como se puede observar en la Figura V.37, los ajustes son bastante buenos en los tres casos y, por tanto, la curva calculada coincide prácticamente con los valores experimentales. Se representa el tiempo en el eje de abscisas y el cálculo de $\ln(1-A_t/A_0)$ en el eje de ordenadas de la Figura V.37.

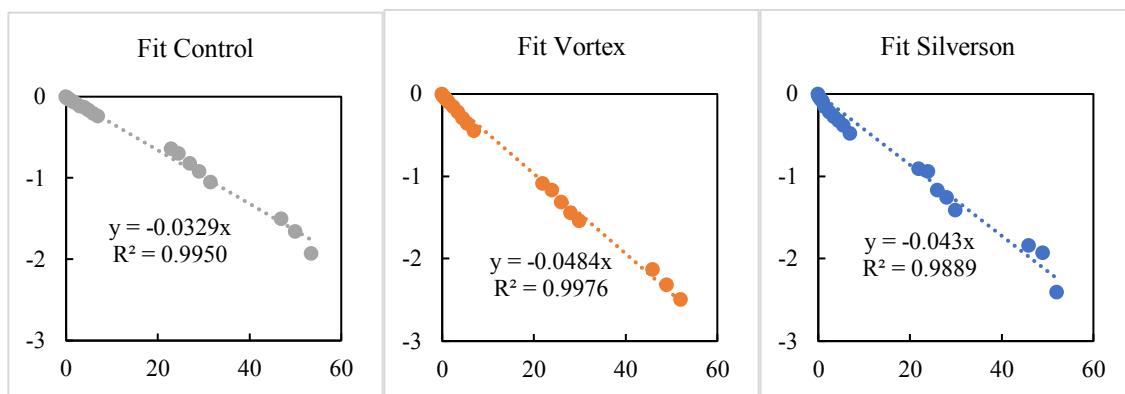


Figura V.37 – Linealización de los ensayos de liberación de tinte

Así pues, de las gráficas de liberación se puede extraer que las partículas son capaces de transportar el tinte, pero no de retenerlo, siendo capaces las cápsulas preparadas con Silverson las que consigan una mayor eficacia de encapsulación y de ahí que sea el medio usado para la preparación de las cápsulas en los experimentos venideros. Además, el proceso de liberación desde las partículas es más rápido que el de difusión a través de la membrana, quedando controlada la difusión hacia el exterior por la membrana usada. Para intentar mejorar esto, se recurre a la formación de un recubrimiento inorgánico.

1.2.11. Formación de una capa adicional de recubrimiento

Se requiere tener un recubrimiento extra que logre mantener el aditivo incluido en el núcleo de las cápsulas sin liberarlo. Por lo tanto, el objetivo es tener cápsulas que sean impermeables a la vez que seguras, sin añadir compuestos que puedan ser perjudiciales para la aplicabilidad de estas cápsulas. Para lograr esto, se utiliza la formación de una capa inorgánica.

Se probarán dos vías diferentes. En la primera, se prueba, como se hizo con las nanopartículas Aerosil®200, a la adición de sales de carbonato en diferentes proporciones y ligeras modificaciones del método. En la segunda se pretende introducir la formación in situ de la sal de un metal, ya sea en la fase acuosa antes de formar la emulsión, donde se añadirá cloruro de calcio para provocar la aglomeración de las partículas y una vez que se hayan separado las fases acuosa y orgánica, se agregará ácido ascórbico para provocar la reacción de reducción del metal y su deposición en la superficie de las perlas de sílice. Alternativamente se prueba también a añadir el metal una vez formadas las cápsulas de sílice aprovechando la diferencia de electronegatividad de las sustancias presentes.

1.2.11.1. Experimentos con Na_2CO_3

Se prueba el efecto que tiene la adición de esta sal a la emulsión y comprobar si ha sido eficaz la formación de una capa adicional que recubra las cápsulas de sílice formadas.

El primer paso es el de elegir la mejor mezcla entre la sal y las partículas de sílice, ya que una alta concentración de sal provoca la solidificación de la mezcla cuando se pone en contacto con la disolución de Ludox.

Tabla V.2 – Mezclas probadas de Na_2CO_3 y nanopartículas Ludox

Nº exp	Disolución de Na_2CO_3	Disolución de Ludox® 30%	Aspecto
1	3 ml 20%	3 ml	Sólido
2	3 ml 10%	3 ml	Sólido
3	3 ml 5%	3 ml	Sólido
4	2 ml 5%	4 ml	Inicialmente líquido, pero se vuelve sólido
5	1 ml 5%	3 ml	Sólido tras unos instantes
6	3 ml 2%	3 ml	Líquido
7	2 ml 2%	4 ml	Líquido
8	4 ml 2%	2 ml	Líquido muy denso que requiere de agitación antes de ser usado.

Como se observa en la Tabla V.2, los mejores resultados se dan para los experimentos 6 y 7 y son las disoluciones que se emplean para la preparación de la emulsión y formación de las cápsulas. Sin embargo, las emulsiones formadas no son buenas y se descarta el uso de esta sal en conjunto con las partículas para la formación de las emulsiones.

1.2.11.2. Experimentos con CaCO_3

Alternativamente, se prueba con otra sal de carbonato, en este caso la de calcio, que se trata de una sal menos soluble en agua y, por ello, se añade una vez formada la emulsión para comprobar su efecto.

La solubilidad de esta sal depende mucho de la temperatura y el pH de la disolución. En la Figura V.38 se muestra la variación de la solubilidad del carbonato cálcico en

función de estas dos variables. En estas se puede observar que una disminución en el pH, provoca el aumento de la solubilidad de la sal en disolución, mientras que un aumento en la temperatura hace que esta solubilidad disminuya. Por tanto, resumiendo, se tratará de trabajar a un pH más ácido y a más baja temperatura cuando se requiera de tener la sal en disolución.

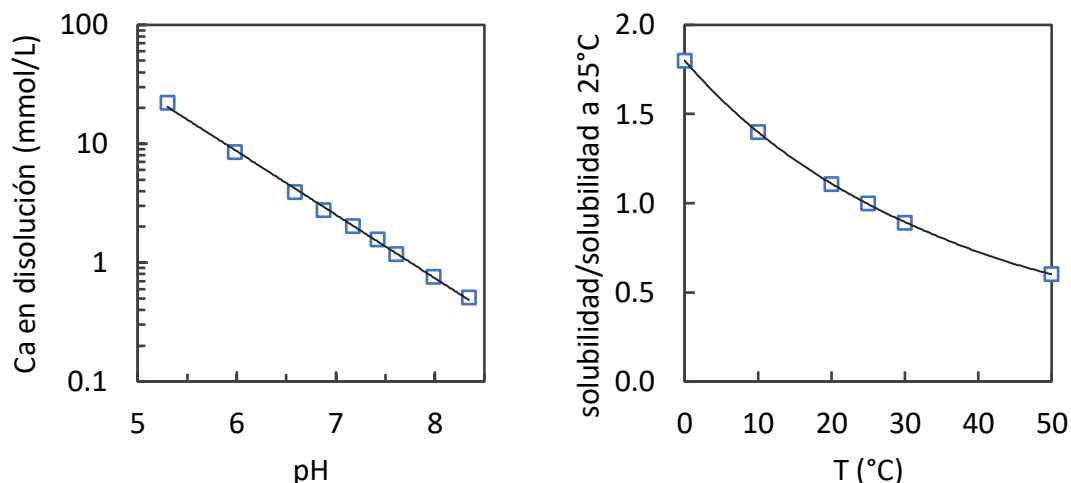


Figura V.38 – Solubilidad del CaCO_3 en función del pH y la temperatura

De esta forma, para comprobar si se consigue formar un recubrimiento inorgánico con la sal alrededor de las cápsulas de sílice, se prueba a añadir la sal una vez formada la emulsión. Para asegurar que la sal está disuelta cuando es añadida, se disuelve en una disolución acuosa cuyo pH se baja hasta un valor de 5.5 mediante la adición de unas gotas de HCl concentrado (1 M). La temperatura de trabajo es la del ambiente. La concentración de la disolución de carbonato cálcico es de 1 g/L (10 mM) que queda por debajo de la curva de saturación y, por tanto, se asegura su disolución.

Así pues, una vez preparada la emulsión con las nanopartículas de sílice se preparan diferentes experimentos que se describen en el siguiente apartado.

1.2.11.3. Ensayos de liberación con CaCO_3

Se preparan tres muestras diferentes para observar cómo es el comportamiento de la mezcla con la adición del carbonato cálcico. Previamente se han preparado 150 mL de emulsión con 1.5 mL de Ludox[®] a la que se añaden:

- C1: 1.5 mL CaCl_2 + 1 mL CaCO_3 + 1 mL NaOH 1M
- C2: 1 mL CaCO_3 + 1 mL NaOH 1M
- C3: 1.5 mL CaCl_2 + 1 mL CaCO_3

De esta forma, se prueban diferentes situaciones con el carbonato cálcico. Añadiéndolo tras el procedimiento habitual de provocar la agregación de las partículas con el cloruro cálcico y posteriormente subiendo el pH para provocar la precipitación del carbonato cálcico. También, añadirlo como medio para provocar la agregación de las partículas de sílice y después bajar su solubilidad para que precipite el carbonato y, por último, añadir las dos sales sin hacer modificaciones en el pH. En la Figura V.39, se pueden observar las curvas de liberación obtenidas para cada caso. El experimento C2 se realiza por duplicado para corroborar su resultado.

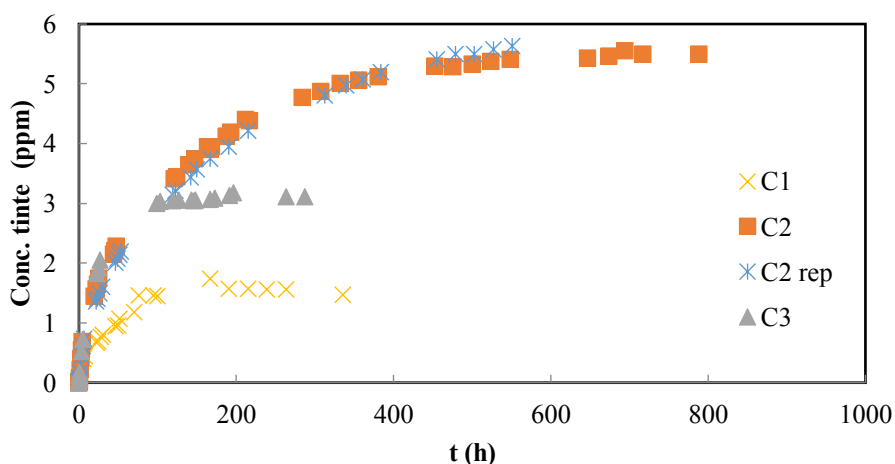


Figura V.39 – Ensayos de liberación para los experimentos con carbonato cálcico

En la gráfica se puede ver que hay diferencias significativas entre las tres curvas. Está claro que el experimento C2 es el que consigue una mayor liberación de tinte y la liberación se produce en un tiempo mucho mayor, con una dosificación de tinte por parte de las cápsulas mucho más lento que lo visto hasta ahora. Mientras que las otras dos curvas alcanzan su máximo antes de sobrepasar las 100 horas de experimento, la curva C2 alcanza su máximo de liberación pasadas las 600 horas de experimento. Además, las otras dos curvas, se quedan muy por debajo de la anterior, quedando claro que la interacción en disolución entre las dos sales, cloruro y carbonato cálcicos no favorece la retención, primero, y liberación posterior del tinte. Se prueba además con la adición de una disolución ácida un tiempo de 150 h en estos dos experimentos para romper la supuesta capa inorgánica y comprobar si se tenía tinte retenido en su interior con resultado insatisfactorio ya que no aumenta la absorbancia de la muestras posteriores. Volviendo a la curva de liberación del experimento C2, queda demostrado que consigue llevar a cabo una liberación más lenta del tinte retenido en su interior, como ya ocurriera con las

cápsulas formadas con las otras nanopartículas de sílice, Aerosil®200, el carbonato cálcico mejora el atrapamiento de las partículas de tinte en las cápsulas y su posterior liberación. Sin embargo, no mejora la eficacia de encapsulación del experimento con solo CaCl_2 , alcanzando un valor similar de concentración de tinte, 6 ppm, al final del experimento. Por lo que no se consigue el fin deseado de crear una capa extra capaz de retener el tinte en el interior de las cápsulas y provocar su liberación en el momento deseado, descartando así su uso para la formación de una capa impermeable alrededor de las cápsulas de sílice formadas. De esta forma, no se prosigue con más experimentos para una caracterización más exhaustiva de las cápsulas formadas con CaCO_3 , explorando otras alternativas.

1.2.11.4. Formación de un recubrimiento metálico

Aprovechando la diferencia de potencial zeta descrito en la sección de metodología, se pretende formar in situ una capa de naturaleza metálica alrededor de las cápsulas que consiga retener el tinte en su interior, impermeabilizándola del medio exterior en el que se encuentren dispersadas.

Para este fin se van a testear diferentes opciones, en cuanto a modificación en el orden de adición de los diferentes compuestos involucrados y concentración de estos, que se describen a continuación.

En un principio se eligen plata y cobre como potenciales metales con los que formar una capa metálica de recubrimiento, reduciéndose en disolución a partir de sus sales, AgNO_3 y CuCl_2 o CuSO_4 , respectivamente.

1.2.11.4.1. Recubrimiento con cobre

Los primeros experimentos se realizan sin control de pH, simplemente añadiendo el CuCl_2 cuando se han formados las cápsulas y, posteriormente, añadiendo el ácido ascórbico para la reducción del metal. En la Figura V.40, se puede ver que la adición de la sal de cobre no interfiere en la visualización de las cápsulas mediante SEM. Además, como es de esperar, la morfología y tamaño de las partículas es similar al que se había obtenido para las cápsulas de sílice sin ningún aditivo extra con Ultraturrax. Lo que, si se observa una peor calidad de las imágenes, probablemente debido a presencia de aceite en la muestra que hace que aparezcan esas manchas.

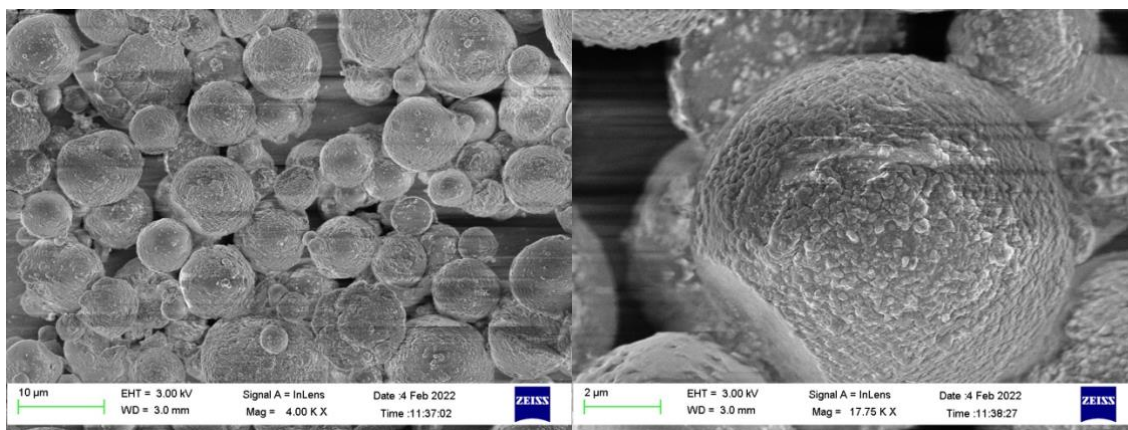


Figura V.40 – Imágenes en SEM de las cápsulas formadas añadiendo CuCl_2

Para comprobar la presencia de cobre en la muestra preparada, se hace uso de la herramienta EDS del SEM. Aunque la calidad de la imagen de la Figura V.41 no es muy buena, se pueden distinguir algunas cápsulas en ella. Se realizan dos espectros sobre la superficie de dos cápsulas, obteniendo gráficas muy similares. Se muestra el espectro 2, donde claramente sobresale el pico de silicio. El pico de cromo se debe al recubrimiento metálico de la muestra para introducirlo en el SEM. Por otro lado, analizando la masa de diferente morfología se determina claramente que se trata de cobre, pero se tiene de forma aislada y no recubriendo la superficie de las cápsulas de sílice como se pretendía.

Por ello, para maximizar la diferencia de potencial zeta se recurre a un control de pH de la disolución usando Titrino. Como ya se ha comentado, el punto isoeléctrico del cobre se encuentra sobre un valor de pH de 7. Por lo tanto, a un pH más ácido su potencial zeta es positivo. Mientras, como ya se ha demostrado, el potencial zeta de las cápsulas de sílice alcanza valores negativos a partir de un pH de 2, creciendo en negatividad conforme se aumenta el pH. Así pues, se tiene un amplio rango de pH donde el metal y las cápsulas de sílice adquieren valores de potencial zeta de diferente signo y pueden atraerse para formar el recubrimiento metálico. Para empezar, se va a probar a llevar a cabo la reacción de reducción del metal a dos valores de pH diferentes: 4 y 6. Como el metal se encuentra en medio ácido por la adición del ácido ascórbico para comenzar con la reacción de reducción del metal, es necesaria la adición de NaOH 1 M para controlar el pH final de disolución con el Titrino.

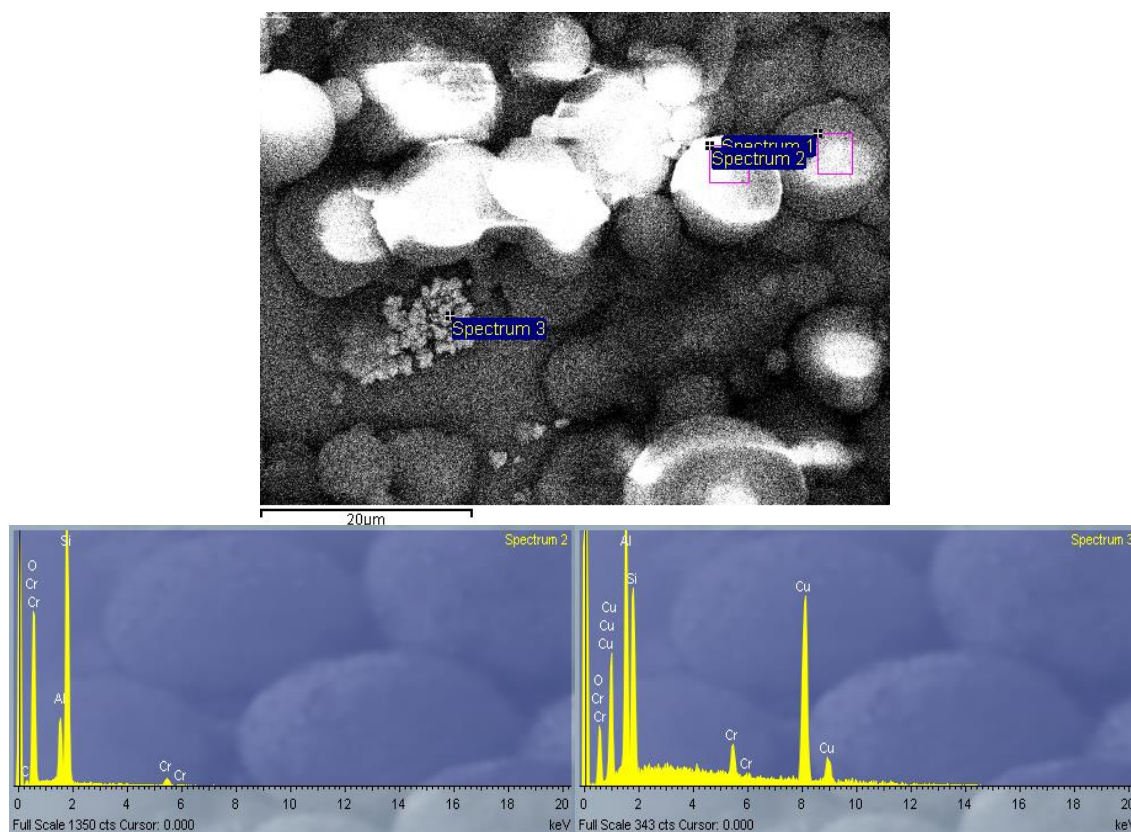


Figura V.41 – Análisis con EDS de las cápsulas formadas añadiendo CuCl_2

Antes de comenzar con la discusión de los resultados obtenidos conviene saber los diferentes colores que toma el cobre en función de su estado de oxidación. Como bien es sabido, el cobre metálico tiene un color característico, incluyendo el propio nombre del metal, un rojo anaranjado también denominado cobrizo. Por otro lado, cuando se encuentra oxidado, el color depende de si se encuentra con su estado de oxidación Cu^{+1} o Cu^{+2} , dando lugar a disoluciones incoloras o azules verdosas respectivamente.



Figura V.42 -Aspecto natural del cobre metálico

Como se ha descrito, una vez formados los agregados de sílice siguiendo el procedimiento inicial descrito usando Ultraturrax, centrifugada la emulsión y retirado todo el líquido, se añaden 10 mL CuCl_2 0.25%wt, se agita brevemente y se añaden 2 mL de ácido ascórbico 2.5%wt. El pH inicial de la disolución es de 2.5, debido al ácido ascórbico añadido. Se fija el set point del equipo en los dos puntos mencionados 4 y 6, con una lenta velocidad de adición y se preparan muestras para ver en SEM que se muestran en las imágenes mostradas a continuación.

Para el experimento a pH igual a 4, se deja reaccionar la muestra hasta el día siguiente, que es cuando se toma la muestra líquida y se prepara para SEM. El color de la disolución en este momento tenía un color azulado. Como se demuestra en la Figura V.43 las imágenes obtenidas no son buenas y, por tanto, no se lleva a cabo una caracterización más profunda.

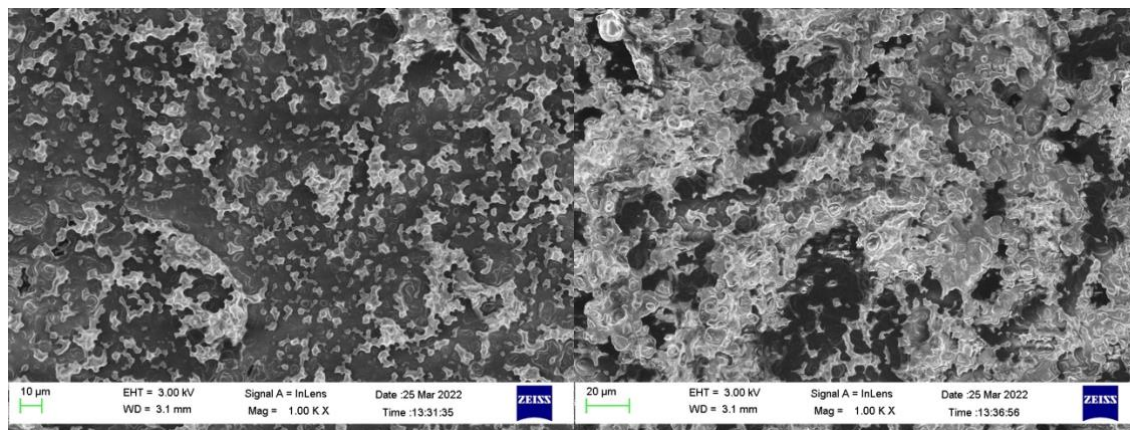


Figura V.43 Figura IV.41 – Imágenes del SEM para las cápsulas con cobre a pH 4

Cuando se fija el pH de la reacción de reducción del metal a un valor de 6, en los primeros momentos, la disolución muestra un color verde intenso, probablemente debido a una mezcla entre diferentes estados de oxidación. Se toma una muestra de la disolución para preparar para SEM y el resultado se recoge en la Figura V.44. Se observa una agregación más alta que anteriormente, pero, aun así, aumentando la magnificación del microscopio, se pueden distinguir algunas cápsulas, con morfología esférica y un tamaño entre 3 y 5 μm .

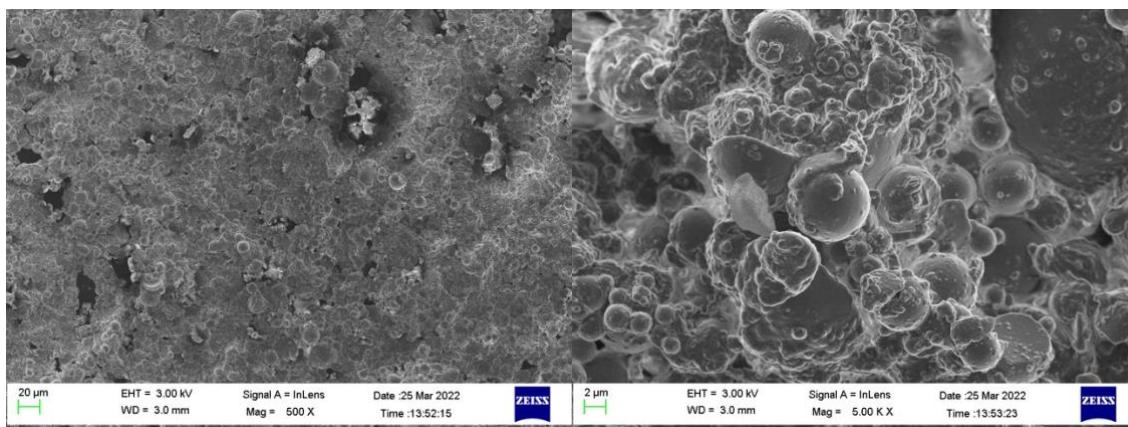


Figura V.44 – Imágenes del SEM para las cápsulas con cobre a pH 6

Para determinar la presencia de cobre, se utiliza la retrodispersión del microscopio a un voltaje más elevado, donde la presencia de compuestos metálicos se hace notar con un color más brillante. En la Figura V.45, se pueden ver algunos destellos que puede tratarse de la presencia de cobre por lo que se procede a utilizar el análisis EDS.

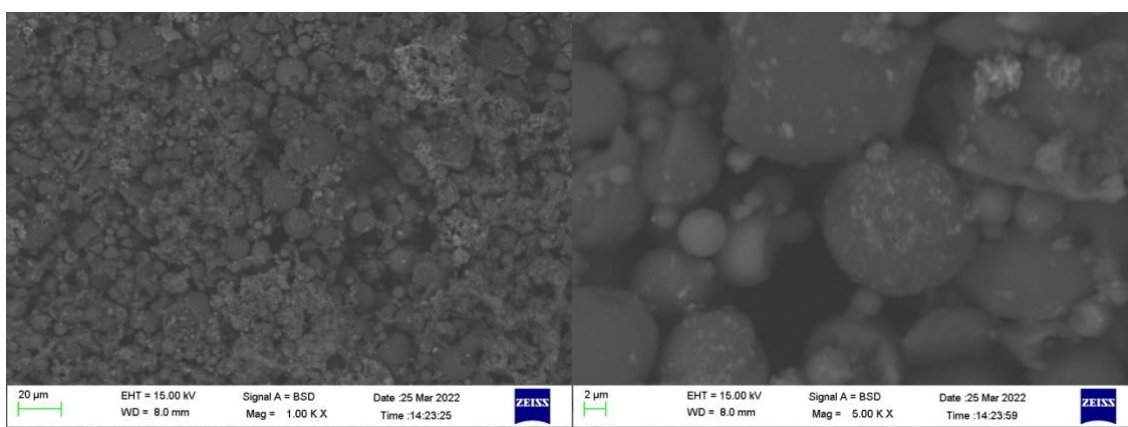


Figura V.45 – Imagen SEM con retrodispersados para las cápsulas con cobre

Fijando los puntos de muestreo para el análisis con EDS (Figura V.46), se obtienen los espectros mostrados en la Figura V.47. Se observa que la formación del metal se ha llevado con éxito como se observa en el espectro 2, sin embargo, la deposición sobre la superficie de las nanopartículas de sílice es escasa, y no cumple su función de aportar una capa extra para impermeabilizar y proteger el interior de las cápsulas formadas.

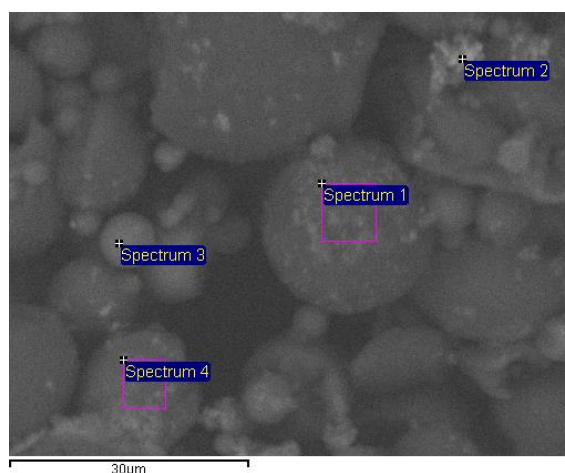


Figura V.46 – Puntos definidos para la determinación de espectros con EDS

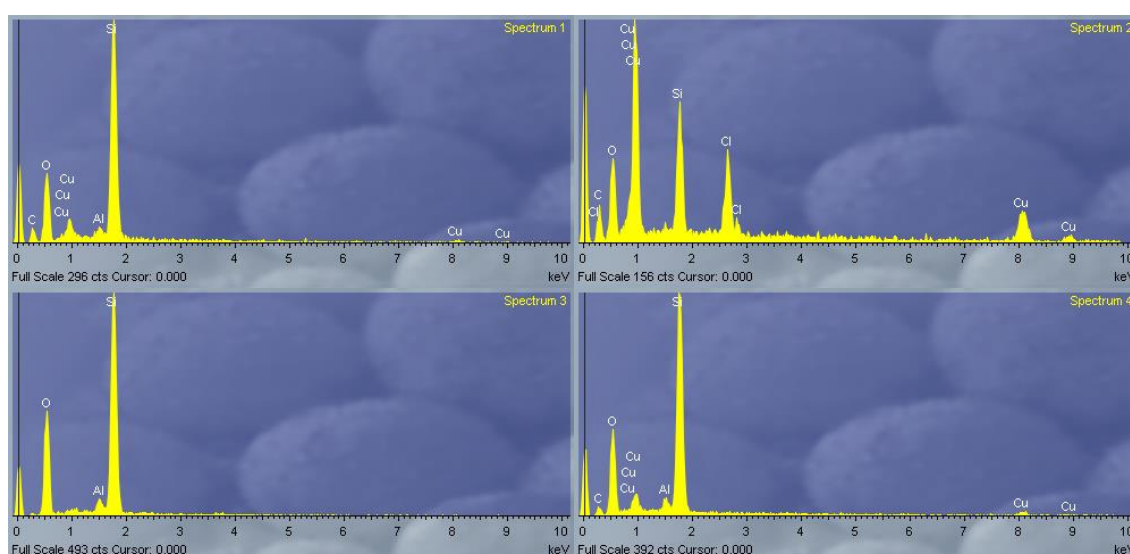


Figura V.47 – Espectros EDS para los puntos indicados

Ahora, si se deja transcurrir un poco más de tiempo la reacción del metal, se observa un nuevo cambio de color tomando un color marrón más oscuro. Tras este cambio de apariencia se vuelve a coger una muestra para ser, igualmente, observada en SEM.

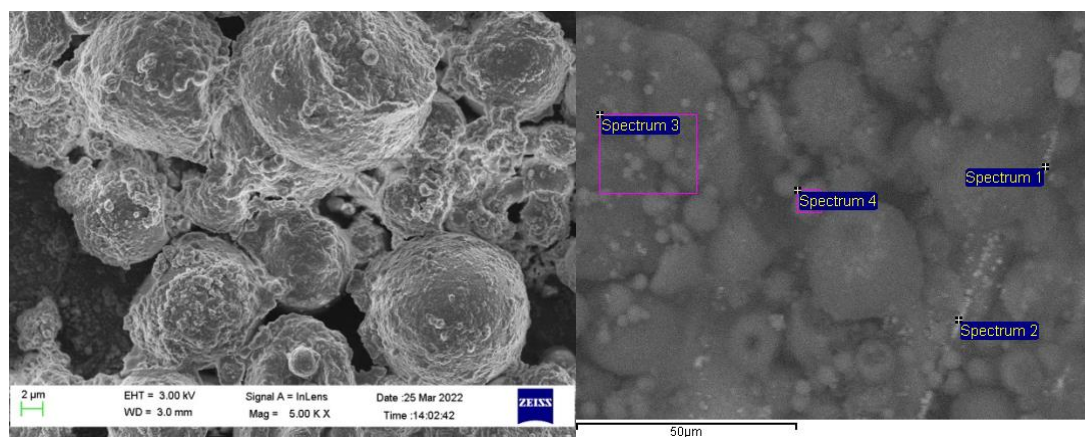


Figura V.48 – Imagen SEM y puntos de análisis EDS

En la Figura V.48, se puede ver que los resultados son similares a la muestra anterior, se detecta la formación del metal, pero no se deposita sobre la superficie de las esferas de sílice, como se demuestra en los espectros obtenidos que se muestran en la Figura V.49. Así, en los espectros 1 y 3, tomados sobre la superficie de las cápsulas no hay presencia de cobre y solo se presenta el pico mayoritario de silicio. Por otro lado, en los espectros 2 y 4 tomados en el fondo de la muestra, sobre las zonas más brillantes, sí que aparece el pico correspondiente al cobre, pero quedando apartado de las cápsulas de sílice formadas. Por lo que se sigue experimentando para obtener el fin deseado.

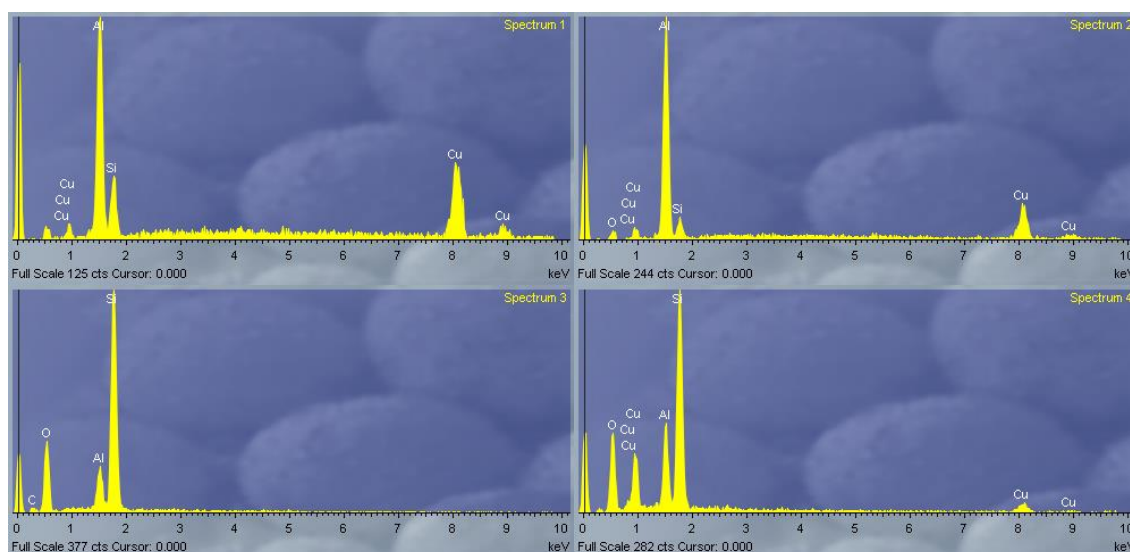


Figura V.49 – Espectros EDS para los puntos indicados en la Figura V.48. Aumento de la cantidad de cobre

Para comprobar si un aumento en la cantidad de cobre añadida en la formación del recubrimiento es efectivo, se preparan 4 muestras diferentes, aumentando 10 veces la cantidad de cobre añadida, de la misma forma, la cantidad de ácido ascórbico también se multiplica. Se modifica también el orden de adición del cobre, probando a añadirlo tanto antes de la formación de las cápsulas, añadiendo en la fase acuosa de nanopartículas la masa de cobre establecida para alcanzar la concentración deseada en disolución. También se añade posteriormente a la formación de las cápsulas como se había hecho anteriormente. La reacción de reducción del metal se fija a un pH de 6, que anteriormente había conseguido unos mejores resultados. Se toman muestras tanto transcurridas 4 horas de reacción en las condiciones establecidas como al día siguiente, para ver si un mayor tiempo de reacción favorece la deposición del cobre metálico sobre la superficie de las cápsulas.

En este caso se utiliza, de nuevo, el retrodispersado del SEM para diferenciar entre la parte metálica y las partículas de sílice. Las partes más brillantes se corresponden con la presencia del metal. En las Figura V.50 y Figura V.51, se muestran los resultados para el cobre añadido previo y posterior a la formación de la emulsión, respectivamente.

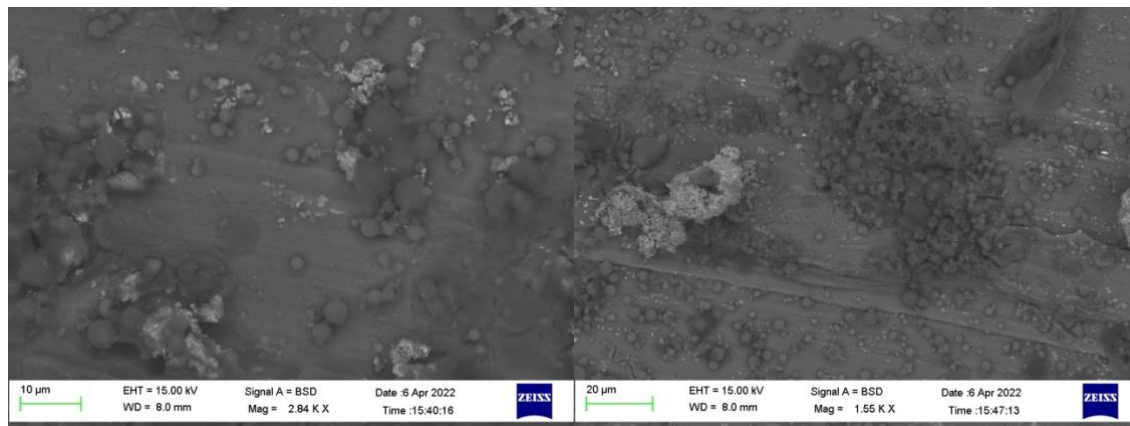


Figura V.50 – Imágenes con retrodispersados del SEM añadiendo el cobre previo a la emulsión para la muestra a las 4 horas (izquierda) y a las 24 h (derecha)

En conclusión, en todas las imágenes se observan morfologías muy similares, tanto en tamaño como en forma. La principal diferencia entre ambas es que en la muestra donde se ha mezclado primero el metal con el ácido, este, parece quedar más finamente dividido, pero no se consigue formar la capa de recubrimiento con el metal. Se decide probar con una última modificación en el método antes de descartar el uso del cobre como formador de un recubrimiento metálico alrededor de las cápsulas de cobre.

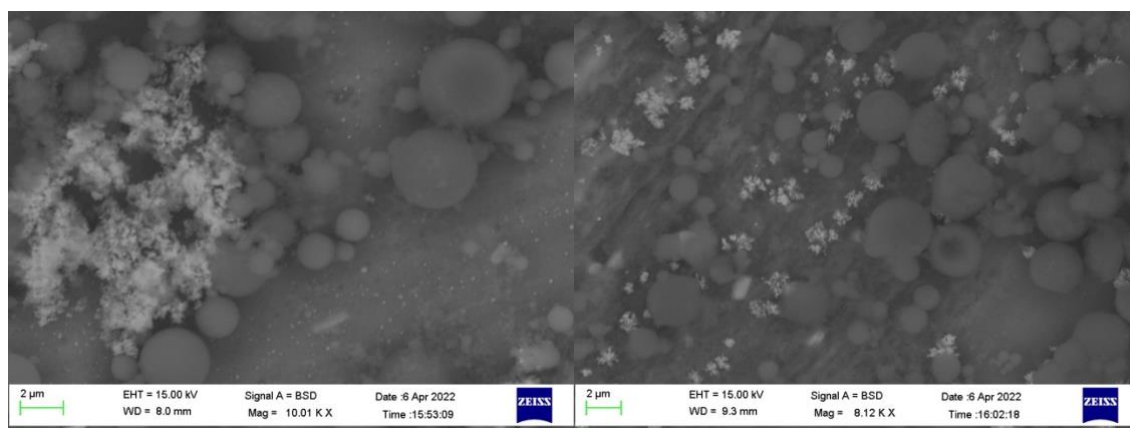


Figura V.51 – Imágenes con retrodispersados del SEM añadiendo el cobre tras la formación de la emulsión para la muestra a las 4 horas (izquierda) y al día siguiente (derecha)

1.2.11.4.2. Aumento de temperatura en la reacción de reducción del metal

Por último, se decide probar con la aplicación de temperatura a la reacción de reducción del metal para intentar acelerarla y conseguir que las partículas de cobre queden

recubriendo las cápsulas de sílice. Siguiendo la metodología descrita, se hace transcurrir la reacción del metal a una temperatura de 45°C, se toma una muestra de disolución y se prepara para ser analizada en SEM.

En la Figura V.52, se muestran las imágenes obtenidas a diferentes voltajes. A una corriente más baja (5 kV) se obtiene una mayor resolución de la imagen, denotándose cápsulas similares a las anteriores, pero de un tamaño algo mayor. Para comprobar la deposición del cobre se aumenta la corriente para obtener la imagen con retrodispersados, sin embargo, no se observan partes brillantes sobre las cápsulas y sí en el fondo de la muestra, lo que hace indicar que el cobre está presente pero tampoco se consigue depositar en la superficie de las cápsulas.

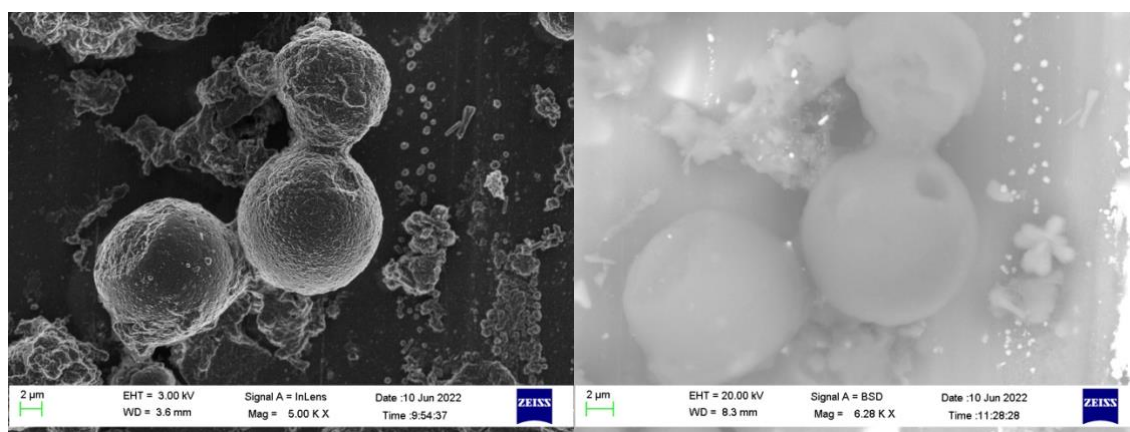


Figura V.52 – Imágenes del SEM para la reacción de reducción de cobre a 45°C

Por lo que de nuevo se descarta al cobre para este uso y se sigue explorando alternativas para conseguir que algunas partículas se depositen sobre la superficie de sílice para formar la capa de recubrimiento.

1.2.11.4.3. Recubrimiento con plata

Alternativamente, se realizan experimentos con plata siguiendo el mismo procedimiento. Tras añadir 10 mL de AgNO_3 0.1%wt y 2 mL de ácido ascórbico 2.5%wt, el pH de la disolución es de 3.7. La reacción se lleva hasta pH 4, por debajo del punto isoelectrónico de la plata descrito en el apartado 8.6 de la sección de Metodología, asegurando una diferencia de potencial zeta máxima que aumenta la atracción entre las partículas de sílice y la plata.

La morfología de las cápsulas formadas se puede observar en la Figura V.53. En estas imágenes parece encontrarse una mayor agregación entre las partículas presentes.

En cuanto al tamaño de las cápsulas producidas, la mayoría de ellas se encuentran en un rango de diámetros entre 2 y 5 μm .

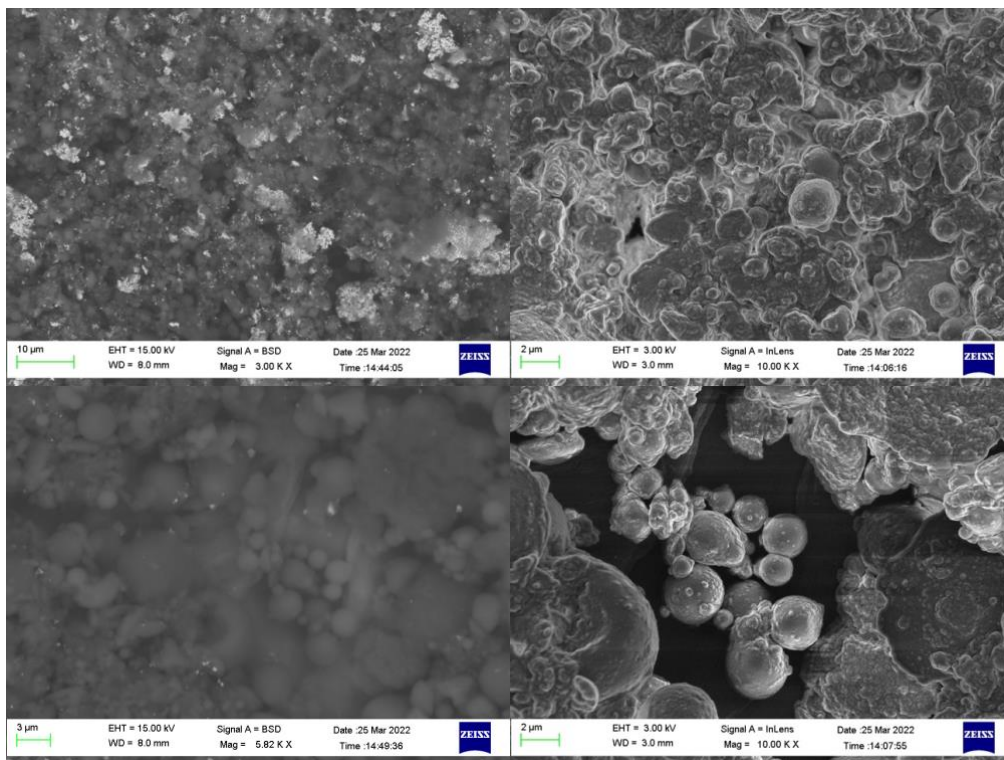


Figura V.53– Imágenes del SEM para la reacción de reducción de plata

Al igual que con las muestras de cobre, se analizan en SEM con el analizador EDS para probar el desarrollo del objetivo deseado. En la Figura V.54 se observan los resultados obtenidos en la imagen y los espectros obtenidos en tres zonas diferentes.

En el espectro 1 se puede demostrar la formación de las nanopartículas de plata. Sin embargo, esto se obtiene sobre un punto brillante aislado y no sobre la superficie de las cápsulas como se demuestra en los espectros 2 y 3 en los que se toma un área sobre alguna cápsula y el pico de la plata no es observable.

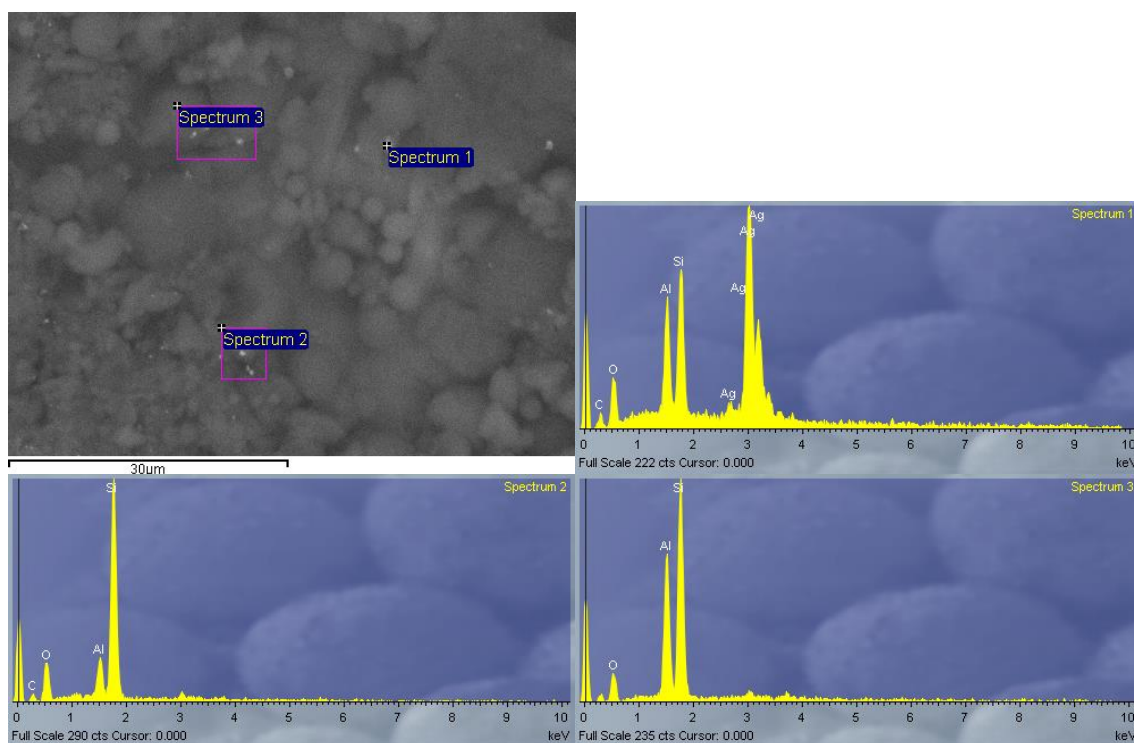


Figura V.54 – Imagen SEM y puntos de análisis EDS para las cápsulas de sílice formadas y preparadas para un recubrimiento metálico con plata

1.2.12. Recubrimiento con quitosano

Por último, se prueba con un compuesto de naturaleza muy diferente como es el quitosano, un biopolímero cuya carga superficial positiva está ampliamente demostrada. Para corroborarlo se lleva a cabo una titración con Zetasizer para analizar la naturaleza de su carga superficial cuando se varía el pH. Así, en la Figura V.55, se presenta la curva obtenida para la determinación del potencial zeta de la disolución de quitosano partiendo de su valor pH inicial. Al necesitar una disolución ácida para favorecer su disolución, se diluye en una disolución de ácido acético 0.1N, partiendo así desde un valor de pH cercano a 2. Se puede ver claramente su gran estabilidad a valores de pH ácidos tomando valores muy por encima de los 30 mV fijados para la obtención de una suspensión estable desde el punto de vista electrostático. Conforme va aumentando el pH este valor de potencial zeta va disminuyendo hasta alcanzar el punto isoeléctrico a un pH de 7.65. Además, a estos valores de pH la disolución comienza a hacerse más densa por la precipitación del quitosano hasta formar un gel muy viscoso casi sólido donde deja de poder manejarse la emulsión, por lo que no interesa llevar el quitosano a valores de pH por encima de la neutralidad.

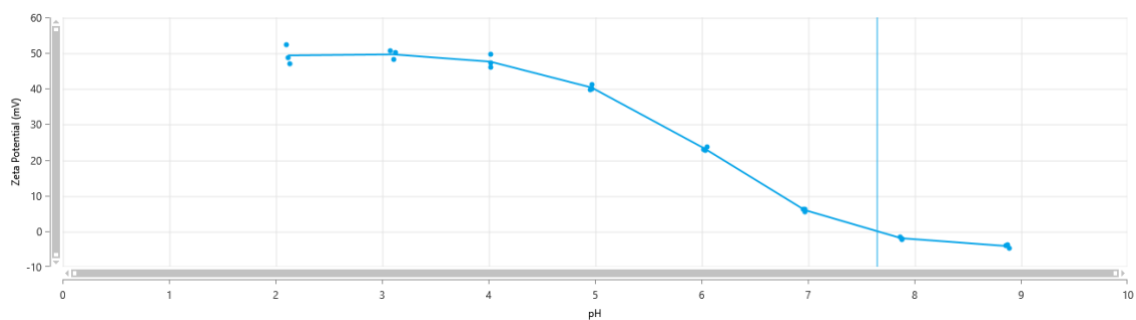


Figura V.55 – Curva de titración para el quitosano

De esta forma, la atracción superficial entre las partículas de sílice con carga negativa y las de quitosano con carga positiva, está favorecido por la diferencia de potencial zeta de los dos compuestos y las dos partículas se atraerán electrostáticamente al estar presentes en la misma disolución.

Para la caracterización de las cápsulas formadas siguiendo el procedimiento descrito para la formación de estas para la formación de una capa de recubrimiento con quitosano, se prepara una muestra para SEM y se analiza. El resultado se muestra en la Figura V.56. De nuevo la cápsulas formadas, son muy parecidas a las anteriores tanto morfológicamente como en cuanto a tamaño, con una variabilidad algo mayor y presentándose cápsulas de entre 2 a 5 μm .

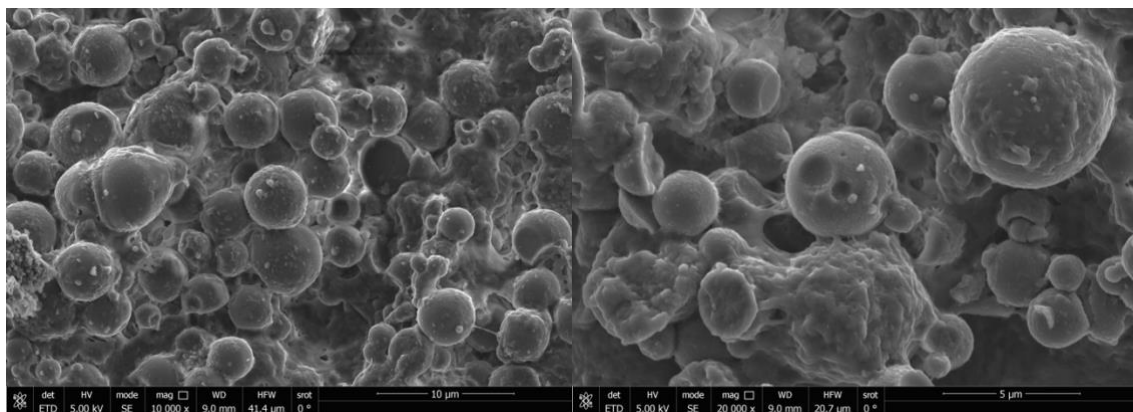


Figura V.56 – Imágenes del SEM para las cápsulas con recubrimiento con quitosano

Sin embargo, en el caso del quitosano, no puede llevarse a cabo su determinación mediante EDS, ya que un mayor voltaje hace que este tipo de polímero sea transparente para el microscopio y no pueda diferenciarse. Así, en las imágenes obtenidas a un menor voltaje de 5 kV, parece distinguirse una especie de película alrededor de las cápsulas de sílice, otorgándole una superficie algo más rugosa y en algunos puntos provocando la agregación de algunas cápsulas.

Para determinar la consecución o no del objetivo de formar una capa de recubrimiento se procede al desarrollo de ensayos de liberación con los diferentes recubrimientos probados.

1.2.13. Liberación de las cápsulas con recubrimiento

Para finalizar con el estudio realizado sobre la utilización de las cápsulas con partículas de sílice Ludox, se lleva a cabo un estudio de liberación por dilución con algunos de los recubrimientos detallados en los apartados anteriores para cuantificar la mayor o menor eficacia de encapsulación y su comportamiento a la hora de liberar el tinte en su interior que sirve para predecir como sería la liberación cuando en las cápsulas se retuviera un biocida en su interior. De esta forma, en la Figura V.57, se muestran los siguiente ensayos de liberación:

1. Ensayo control con el tinte, añadiendo la cantidad máxima de tinte que se podría liberar si no se pierde nada de tinte en los pasos sucesivos y se liberara la totalidad de este.
2. Mezcla de la misma cantidad de tinte empleada para la formación de cápsulas y las partículas de sílice sin realizar ninguna modificación extra.
3. Formación de las cápsulas de sílice con tinte en su interior
4. Formación de las cápsulas de sílice con tinte en su interior y recubrimiento con quitosano
5. Formación de las cápsulas de sílice con tinte en su interior y recubrimiento con cobre

Todas las muestras son preparadas siguiendo el procedimiento descrito en la sección de metodología. En la gráfica mostrada, se presentan los valores de absorbancia divididos entre el valor máximo de absorbancia obtenido para el experimento control al final del experimento, con lo que los puntos experimentales coincidirán con el porcentaje de liberación obtenido.

Claramente se pueden diferenciar las curvas con y sin recubrimiento, quedando muy por debajo las primeras. La curva control marca el proceso de difusión del tinte a través de la membrana, donde esta, es la que controla el proceso y sirve como referencia para compararlos con el resto de las curvas obtenidas.

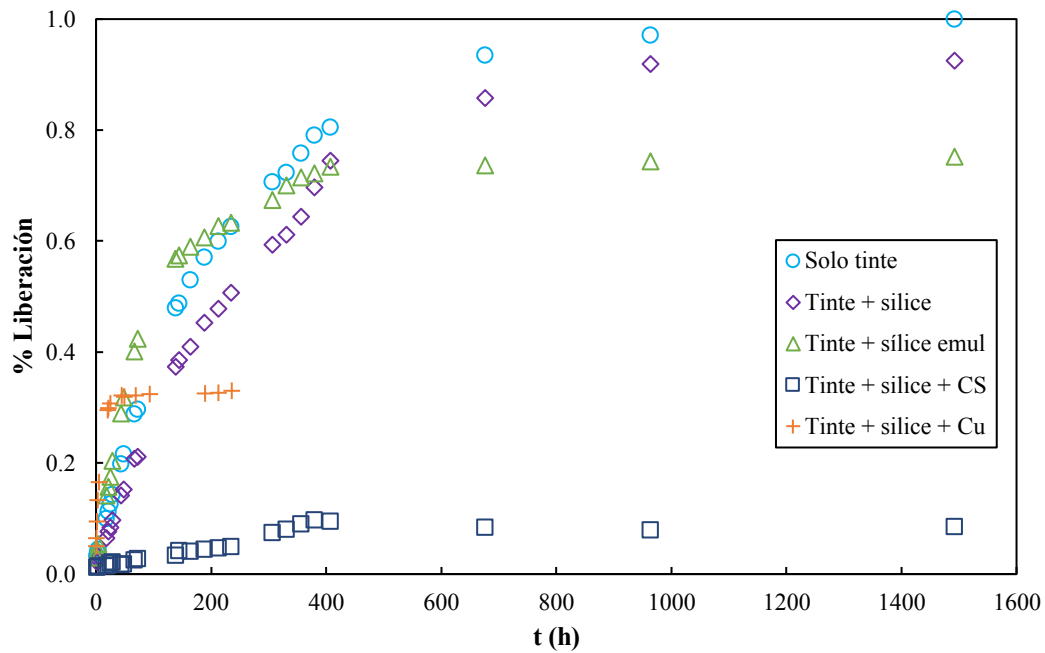


Figura V.57 – Ensayos de liberación con diferentes recubrimientos

El experimento que se queda más cerca del experimento control es el de la mezcla del tinte y la sílice sin emulsionar. La diferencia obtenida puede deberse a una posible adsorción de una pequeña de tinte por parte de las nanopartículas o algún ligero error experimental en el procedimiento donde se haya podido perder cierta cantidad de tinte, aun así, se consigue llegar hasta por encima de 90% del total del tinte. Además, puede observarse una liberación muy similar en ambos casos, con puntos muy similares al principio y que se van alejando debido a la diferencia de absorbancia final, pero tienden a estabilizarse en los mismos tiempos, por lo que se tienen dos experimentos con resultados muy parecidos. Este hecho se puede constatar mediante la linealización de la ecuación de la curva, donde en la Figura V.58 se determina una constante k de liberación muy similar para ambos experimentos.

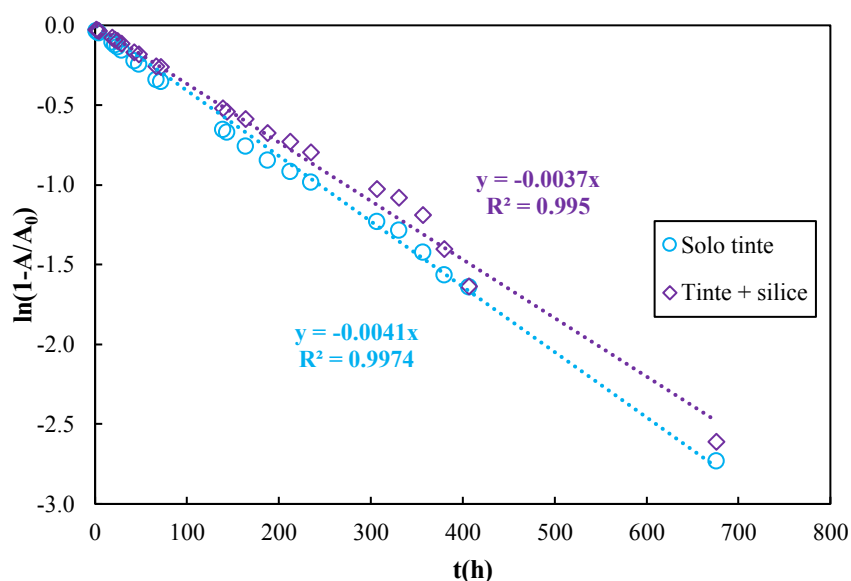


Figura V.58 – Linealización para los ensayos de liberación de tinte sin encapsular

El siguiente paso, es el de las cápsulas de sílice ya emulsionadas conteniendo el tinte en su interior sin ningún tipo de recubrimiento. Si se ve el valor final alcanzado, es un valor mucho más alto que lo obtenido hasta ahora en esta situación, como se mostraba en la Figura IV.31, donde se alcanzaba aproximadamente un 60% de tinte transportado y liberado, en este caso, se llega hasta un 75% de la cantidad total de tinte. Con la mejora de la técnica se consigue perder una menor cantidad de tinte en la manipulación y mejora la eficacia de encapsulación. Sin embargo, como ocurría anteriormente, las cápsulas son permeable y el tinte se va liberando poco a poco por dilución. En los primeros instantes de una forma más rápida que los experimentos de control que se va ralentizando conforme se va acercando a la concentración máxima del experimento debido a la disminución del gradiente de concentración entre el interior de la membrana y la disolución acuosa externa que ralentiza el proceso de difusión.

En cuanto a los experimentos con recubrimiento, se quedan en un porcentaje de liberación bastante inferior. En el caso del recubrimiento de cobre, se demuestra la formación de una cápsulas permeables de sílice sin conseguir el recubrimiento con cobre como demostraban las imágenes presentadas anteriormente, donde el metal quedaba fuera de la superficie de estas. Además, se denota una amplia pérdida de tinte en el proceso de formación de las cápsulas, alcanzándose solamente un porcentaje de liberación ligeramente por encima del 30%, por lo que en el proceso de intentar formar una capa de recubrimiento se ha perdido la mitad del tinte inicial inmovilizado por las cápsulas y que son capaces de transportar y liberar.

Por último, las cápsulas con recubrimiento de quitosano se quedan en la gráfica de liberación muy por debajo del resto de curva, no superando el 10% de liberación en el punto final, por lo que parece que puede servir como medio para retener el tinte en su interior. Para corroborarlo se deben probar otros medios de liberación para determinar si es efectiva esta encapsulación y se puede dar la liberación del tinte atrapado en el interior de las cápsulas con este recubrimiento de biopolímero. Así pues, este tema se detalla en el siguiente apartado.

1.2.14. Liberación por otros mecanismos

Para verificar si realmente con el recubrimiento de quitosano sobre las cápsulas de sílice ha tenido efecto y ha conseguido retener en su interior una cantidad considerable de tinte, se prueba a emplear otros mecanismos de liberación diferentes al ensayo por dilución con el que se ha visto que el porcentaje de liberación obtenido es relativamente bajo.

Para ello, tomando la misma cantidad de emulsión que para el ensayo de liberación se procede a la ruptura del recubrimiento mediante tres mecanismos diferentes:

1) Aplicación de esfuerzo mecánico con reómetro

Mediante la aplicación de un esfuerzo creciente en intervalos, se toma muestra y se diluye en la misma proporción que para el ensayo de liberación. Sin embargo, para el análisis de la muestra con recubrimiento con quitosano, no se obtienen buenos resultados ya que no se consigue romper la muestra y, por tanto, no se tienen buenos resultados a medir en el espectrofotómetro. Se recurre al siguiente mecanismo.

2) Adición de disolución ácida

Se prueba ahora mediante la disolución de las cápsulas centrifugadas en un medio ácido 0.1 N de ácido acético, igual a la que se utiliza para la disolución de las partículas de quitosano para prepararlas para la formación del recubrimiento. Se toman medidas en espectrofotómetro a diferentes tiempos (20 min, 1 h y 24 h). Tras este tiempo tampoco se consigue llevar a cabo la ruptura de la matriz de cápsulas y se procede a duplicar la concentración de ácido que tampoco tiene efecto. Por lo tanto, se tiene que recurrir a la última técnica disponible para probar su efecto.

3) Aplicación de ultrasonidos

Por último, se prueba la liberación mediante la aplicación de energía mediante una sonda de ultrasonidos a la disolución de las cápsulas en un volumen equivalente a la dilución realizada en el ensayo de liberación. A los 10 minutos se toma la muestra y se mide en espectrofotómetro con un valor de absorbancia 0.610 que comparándolo con el valor máximo del experimento control del tinte encapsulado en las cápsulas de sílice sin ningún tipo de recubrimiento, equivaldría a un porcentaje de liberación del 50%.

2. Experimentación con látex

2.1. Caracterización

Para caracterizar las nanopartículas de látex producidas siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 9.2, se describen los resultados de la medida de algunas variables que se detallan en los siguientes apartados.

2.1.1. Tamaño

El tamaño de partícula en la suspensión formada se realiza en el equipo Mastersizer, equipado con el Hydro 2000G como unidad de dispersión, donde se obtiene la curva mostrada en la Figura V.59. Se observa una distribución de tamaños bastante uniforme, con una única población en un rango estrecho, indicando que hay poca variabilidad en el diámetro de partícula obtenido.

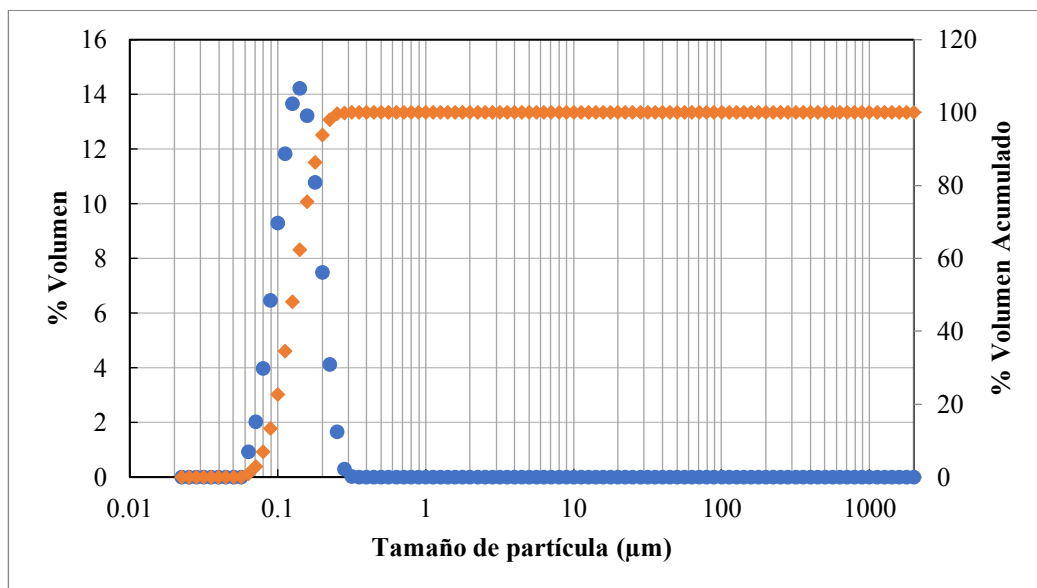


Figura V.59. Distribución de tamaño para la suspensión de látex sintetizada

En cuanto a la distribución de tamaño de las partículas, se puede expresar de diferentes formas, dependiendo del cálculo realizado para su obtención. Aunque como se ha mencionado antes, al tratarse de una distribución con un único pico y con poca variación, no hay gran diferencia en cuanto a los diámetros característicos de una suspensión de partículas.

Así, si se toma el diámetro en medio teniendo en cuenta la superficie de las partículas medidas, se tendría el diámetro $D[3,2]$, con un valor de 121 nm. Por otro lado,

si se considera un volumen esférico para todas las partículas medidas, se tiene el diámetro medio por volumen, $D[4,3]$, con un valor de 133 nm. En cuanto a los percentiles, se obtiene que el 10% de las partículas son menores a 85 nm, el percentil 50 de las partículas se encuentra a un tamaño de 121 nm y, por último, el 10% de las partículas de mayor tamaño tienen un diámetro superior a 187 nm. El área superficial específica obtenida es de 49.5 m²/g.

2.1.2. Análisis termogravimétrico

Usando la termobalanza, se hace un estudio de la variación de la masa de la muestra de látex con el aumento de la temperatura. De esta forma, se puede determinar el porcentaje de sólidos presente en la suspensión de látex preparada. Se mantiene la temperatura de ensayo de 145°C durante 30 minutos para conseguir la estabilización de la pesada, llevándose a cabo la evaporación de todo el agua presente y quedando únicamente las partículas de látex y obteniendo el porcentaje de sólidos total.

Así, en la Figura V.60, se observa cómo evoluciona la masa de la muestra en función del aumento de la temperatura con el paso del tiempo. Se tiene una rampa de incremento de temperatura de 10°C/min hasta llegar a una temperatura ligeramente inferior a 150°C, asegurando que todo el agua se ha evaporado. Se puede ver que la masa de muestra disminuye de forma continua hasta alcanzar el máximo de temperatura, debido a la presencia de algunas sales en la suspensión, utilizadas en el método de preparación de las nanopartículas de látex que provoca el aumento de la temperatura de ebullición.

En cuanto al porcentaje de muestra perdido, alcanza un valor del 60%, quedando la masa restante de muestra al final del experimento. Esta masa corresponde con las partículas de látex presentes en la suspensión, determinándose que la mezcla acuosa preparada contiene un 40% de sólidos totales en suspensión, en concordancia con los resultados obtenidos en el estudio de referencia [80,81] para la síntesis de las nanopartículas de látex.

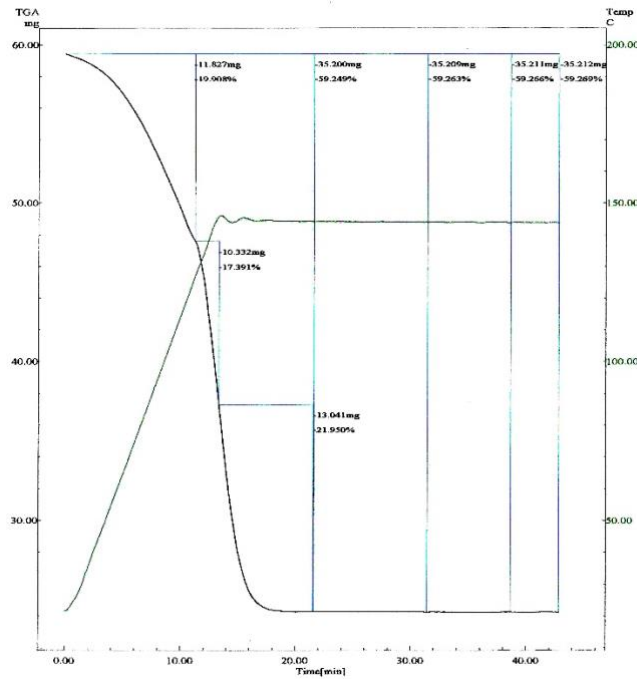


Figura V.60 – Curva de análisis termogravimétrico para la suspensión de látex

2.1.3. Potencial zeta

Al igual que para las partículas compuestas de sílice, la determinación del potencial zeta de las nanopartículas de látex en suspensión es fundamental para entender su comportamiento a la hora de la formación de emulsiones y del grado de afinidad para la elección de un material con el que formar un posible recubrimiento para el sellado de las cápsulas. Usando el equipo Zetasizer con el titrador automático, se determina la variación del valor de potencial zeta respecto al pH, mostrado en la Figura V.61. Se observa que, en el rango de pH estudiado, la variación de potencial zeta es muy pequeño, con valores muy negativos, por debajo de -30 mV, lo que indica una gran estabilidad de las partículas en suspensión.

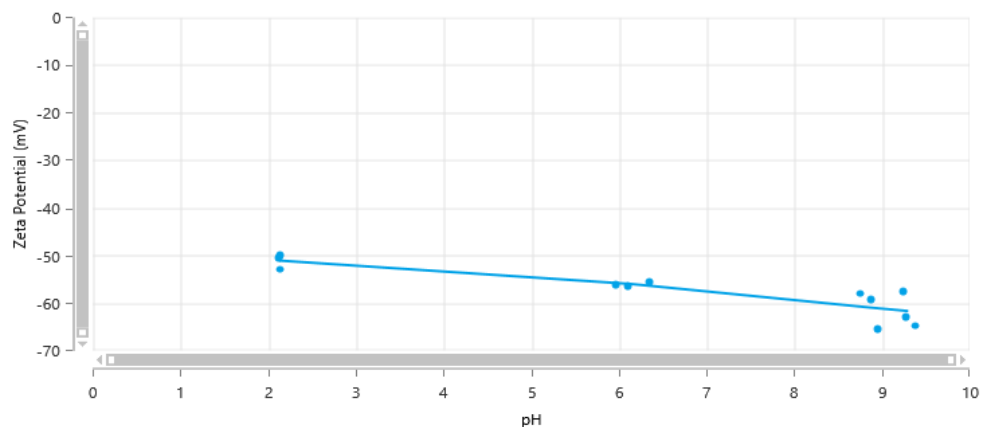


Figura V.61– Potencial zeta de la suspensión de látex en función del pH

Así pues, se tienen unas partículas que en disolución presentan una carga superficial muy negativa y que a la hora de formar un posible recubrimiento se requiere de compuestos con carga del signo opuesto para tener éxito. En apartados posteriores se sigue investigando sobre este aspecto.

2.1.4. Ángulo de contacto

Para determinar el grado de interacción existente entre las nanopartículas de látex y el agua en el que se encuentran suspendidas, se realiza la medida del ángulo de contacto. Para ello, en la Figura V.62 se presentan diferentes réplicas en la medida de la evolución del ángulo de contacto medido entre la superficie de nanopartículas preparado según el procedimiento descrito en la descripción de la técnica y una gota de agua depositada sobre ella usando el tensiómetro de gota.

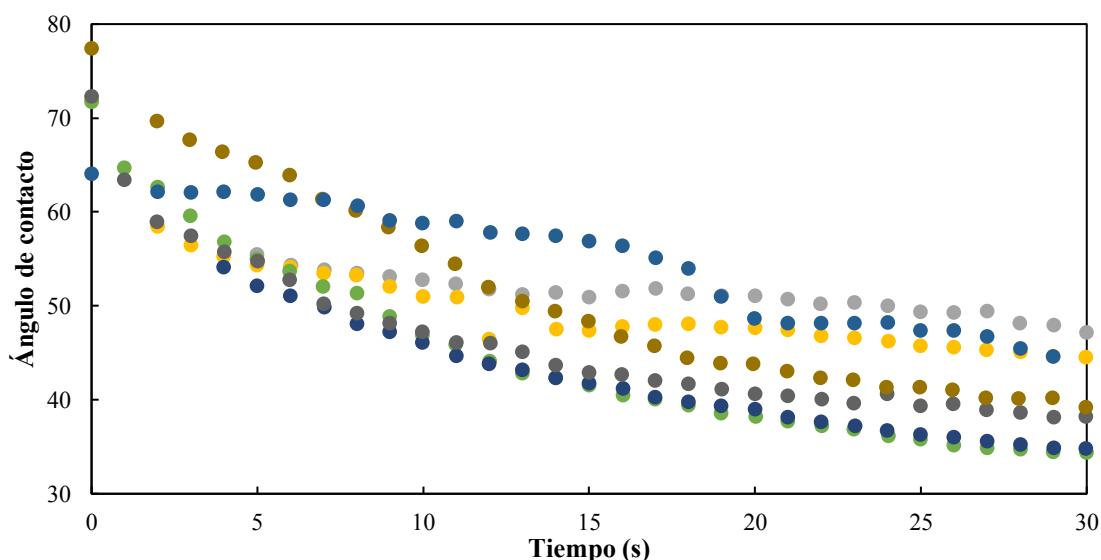


Figura V.62– Evolución del ángulo de contacto entre la superficie de látex y una gota de agua.

Se puede ver claramente como el ángulo de contacto va decreciendo, tendiendo a estabilizarse en los instantes finales del experimento. Esta disminución denota un alto grado de hidrofiliicidad de las nanopartículas, las fuerzas de adhesión líquido-sólido son más fuertes que las propias fuerzas de cohesión del líquido, provocando que el líquido tienda a mojar la superficie del sólido formando ángulos menores a 90° , en concreto el valor promedio del ángulo de contacto a los 30 segundos es de $40.34 \pm 5.02^\circ$.

2.1.5. Tensión interfacial

Para comprobar el comportamiento de las partículas de látex en la formación de la emulsión, se estudia la tensión interfacial cuando se pone en contacto una gota de la suspensión acuosa de las nanopartículas envuelta de aceite de girasol.

Como se ha comprobado en el apartado anterior, la energía superficial de las nanopartículas de látex en la suspensión acuosa es elevada, quedando bien cohesionada la disolución. Este hecho va a influir en el comportamiento de las nanopartículas cuando se encuentran en la interfase agua-aceite y se deben determinar las fuerzas existentes entre las partículas y la disolución orgánica para comprender su influencia en la estabilización de la emulsión.

Para corroborar la actuación de las nanopartículas en la interfase, se mide la tensión interfacial (agua/aceite de girasol) usando el tensiómetro KSV CAM 200 con y sin presencia de partículas de látex.

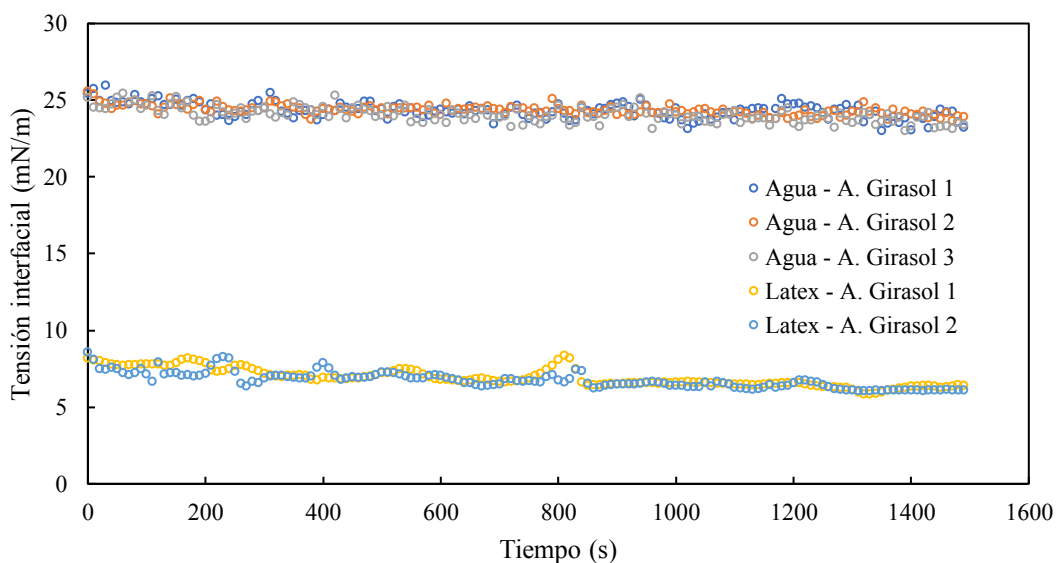


Figura V.63– Evolución de la tensión interfacial para la interfase agua aceite con y sin presencia de nanopartículas de látex.

En la Figura V.63, se puede observar una importante reducción de la tensión interfacial que provocan las partículas de látex, que cae.

Cuando están en contacto agua y aceite, dos líquidos claramente inmiscibles, la tensión interfacial es relativamente alta, lo que provoca la formación de una interfase perfectamente definida entre las dos fases. Por el contrario, la presencia de nanopartículas de látex en la interfase agua-aceite provoca la reducción de la energía que tiende a mantener separadas las dos fases, facilitando la formación de emulsiones más estables.

Así pues, mientras la interfase agua-aceite muestra un valor de tensión interfacial alrededor de 23.91 ± 0.44 mN/m, con la presencia de látex se reduce hasta un valor de 6.23 ± 0.21 mN/m, reduciendo a un 25% del valor inicial.

Así pues, aunque la fuerza de atracción en la suspensión acuosa de las partículas de látex es considerablemente alta, las fuerzas de adhesión y cohesión de las partículas en el límite común entre los dos líquidos son mayores, tendiendo las partículas a ocupar la interfase reduciéndolo que reduce el valor de tensión interfacial. De esta manera, estas partículas actúan como agente emulsionante, capaces de formar emulsiones más estables, quedando las nanopartículas de látex ocupando el espacio interfacial evitando que las gotas formadas coalezcan.

Adicionalmente, se realiza la medida de tensión interfacial de disoluciones de látex con diferentes tamaños de partícula para comprobar su comportamiento y determinar si mejoran los resultados obtenidos respecto al látex sintetizado. Las curvas obtenidas para los tres tamaños diferentes probados se presentan en la Figura V.64.

En las curvas se observa un comportamiento similar al mostrado por las nanopartículas de látex sintetizado, obteniendo en los tres casos valores de tensión interfacial relativamente bajos en el equilibrio, haciéndolas aptas para la estabilización de emulsiones de tipo Pickering colocándose en la interfase agua-aceite.

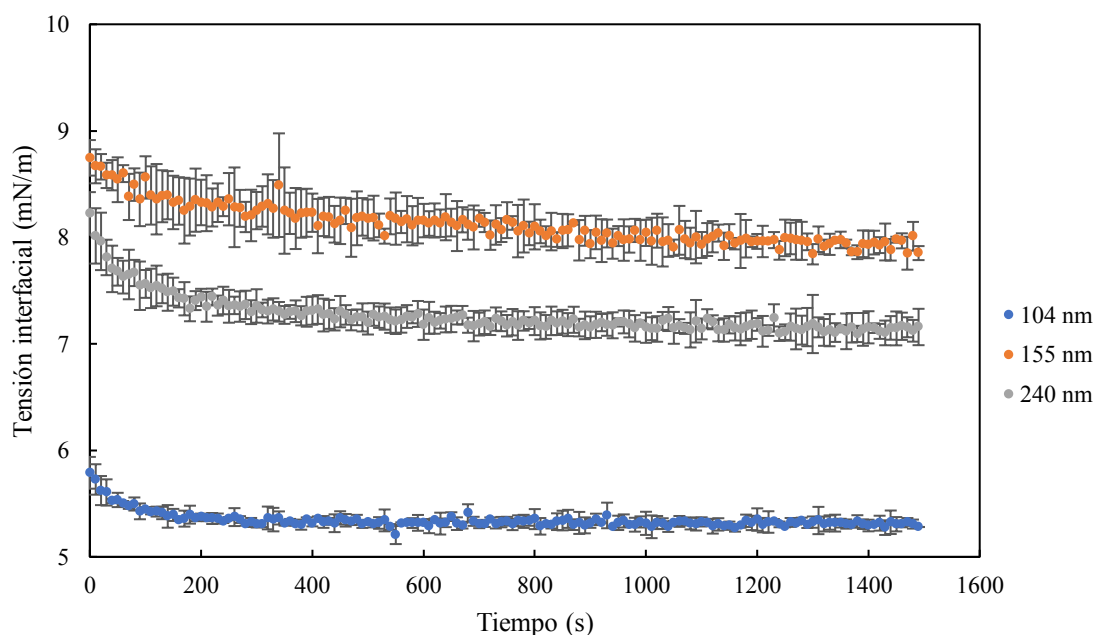


Figura V.64– Curvas de tensión interfacial para otras suspensiones de látex de diferentes tamaños de partículas.

Con todo esto, las que mejores resultados han aportado son las partículas de menor tamaño, las de 104 nm y las sintetizadas de 133 nm, mostrando una mejor movilidad hacia la interfase, obteniendo valores de tensión interfacial más bajos. Estas son las que se probarán más adelante para la formación de cápsulas mediante la formación de emulsiones de Pickering.

2.1.6. Ensayo de biodegradabilidad

Para verificar que el uso de este tipo de nanopartículas en formulaciones detergentes no compromete su biodegradabilidad, se realiza un ensayo de biodegradabilidad de las nanopartículas de látex. Para este ensayo de biodegradación según la norma OCDE 301 E (OCDE, 1992) se inocula una disolución diluida de látex, añadiendo 15 mg de la disolución preparada, en 1 L de un medio de cultivo adecuado (Apartado 1.3.1) y se realiza su seguimiento durante 28 días mediante la medida del carbono orgánico total (TOC).

En la Figura V.65 se muestra la evolución del porcentaje de carbono eliminado frente al tiempo. Se puede observar que aproximadamente el 70% del carbono inicial se ha eliminado en los 28 días del test, por lo que las nanopartículas de látex pueden considerarse biodegradables.

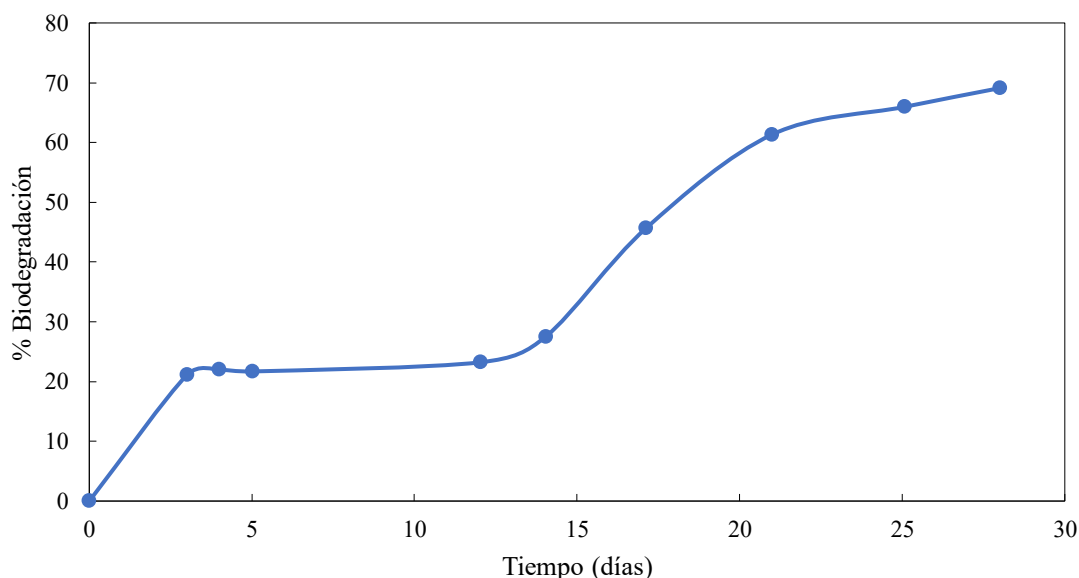


Figura V.65– Seguimiento de la curva de biodegradabilidad de las nanopartículas de látex siguiendo el ensayo estático normalizado según la OCDE 301

2.2. Justificación de variables que afectan en la formación y estabilidad de la emulsión

Tras la discusión de los resultados obtenidos de las variables medidas en el apartado anterior de caracterización de las partículas de látex sintetizadas, se pueden exponer las siguientes afirmaciones:

- Se pueden preparar emulsiones con un tamaño de unos 130 nm, tamaño dentro del rango para la formación de nanoemulsiones [91].
- Se obtienen valores para el potencial zeta de las partículas de látex por debajo de -30 mV, denotando una suspensión estable donde las partículas poseen una alta carga superficial negativa, repeliéndose entre sí, manteniéndose en suspensión de forma estable, evitando la agregación y aglomeración de partículas
- Las partículas de látex muestran afinidad por la fase acuosa, presentando un ángulo de contacto que va decreciendo con el tiempo y se estabiliza en 40°, mostrando una gran mojabilidad en disoluciones acuosas.
- Las partículas de látex son capaces de disminuir la energía interfacial en la interfase agua aceite, actuando como agentes emulsionantes y denotando su capacidad para la formación de emulsiones tipo Pickering.

Con todo esto, se procede a la aplicación de dos métodos diferentes de encapsulación, con diferentes técnicas de homogeneización para la formación de emulsiones de diferente energía, cuyos resultados son estudiados, así como ensayos de liberación con tinte y enzima proteasa y la posibilidad de formación de capas de recubrimiento para la impermeabilización de las cápsulas.

2.3. Encapsulación

Como se ha visto, la formación de nanoemulsiones de Pickering se puede llevar a cabo con métodos de homogenización de diferentes energías, tanto con la aplicación de menores energías (Vortex) como usando homogeneizadores de más intensidad (Silverson, Ultraturrax). En los apartados siguientes se describe la experimentación realizada con las nanopartículas de látex y la discusión de los resultados obtenidos.

2.3.1. Formación de las cápsulas con adición de etanol para la agregación de las partículas de látex

En primer lugar, se lleva a cabo la formación de cápsulas de látex mediante una emulsión de Pickering usando Vortex como método de homogeneización como se describe en la metodología. En trabajos anteriores se ha realizado la encapsulación de enzima amilasa con este tipo de cápsulas, añadiendo un recubrimiento con la precipitación de alginato cálcico [92]. En este caso se lleva a cabo la prueba para la encapsulación de otro tipo de enzima, como es la proteasa, ampliamente utilizada en el campo de la formulación de detergentes con contenido enzimático.

2.3.1.1. Caracterización microscopio óptico

Para corroborar la formación de las cápsulas, se lleva a cabo la observación en un microscopio óptico. En la Figura V.66, se pueden distinguir las cápsulas formadas mediante este método. Se aprecia, también, cierta agregación de las cápsulas debido a la preparación de las muestras del microscopio y al cristal protector que se coloca para su visualización en el microscopio que hace que las cápsulas se compacten. En cuanto al tamaño de las cápsulas obtenidas, se tiene cierta variabilidad, situándose entre 10 y 20 μm .

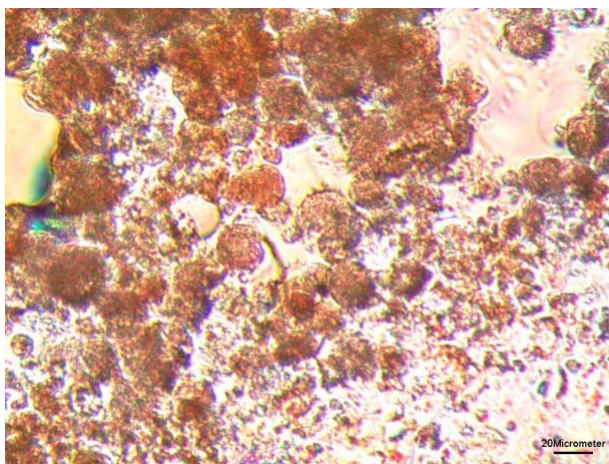


Figura V.66– Imagen de cápsulas de látex mediante microscopio óptico

2.3.1.2. Determinación de la concentración de enzima y ensayo de liberación

Para la medida de la enzima presente durante los ensayos de liberación se siguen dos métodos diferentes, por un lado, se lleva a cabo la determinación de la actividad enzimática mediante el método de la azocaseína y, por otro, la obtención del contenido proteico con el método de BCA. Para ambos métodos se preparan rectas patrón que sirven

de referencia para el cálculo de la concentración de enzima en disolución que se muestran a continuación.

Para el método BCA, se obtiene la recta presentada en la Figura V.67, donde se puede observar la linealidad de la absorbancia con la concentración de enzima hasta 5 g/L.

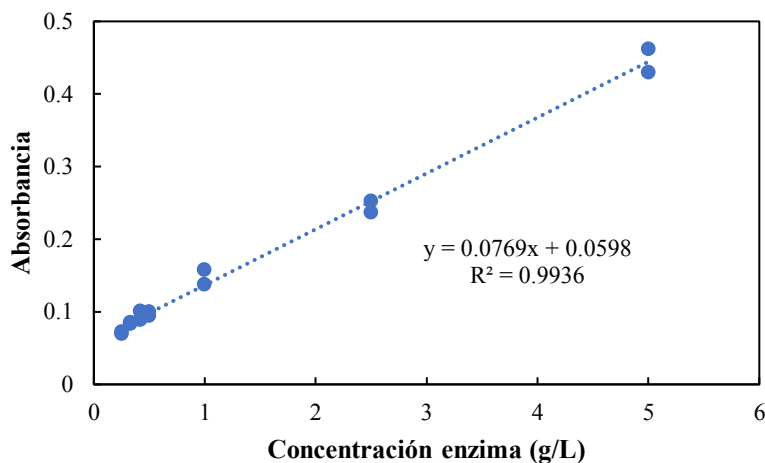


Figura V.67– Recta patrón para la medida de proteasa mediante el método de BCA.

Por otro lado, en la obtención de la actividad de la enzima en disolución, se lleva a cabo un experimento inicial para la determinación de las mejores condiciones para el cálculo de la actividad enzimática. Para ello, se realiza el experimento con diferentes concentraciones de enzima midiendo la variación de la actividad con el tiempo y la temperatura a la que se lleva a cabo la reacción. Así, en la Figura V.68, se presentan los resultados obtenidos para las concentraciones de enzima a diferentes tiempos de reacción a dos temperaturas diferentes, 25°C y 40°C.

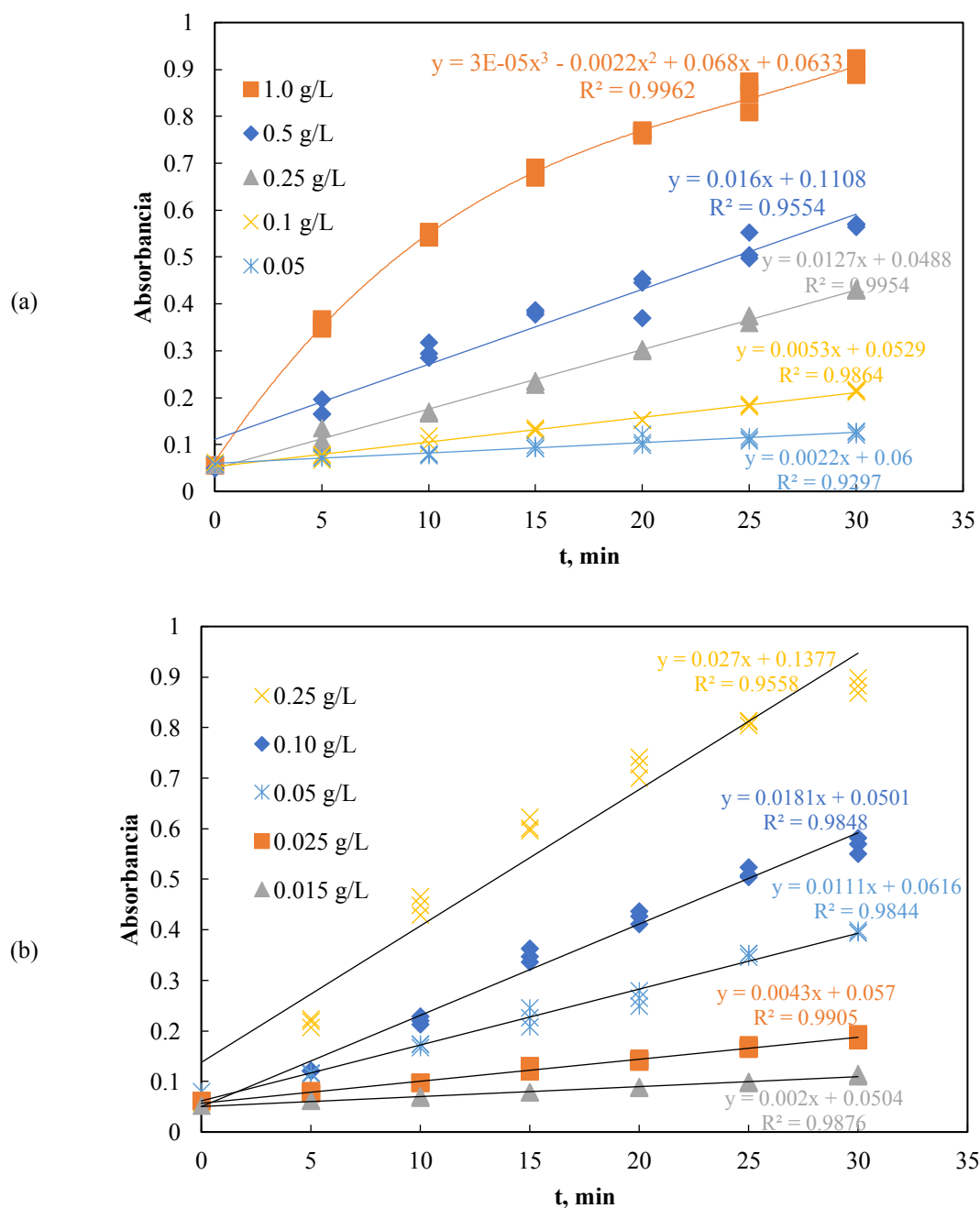


Figura V.68– Ensayo de actividad de proteasa a diferentes concentraciones de enzima y tiempos de reacción a una temperatura de 25°C (a) y 40°C (b)

En casi todos los casos se obtienen ajustes lineales con el tiempo exceptuando las concentraciones de enzima más altas. Con todo esto, se elige la temperatura más baja de ensayo, 25°C, para un tiempo de 15 minutos, linealizando estos resultados se obtiene la recta patrón mostrada en la Figura V.69 con el que se obtiene un r^2 de 0.9985 y que se utiliza para el cálculo de la actividad de enzima en disolución en las determinaciones que se hacen más adelante.

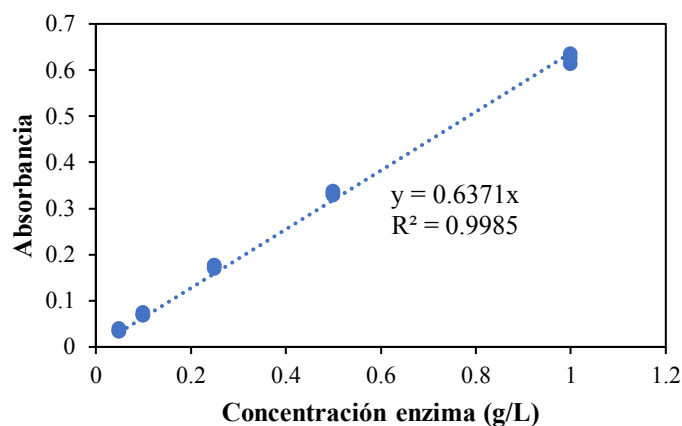


Figura V.69– Recta de ajuste para el ensayo de actividad de la proteasa a 25°C y 15 minutos de reacción.

Ensayos de liberación de enzima.

Para estudiar el comportamiento que tiene la enzima una vez se encuentra en el interior de las cápsulas de látex, se lleva a cabo el ensayo de liberación por dilución de estas en agua.

Se toman dos muestras de la emulsión preparada con proteasa en la fase acuosa de la emulsión, se centrifuga, se retira todo el líquido sobrenadante y se determina la masa de cápsulas obtenidas. Tras esto se preparan para el ensayo de liberación según se describe en la metodología.

En la Figura V.69, se muestra la evolución de la concentración de enzima obtenida con el método de BCA frente al tiempo. Claramente, se observa una muy rápida liberación de la enzima contenida en las cápsulas al inicio del experimento y que transcurridas las primeras 8 horas de experimento se ha liberado la totalidad de la enzima contenida en las cápsulas. A partir de este momento se mantiene estable la concentración de enzima.

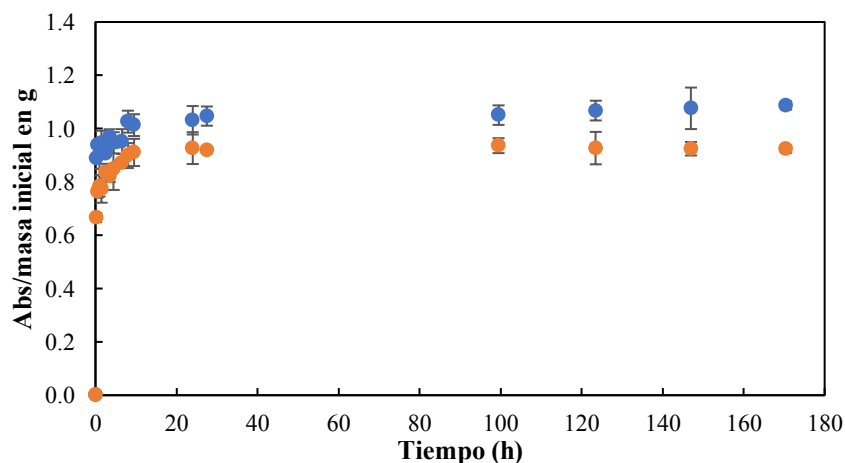


Figura V.70– Liberación por dilución de la proteasa encapsulada en las cápsulas de látex.

Por otro lado, la medida de la actividad enzimática en el mismo experimento, se muestra en la Figura V.70. Se observa igualmente un aumento muy rápido en la actividad de la enzima igual que con la medida mediante BCA. A partir de este punto, tiene a estabilizarse hasta unas 24 horas de experimento, pero a partir de ahí, la enzima tiende a perder actividad en disolución como muestra la medida recogida a las 48 horas desde el inicio del experimento.

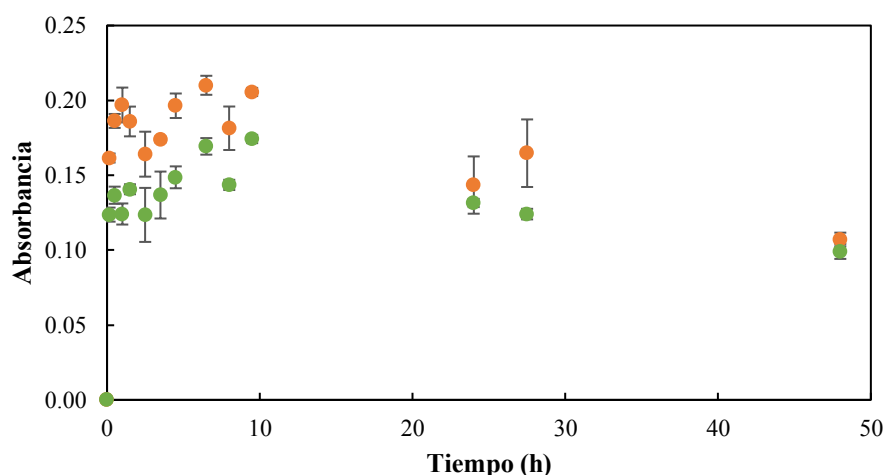


Figura V.71– Medida de la actividad enzimática de la proteasa durante el ensayo de liberación.

Así, queda verificada la encapsulación de la proteasa en las cápsulas de látex, y en el ensayo de liberación se puede determinar la cantidad de enzima que las cápsulas han sido capaces de transportar y liberar. Sin embargo, esta liberación tiene lugar de forma instantánea una vez que las cápsulas formadas se dispersan en agua, este hecho sería interesante si se pudiera llevar a cabo en el momento deseado provocando la liberación mediante otro mecanismo y no únicamente al diluir las cápsulas ya que se requiere que la enzima pudiera ejercer su función de mejorar un proceso de lavado en el momento oportuno con una liberación controlada.

Para este comportamiento, queda claro que únicamente con la adición de alginato sódico en la formación de las cápsulas no es suficiente y se requiere algún recubrimiento extra de las cápsulas para poder retener la enzima durante tiempos más largos. En los apartados siguientes se profundiza en la formación de esta capa de recubrimiento mediante la formación in situ de un recubrimiento metálico. Para la optimización del método se emplea un tinte en vez de la propia enzima para facilitar el manejo y los

métodos de medida, ya que se ha demostrado que tienen un comportamiento similar y permite encontrar las mejores condiciones para formar la capa de recubrimiento y conseguir retener la enzima en el interior de las cápsulas.

2.3.2. Homogeneización de alta intensidad

Alternativamente a la dispersión producida mediante Vortex, se plantea la utilización de homogeneizadores de mayor intensidad como son el Ultraturrax y el agitador Silverson de alta potencia, para comprobar el efecto que tiene en la formación de las cápsulas de látex. La mayor energía transmitida provoca una mayor división de las gotas de agua formadas, dando lugar a tamaños de cápsulas más pequeñas. Este hecho se comprueba en los apartados siguientes.

2.3.2.1. *Homogeneización de látex y alginato con Ultraturrax*

Así, partiendo de la mezcla de látex junto con alginato sódico, en las mismas proporciones que en el método con etanol, se añade CaCl_2 tras la formación de la emulsión y se caracterizan las cápsulas formadas en el siguiente apartado.

2.3.2.1.1. Caracterización de las cápsulas

De la emulsión preparada siguiendo el procedimiento descrito usando las nanopartículas de látex sintetizadas, se toma una muestra siguiendo el procedimiento de lavado para prepararla para ser analizada en SEM. El resultado obtenido se muestra en la Figura V.72. Aunque la densidad de cápsulas formadas no sea muy elevada se puede determinar el tamaño de cápsula obtenido. El tamaño de las cápsulas presentadas es similar al que presentaban las cápsulas obtenidos mediante Vortex, rondando las 20 μm .

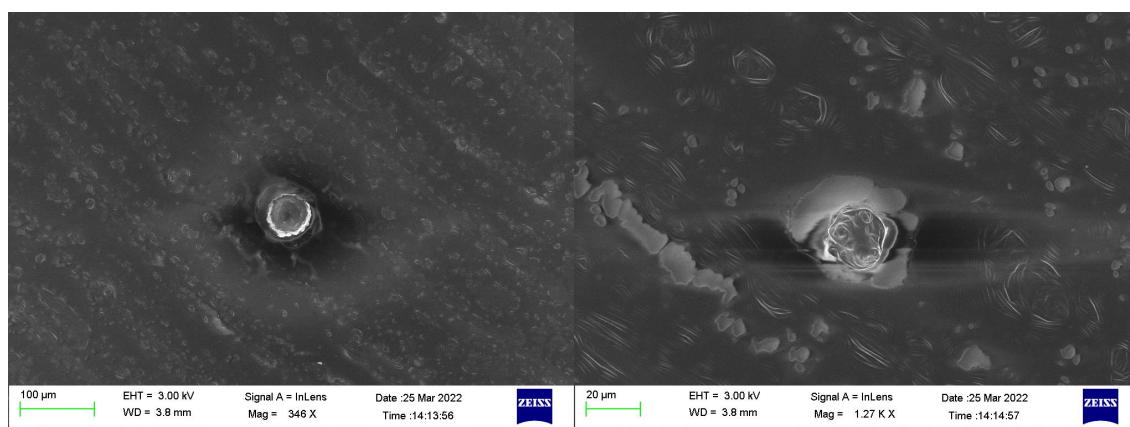


Figura V.72 – Caracterización de las cápsulas de látex y alginato preparadas con Ultraturrax

Igualmente, se sigue el mismo procedimiento con las otras nanopartículas de sílice que habían dado mejores resultados en cuanto a tensión interfacial, las de 104 nm, teniendo valores muy similares a los obtenidos con las nanopartículas sintetizadas, una vez estabilizada la interfase agua-aceite. Sin embargo, los resultados no son buenos, y la muestra es defectuosa cuando se analiza en SEM, no pudiendo proseguir con su caracterización.

2.3.2.2. Cápsulas de látex con Silverson

Alternativamente, se prueba también con un tercer método de homogeneización diferente para la formación de cápsulas empleando las nanopartículas de látex previamente sintetizado, en concreto, con el homogeneizador de alta potencia Silverson. Así, siguiendo el procedimiento descrito en la sección de metodología correspondiente, se preparan cápsulas de látex que son caracterizadas en SEM. En la Figura V.73, se puede observar la morfología de las cápsulas preparadas. A simple vista, se puede distinguir que la forma de las partículas es completamente diferente a la

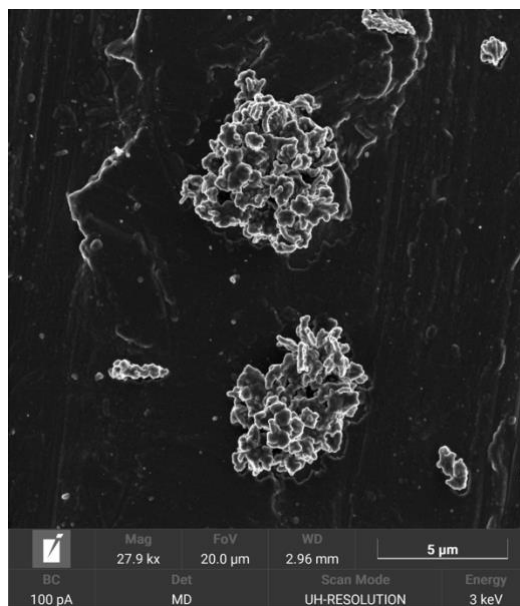


Figura V.73– Imagen obtenida con SEM de las cápsulas de látex formadas con Silverson

obtenida con las partículas de sílice Ludox, donde las cápsulas formadas tenían una forma esférica muy pronunciada. En este caso, se tienen cápsulas amorfas y formadas por la agregaciones de nanopartículas de látex provocadas por la adición de CaCl_2 tras la formación de la emulsión.

Además, el tamaño de las cápsulas formadas es considerablemente inferior, situándose en valores que oscilan las 5 μm . Con la aplicación de una mayor energía durante la formación de la emulsión con el agitador Silverson de alta potencia, se provoca una mayor división en las gotas de la fase acuosa en el seno del aceite de girasol. Posteriormente, al provocar la agregación de las partículas de látex con la adición del cloruro cálcico, se forman agregaciones más pequeñas de partículas, dando lugar a este tamaño más reducido de las cápsulas de látex formadas.

Como ya se ha visto, estas cápsulas son capaces de transportar al compuesto encapsulado en su interior, pero una vez diluidas en agua, se produce una liberación instantánea del mismo. Por tanto, se recurre a la aplicación de un recubrimiento metálico para mejorar la impermeabilidad de las cápsulas obtenidas.

2.3.3. Recubrimiento metálico

Se pretende formar un recubrimiento inorgánico alrededor de las cápsulas para conseguir cápsulas impermeables capaces de retener el compuesto en su interior para ser liberado de forma controlada en el momento deseado mediante la aplicación de algún tipo de energía y no únicamente dispersando las cápsulas en agua.

Para ello, se ensaya la formación *in situ* de una capa metálica provocando la reducción de la sal metálica presente en la disolución acuosa. Se realizan pruebas con sales de plata, AgNO_3 y cobre, CuSO_4 y CuCl_2 , cuyos resultados se analizan en los apartados siguientes.

2.3.3.1. *Recubrimiento metálico con plata*

Una vez preparadas las cápsulas de látex, se diluyen en la disolución acuosa de AgNO_3 y se añade ácido ascórbico para provocar la reducción del metal y su deposición sobre la superficie externa de las cápsulas de látex, dejándolas reaccionar durante el tiempo estipulado. Finalmente se vuelven a centrifugar, retirando toda la fase acuosa sobrenadante y se preparan para SEM dando lugar a las imágenes mostradas en la Figura V.74.

En las dos imágenes se puede ver que se mantiene la forma amorfa de las cápsulas de látex como se obtuvieron en el apartado anterior. Sin embargo, en estas, se pueden observar unos filamentos que se analizan mediante el detector EDS del microscopio a un mayor voltaje para determinar la presencia del metal rodeando las cápsulas. En el espectro obtenido se detecta la presencia de plata con la existencia de picos muy representativos para el metal y, por tanto, se confirma el recubrimiento metálico. La forma del recubrimiento tiene un aspecto muy similar al reportado por Sun et al. [83]. El comportamiento de liberación y la eficacia de encapsulación conseguida se desarrolla en apartados siguientes, mediante un ensayo de liberación y la aplicación de otros mecanismos de liberación.

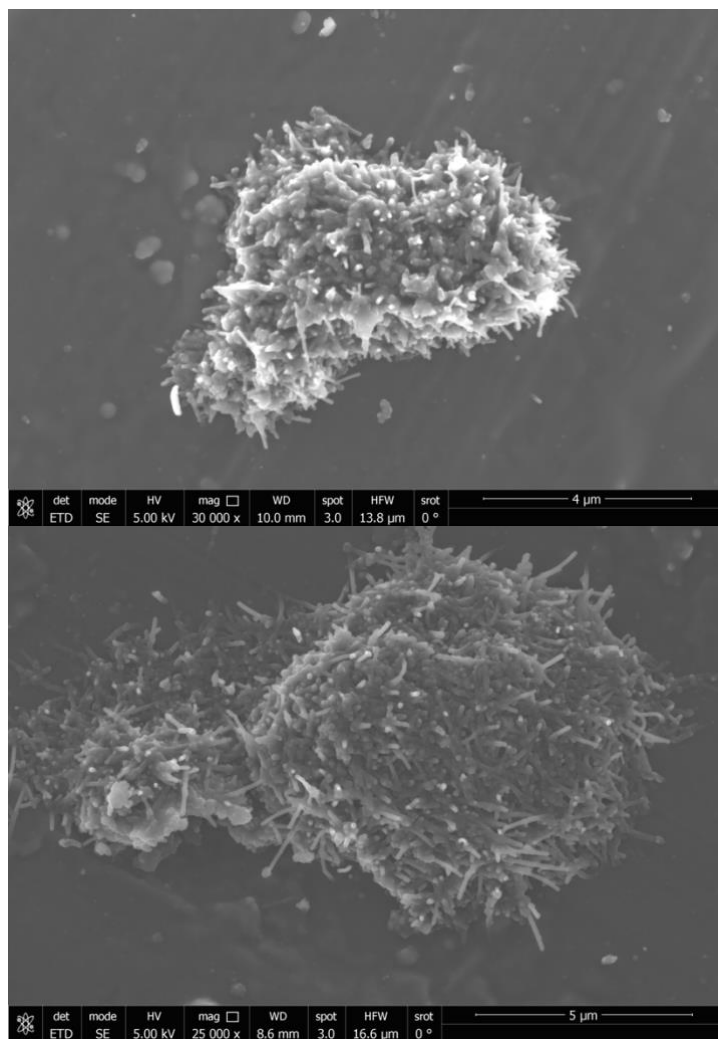


Figura V.74 – Imágenes SEM de las cápsulas formadas con látex y recubrimiento de plata

2.3.3.2. Recubrimiento metálico con cobre

Además de los experimentos llevados a cabo con plata, se ensaya la formación de una capa metálica de cobre. Siguiendo el mismo procedimiento con el que se han obtenido las cápsulas con recubrimiento de plata, se prueba con dos sales diferentes de cobre, CuSO_4 y CuCl_2 . En ambos casos se obtienen resultados similares y, en la Figura V.75, se presentan los resultados empleando CuCl_2 para la formación del recubrimiento. Comparando las dos imágenes, teniendo en cuenta, que el análisis de electrones dispersados es sensible a las variaciones en el número atómico de los elementos de la superficie, y por tanto en la composición. Se observan distintos tonos de gris según el peso atómico, lo que permite diferenciar las partículas metálicas presentes. En la imagen (b) se aprecia claramente que el intento de la formación de la capa metálica no interfiere

en la formación de las cápsulas de látex, pero las partículas metálicas se sitúan en el fondo de la muestra, quedando totalmente apartado de la superficie de las cápsulas de látex formadas.

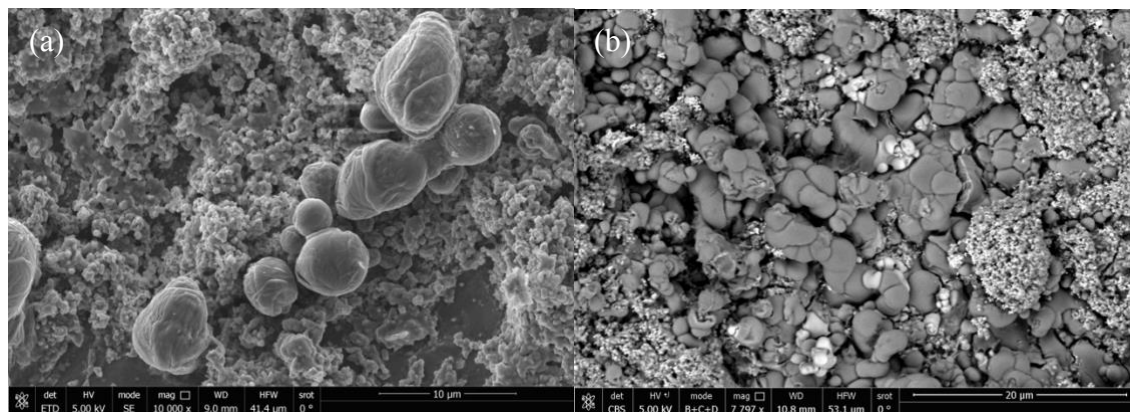


Figura V.75 – Imagen SEM de las cápsulas de látex con intento de recubrimiento de cobre (a) y con el detector de electrones retrodispersados (b)

Como no se consigue la deposición del cobre sobre la superficie de las cápsulas, se altera el orden de adición de los compuestos en el procedimiento anteriormente seguido. Ahora se prueba a añadir la sal de cobre juntamente con el látex en la disolución acuosa antes de la formación de la emulsión.

Una vez formada la emulsión con el agitador Silverson, se toma la muestra y se produce el lavado de la muestra, eliminando todo el sobrenadante y se añade la disolución acuosa de ácido ascórbico para provocar la reducción del metal presente en las cápsulas de látex formadas, dejándolo reaccionar durante 2 horas para asegurar la reacción. Tras esto, se toma una muestra para ser analizada en SEM, presentándose el resultado en la Figura V.76. En la imagen se puede ver una gran densidad de cápsulas formadas con un tamaño de unas 2 μm bastante uniforme en todas las cápsulas presentes y con una forma no esférica y más bien amorfa como se ha ido presentando en la diferentes muestras analizadas de cápsulas de látex.

En este caso, no se observan las partículas metálicas en el fondo de la muestra como en el caso anterior y para comprobar la presencia del metal en la superficie de las cápsulas de látex se recurre al análisis usando la herramienta de EDS del microscopio.

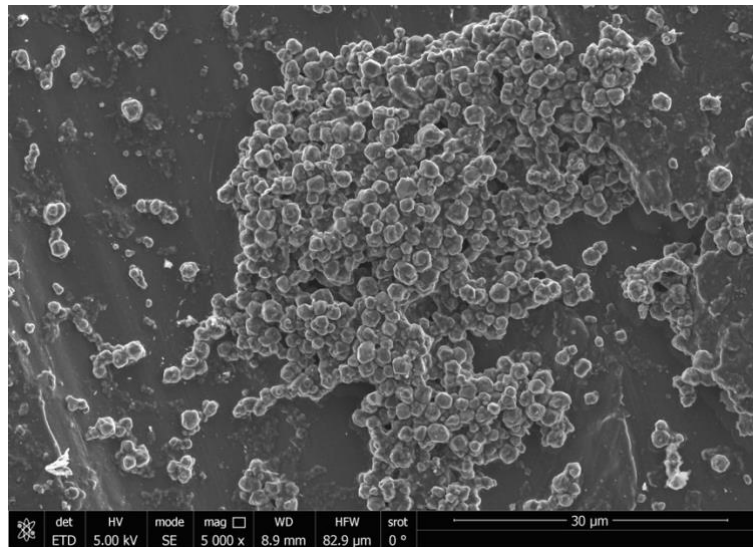


Figura V.76 – Imagen obtenida con SEM de las cápsulas de látex con recubrimiento de cobre

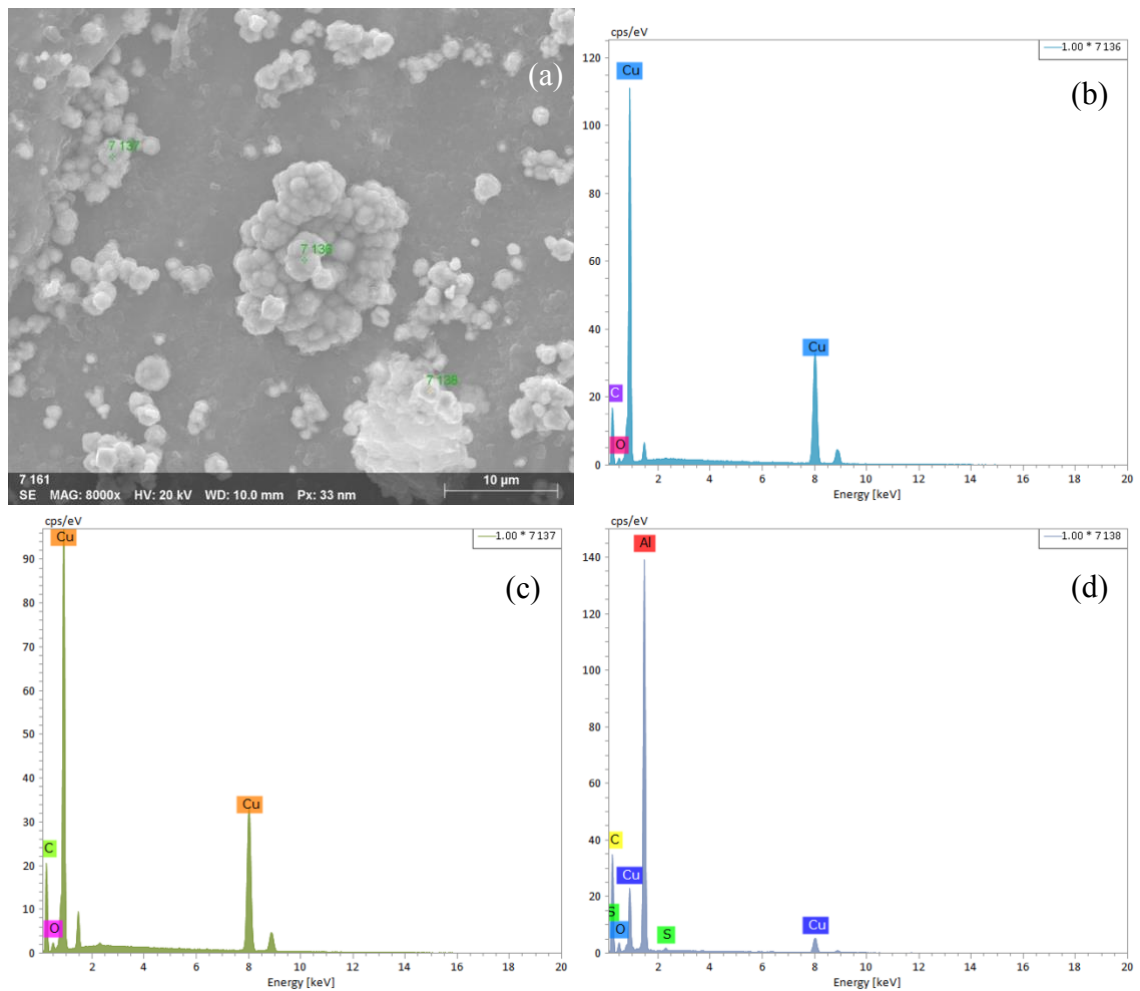


Figura V.77 – Análisis EDS de la muestra de cápsulas de látex con recubrimiento de cobre. (a) Imagen de SEM seleccionada para análisis mediante EDS. (b), (c) y (d) Espectros obtenidos en los puntos indicados en la imagen como 7136, 7137 y 7138 respectivamente

Así, se realiza un espectro con EDS en tres puntos diferentes, sobre la superficie de las cápsulas formadas, de la imagen presente en la Figura V.77. En los tres casos analizados se tiene una notoria presencia de cobre, únicamente siendo menos evidente en uno de los espectros por no haber eliminado el aluminio presente en el portamuestras del microscopio que hace que aparezcan un pico mayor al resto. Por lo tanto, se confirma también la formación de un recubrimiento metálico de cobre para las cápsulas de látex y que, igual que se planteó para las cápsulas con plata, se testea su habilidad para retener a un compuesto activo en su interior y su comportamiento de liberación.

2.3.4. Ensayos de liberación y eficacia de encapsulación

Para comprobar la efectividad de encapsulación del tinte de las cápsulas de látex con recubrimiento metálico, se lleva a cabo un ensayo de liberación de forma análoga a como se realizó para las cápsulas con nanopartículas de sílice Ludox.

De esta forma, se llevan a cabo varias curvas de liberación de diferentes muestras con las que se determina como es la liberación de las cápsulas formadas con nanopartículas de látex. Los casos probados son los siguientes:

1. Ensayo control con el tinte, añadiendo la cantidad máxima de tinte que se podría liberar si no se pierde nada de tinte en los pasos sucesivos y se liberara la totalidad de este.
2. Mezcla de la misma cantidad de tinte empleada para la formación de cápsulas y las partículas de látex sin realizar ninguna modificación extra.
3. Formación de las cápsulas de látex con tinte en su interior
4. Formación de las cápsulas de látex con tinte en su interior y recubrimiento con plata
5. Formación de las cápsulas de látex con tinte en su interior y recubrimiento con cobre

Con la información aportada por cada una de las curvas, se puede determinar la eficacia de encapsulación en cada uno de los casos y la cantidad de tinte que se pierde en el proceso de encapsulación. Los resultados se presentan en la Figura IV.77, en la que a simple vista se pueden distinguir tres tipos de curvas. Los valores representados en el eje de ordenadas se corresponden con los valores de absorbancia divididos por el valor de máxima absorbancia del experimento control con solo tinte, correspondiendo al porcentaje de liberación del experimento con respecto al máximo teórico.

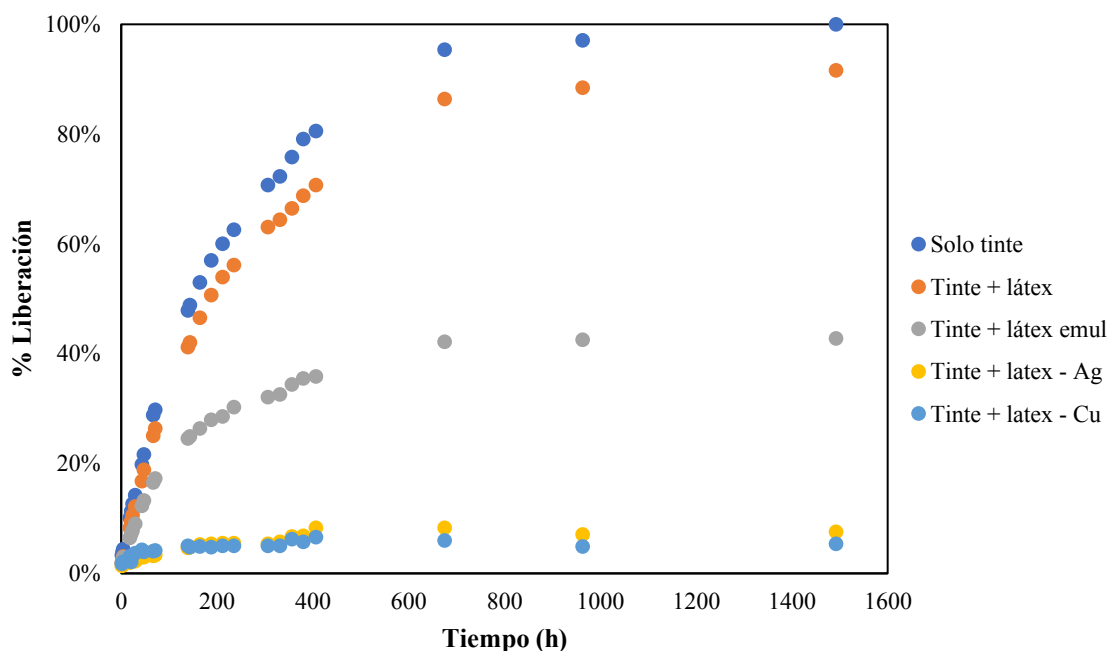


Figura IV.77 – Ensayos de liberación de tinte en diferentes condiciones de encapsulación

Como es normal, las curvas 1 y 2 obtienen los valores más altos de absorbancia. El experimento solo con tinte sirve como referencia para el resto de los experimentos, pudiendo determinarse la pérdida de tinte en el proceso de encapsulación y el porcentaje de tinte liberado en cada instante. Un poco por debajo, por encima del 91%, se sitúa la curva del tinte mezclado con las nanopartículas de sílice que podría deberse a una pequeña adsorción de tinte por parte de las nanopartículas de sílice que se descartan con la realización de experimentos paralelos con los que se confirma la no adsorción del tinte sobre la superficie de las nanopartículas de látex. Por tanto, la diferencia obtenida se puede deber a algún pequeño fallo experimental a la hora de la preparación de la muestra.

En el siguiente nivel, se encuentra la curva de liberación de tinte cuando se lleva a cabo la encapsulación en las nanopartículas de látex sin ningún tipo de recubrimiento. Con la formación de las cápsulas permeables de látex y considerando que todo el tinte contenido en las cápsulas se libera en el ensayo con la dilución de las cápsulas en agua, se determina que la eficacia de encapsulación es ligeramente superior al 40%, por lo que la diferencia de tinte con el experimento control, el 60%, se pierde en el proceso de emulsificación, formación de las cápsulas y posterior separación de estas. Este valor está en concordancia con los resultados obtenidos en otras investigaciones del mismo tipo [92,93].

Por último, en la parte más baja de la gráfica, se encuentran los ensayos de liberación de tinte con recubrimiento metálico de cobre y plata, que obtienen unos

porcentajes de liberación, respecto al experimento control, del 5 y el 7% respectivamente. Si se compara con el experimento anterior de encapsulación del tinte con la formación de las cápsulas de látex, se obtienen unos porcentajes de liberación del 12 y 18%, que siguen siendo bajos y podría considerarse que se tratan de cápsulas impermeables que no dejan escapar el tinte retenido en su interior y únicamente pasa a la disolución acuosa aquel que se encuentra en la zona más superficial de las cápsulas.

Sin embargo, para corroborar que se dispone de una cantidad mayor de tinte en el interior de las cápsulas, se tiene que recurrir a la aplicación de otro tipo de esfuerzos con los que se consiga romper el recubrimiento formado en las cápsulas y permitir que se libere el tinte retenido en el interior de las cápsulas.

2.3.5. Liberación por otros mecanismos

Para provocar la liberación del supuesto tinte retenido en el interior de las cápsulas de látex con recubrimiento metálico y verificar si se ha conseguido el objetivo deseado de mantenerlo en el interior de las cápsulas hasta el momento en el que se quiera provocar su liberación. Se prueban los tres mecanismos adicionales que se emplearon para la liberación del tinte del interior de las cápsulas de sílice Ludox: aplicación de un esfuerzo cortante con el empleo de un reómetro, adición de ácido y aplicación de ultrasonidos.

Con el reómetro se realiza primero un experimento control, solo con cápsulas de látex formada con tinte en su interior, que sirve como referencia para determinar la eficacia de encapsulación de las cápsulas con recubrimiento metálico, este valor constituirá la máxima cantidad de tinte que podría ser encapsulada por las cápsulas con recubrimiento y se calcula el porcentaje de tinte liberado en función de este valor.

Se prueba a tres velocidades de giro diferentes en el reómetro de forma ascendente, 200, 400 y 600 s⁻¹, y se toman muestras del líquido para medir en el espectrofotómetro tras finalizar el experimento a cada frecuencia de giro para determinar su eficacia de liberación. Los resultados de porcentaje de liberación obtenidos son muy similares a los obtenidos en los ensayos de liberación tanto para las cápsulas con plata como con cobre, lo que quiere decir que no se consigue romper la capa externa de recubrimiento de las cápsulas y solo se libera el tinte superficial de la misma forma que ocurría en el ensayo de liberación por dilución.

Mediante la adición de ácido nítrico al 1%v, se pretende romper la carcasa metálica creada alrededor de la superficie de las cápsulas, sin embargo, nuevamente se obtienen valores similares a los obtenidos en la liberación por dilución y con el reómetro, por lo que la adición de ácido tampoco sirve como mecanismo para la ruptura de las cápsulas y liberación del tinte que hubiera retenido en su interior.

Por último, se prueba con la aplicación de ultrasonidos a la muestra de cápsulas para originar la ruptura de la pared y liberación del tinte. Con los resultados obtenidos, se vuelve a demostrar que es el mecanismo de liberación con el que se consigue la ruptura de la capa de recubrimiento de las cápsulas y una mayor liberación desde el interior de estas. Así, una vez aplicados los ultrasonidos a las muestras de cápsulas con plata y cobre y tomada la muestra para medir en espectrofotómetro para determinar el porcentaje de liberación desde las cápsulas, se obtiene una liberación de casi el 75% para las cápsulas con plata y de casi un 50% con las que se recubren con cobre, porcentaje calculado sobre la cantidad máxima de tinte que las cápsulas son capaces de retener en su proceso de formación.

De esta forma se demuestra que aparte de la impermeabilidad mostrada durante el ensayo de liberación, las cápsulas de látex con recubrimiento de cobre y plata retienen una gran cantidad de tinte en su interior que puede ser liberado en una etapa posterior de forma controlada, habiendo realizado con éxito con la aplicación de ultrasonidos.

2.3.6. Sinergia del recubrimiento metálico

Una vez se ha comprobado que con el procedimiento seguido se consigue la formación de cápsulas impermeables que permiten retener el tinte en su interior y solamente liberarlo cuando se le aplica un esfuerzo en forma de ultrasonidos, se pueden mencionar el resto de las ventajas que se obtendrían con las cápsulas formadas, entre ellas, el aprovechamiento de las propiedades de los metales elegidos para el recubrimiento.

Por todo lo indicado en la introducción, el uso de la plata y el cobre como potenciador de los efectos antimicrobianos de las cápsulas formadas está bien justificado para su inclusión en una gran variedad de detergentes, incluidos los detergentes para ropa, los detergentes para platos y los detergentes para la limpieza del hogar está ampliamente justificado y se puede aprovechar juntamente con los aditivos incluidos en el interior de las cápsulas. La idea sería aprovechar en primera instancia el efecto del recubrimiento de las cápsulas con la presencia de los metales y su carácter biocida y, en segundo lugar, una

vez provocada la liberación desde el núcleo del compuesto encapsulado para que este desarrolle su función.

2.4. Conclusiones

Así pues, una vez optimizado el método de formación de las cápsulas y su recubrimiento con el empleo del tinte para la determinación del comportamiento de las cápsulas en las diferentes situaciones probadas, se procedería a la encapsulación de enzimas, que ya se demostró que se comportaban de forma similar que el tinte, o de cualquier otro compuesto que se considere útil en el campo de aplicación del estudio, como es la formulación de detergentes. Por tanto, junto con las propiedades y aplicaciones que les aporta el compuesto elegido para su encapsulación, las cápsulas formadas pueden aprovechar las propiedades de los metales del recubrimiento mencionadas en el apartado anterior, consiguiendo un doble efecto, actuando primero el metal situado en el exterior de las cápsulas cubriendo toda su superficie y, posteriormente, en el momento deseado mediante la aplicación de ultrasonidos. Se ha demostrado también que las cápsulas son resistentes en medios ácidos y que los esfuerzos cortantes tampoco son capaces de provocar la ruptura de las cápsulas para la liberación del compuesto encapsulado.

3. Chitosan – Arabic Gum experimentation

3.1. Objective

The aim of this research was to investigate the synergy of the properties of these two biopolymers in the production of mixed nanoparticles with enhanced properties, efficiently contributing to the stabilization of O/W Pickering emulsions [94,95], which are universally applied in the pharmacology, biomedicine, and food industries. In addition, Pickering emulsions can also be elaborately designed to improve the stability of bioactive substances [92].

The formation of the hybrid particles is accomplished through complex coacervation [96]. This is a phase separation phenomenon that occurs when two oppositely charged macromolecules interact in a solution to form a dense coacervate-rich phase and a dilute supernatant-rich phase. Thus, when chitosan and Arabic gum are mixed in a solution, they undergo complex coacervation due to their opposite charges. Chitosan's amino groups and Arabic gum's carboxylate groups are electrostatically

attracted to form coacervate complexes [97]. These complexes have been used in many different applications, such as the adsorption of heavy metals [98], in medicine [99–101] or agriculture [102,103]. However, their primary application lies in serving as carriers or encapsulating agents for active substances, multiplying their use in several industries. Some examples include their use as carriers of antibiofilm agents [104], antioxidants [105], nanoencapsulation drugs [106], or, as was the purpose of this study, encapsulating essential oils[107,108].

The objective of this study was to obtain environmentally friendly OEO capsules made from chitosan and gum Arabic nanoparticles through optimization of the emulsion conditions, and to examine their contributions to different detergent formulations. Thus, the most important parameters, such as particle size, contact angle, and interfacial tension, can be managed to achieve the optimal conditions for producing chitosan–Arabic gum (CS–GA) capsules. The selection of the most favorable conditions could influence the formation of the emulsion and, consequently, the subsequent acquisition of capsules via spray drying atomization.

3.2. Formation of CS-GA nanoparticles and zeta potential

The positive charge of chitosan (in an acid medium) [109–111] and the negative charge of Arabic gum (across almost the entire range of pH) [112] was clearly demonstrated.

On the one hand, at a low pH, chitosan was rich in protonated amino groups, which led to a positive zeta potential. Then, with the automatic addition of diluted NaOH, the pH increased, and the zeta potential started decreasing because of the deprotonation of the amino groups of chitosan. From a pH slightly above 7, the zeta potential became approximately 0 and remained practically constant (Figure 1), in accordance with the literature [113].

On the other hand, Arabic gum, an anionic polysaccharide, showed a negative zeta potential throughout the entire range of pH evaluated due to the dissociation of the carboxyl groups present in its structure [114,115].

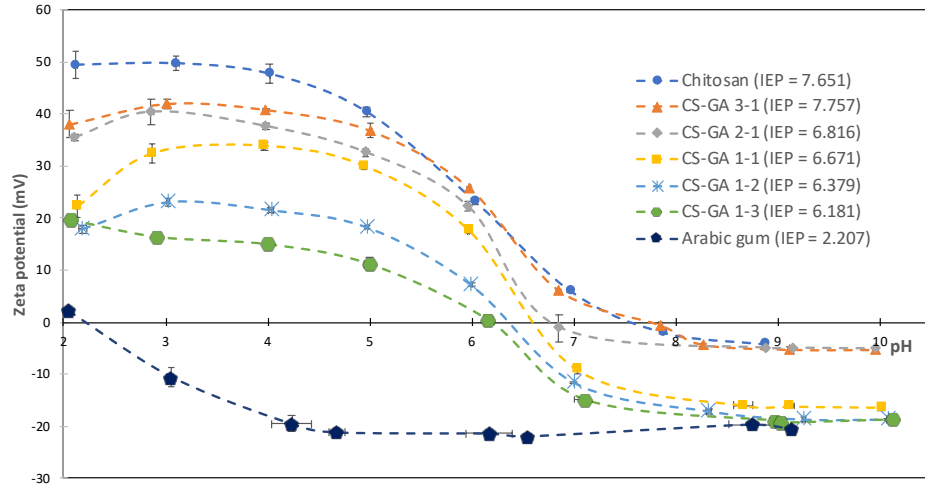


Figure V.78 – Titration curves of chitosan, Arabic gum, and CS-GA complexes

With the presence of acetic acid in the chitosan solution, there was a pH lower than 6, and the formation of the CS–GA complexes was more favorable; the difference between the values of zeta potential was greater, and their surfaces charges were the opposite and had a greater electrostatic attraction.

The CS–GA complexes showed an intermediate behavior between the two starting polymers, confirming the electrostatic interactions of the chitosan's amino groups and the Arabic gum's carboxylic groups. The trend was clear; the curves progressed from the values of chitosan to those of Arabic gum as the ratio of Arabic gum in the nanoparticles increased. The positive zeta potential of chitosan prevailed in the most acidic pH, especially at the CS–GA ratios of 3–1, 2–1, and 1–1, in which the measured values were greater than 30 mV; therefore, they were very stable suspensions. The CS–GA 1–2 suspension obtained a slightly lower zeta potential, but it was still at the value of around 20 mV in this pH range; therefore, the suspension was still stable. Lastly, the CS–GA 1–3 was the most unstable suspension; a greater proportion of Arabic gum worsened the stability of the particles at an acidic pH.

The same behavior was observed for the isoelectric point (IEP). When the amount of Arabic gum increased, the IEP decreased. The lowest value was obtained for Arabic gum at a pH of 2.21, in accordance with the literature [116]. Then the IEP increased in the pH range from 6 to 7, in the order of CS–GA 1–3, 1–2, 1–1, and 2–1, in the same way that the proportion of chitosan increased. The highest results for the IEP were obtained for CS–GA 3–1 and chitosan, with a similar value for both at a pH of around 7.7; similar results were obtained in the literature for chitosan [113,117,118].

3.3. Particle size

In addition to the zeta potential, size is another fundamental parameter for understanding the movement that the particles make when emulsions are formed. The mobility of the particles is more limited when their size is larger, so particles that are not too large move rapidly towards the interface. This is justified by the Stokes model showed in Equation (18) with which the Zetasizer calculates the diameter from the measurement of the diffusion coefficient.

In addition, the migration speed of the particles towards the interface was influenced by the interfacial tension, which will be discussed in the next section.

The samples of chitosan, Arabic gum, and mixtures with different ratios of the last two were measured. Each of the analyzed samples was prepared at a concentration of 2% wt, although for the measurement in the Zetasizer, the original solution was diluted 10 times.

From Table V.3, it can be observed that the smallest particles in aqueous solution were Arabic gum nanoparticles (6.3 nm), which can be explained by the high solubility shown by Arabic gum in this study. In the case of chitosan, the value obtained under the conditions of measurement was 123.7 nm, 20 times higher than Arabic gum.

Table V.3 – Particles sizes for different polymer (CS-GA) ratios

Polymer Ratio	Size, nm	Std. Dev., nm
CS	123.7	±4.0
3–1	269.5	±5.6
2–1	256.2	±2.7
1–1	237.1	±3.8
1–2	257.4	±1.7
1–3	134.6	±4.5
GA	6.3	±0.6

For the intermediate complexes, in all cases, larger particles were obtained, thus confirming the formation of hybrid particles via the complex coacervation of chitosan

and Arabic gum. The compounds that were richer in chitosan achieved larger particle sizes.

3.4. Contact angle

The formation of emulsions is favored by the presence of particles with intermediate wettability at the interface, i.e., with a contact angle close to 90° , evidencing a similar affinity for both phases. Figure V.79 presents the contact angles of nanoparticles with different polymer ratios.

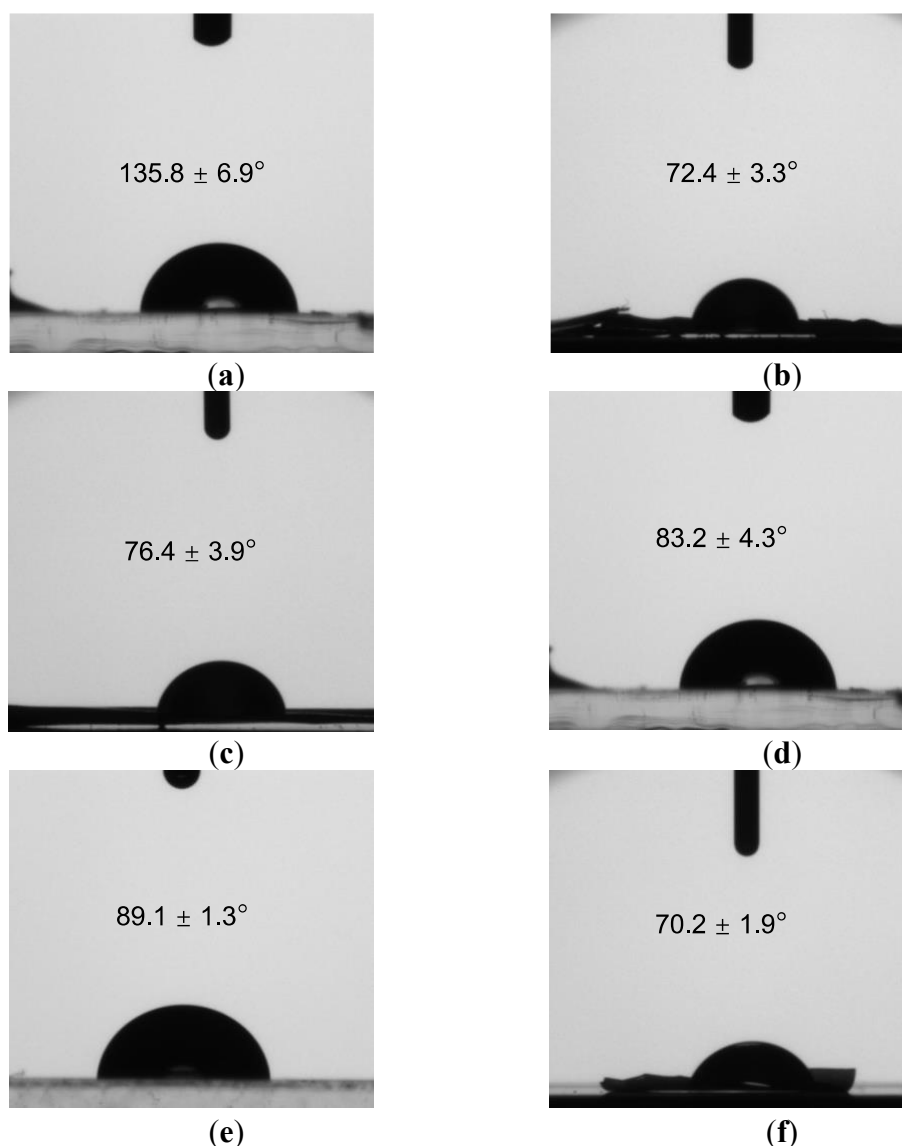


Figure V.79 – Contact angles for different nanoparticle compositions. (a) Chitosan; (b) CS-GA 3-1; (c) CS-GA 2-1; (d) CS-GA 1-1; (e) CS-GA 1-2; (f) Arabic Gum.

The contact angle of chitosan indicates its hydrophobic character [97]. As the zeta potential measurements showed, at a neutral pH, chitosan is insoluble, and this explains the obtained value of the contact angle.

Conversely, for gum Arabic, the contact angle of 70.2° indicated its greater hydrophilic nature; once the drop was deposited on the layer of gum Arabic particles, it was quickly diluted, and hence a lower contact angle was obtained.

In the remaining cases, with polymer mixtures at various ratios, contact angles of intermediate wettability were obtained, exhibiting a behavior that was contrary to that observed with isolated polymers; particles with a higher percentage of chitosan displayed more hydrophobic values, and vice versa.

For the formation of O/W Pickering emulsions, particles with a similar affinity for both phases are required, but with a slight hydrophilic character. The interface will curve, forming the phase in which the particles possess a greater surface area, namely the external phase of the emulsion [119].

For this reason, the most optimal particles for the formation of emulsions, considering the results obtained for the contact angle, were the CS–GA 1–2 nanoparticles, which exhibited a contact angle of 89.1° , just slightly below 90° . These particles demonstrated a slightly higher affinity for the aqueous phase and are therefore ideal for the formation and stabilization of O/W Pickering emulsions.

3.5. Interfacial tension

For the interfacial tension, γ_{ow} , the measurements are significant because they enable an understanding of how the particles migrate from the bulk of the aqueous solution to the interface. The closer the values are to zero, the less energy is required to disperse the internal phase and form the emulsion. The particles move to the interface, reducing the interfacial tension and facilitating stabilization of the emulsion.

The behavior of CS–GA nanoparticles at the interface can be modified in various ways. On the one hand, higher concentrations of nanoparticles in the aqueous solution normally yield lower values of interfacial tension [120]; a minimum number of particles is necessary to form a thin layer around the dispersed phase of the emulsion, avoiding the coalescence of the oil drops.

On the other hand, the polymer ratio (the chitosan–Arabic gum ratio) also affects the interfacial tension in the equilibrium value and imparts distinct behaviors to particles at the interface. Depending on the resulting final structure, they will exhibit greater or

lesser ease in moving towards the interface, reducing the interfacial tension, and facilitating the formation of stable Pickering emulsions.

The lowest value was obtained with a ratio of 1–2, which improved on the results obtained for 1–1 and 1–3.

3.5.1. Influence of nanoparticles concentration

To study the effect of particle concentrations on the values of interfacial tension, experiments were carried out using the CS–GA 1–2 particles, which obtained better results in the previous sections. Aqueous solutions of CS–GA nanoparticles ranging from 0.1% wt to 3% wt were used.

The experiments were conducted with a duration of 25 min, a sufficient time for the surface tension value to have stabilized, as observed in Figure V.80. All of them were performed in triplicate.

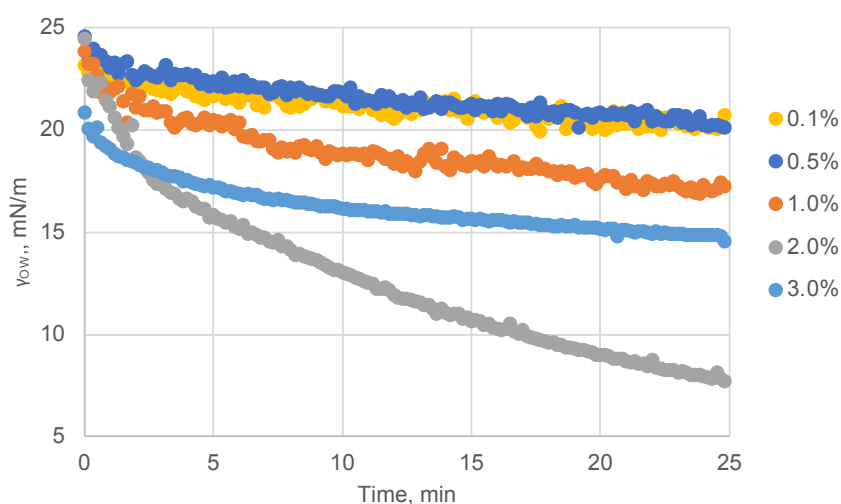


Figure V.80 – Measurements of interfacial tension over time for different concentration (%wt) of CS-GA 1-2 nanoparticles

In general, the particle concentration had a positive effect on reducing the interfacial tension at the water–oil interface. Figure V.80 shows the evolution of the interfacial tension over the studied period. In all the curves, either a more or less marked decrease in the interfacial tension from the initial value was observed.

As expected, increasing the concentration led to a decrease in the equilibrium value of γ_{ow} . However, at the highest tested concentration (3% wt), the effect was not the same due to the increased solution viscosity and particle saturation in the aqueous solution, hindering the particles' movement and not contributing to the rapid migration of particles

to the interface. As a result, the achieved value was not improved compared with the 2% wt solution. Therefore, using a concentration of 2% wt was the optimal choice for forming Pickering emulsions.

3.5.2. Influence of polymer ratio

To study the effect of the polymer ratio, experiments were carried out using 2% wt particle solutions with different polymer ratios (Figure V.81), which obtained the optimum results in the concentration study.

According to the results (Table V.4), the lowest values were obtained by the chitosan particles ($\gamma_{ow} = 2.89$), and these results aligned with the assumptions of the contact angle and particle size experiments. The chitosan particles achieved the highest contact angle, indicating a more hydrophobic character and a greater tendency to migrate towards the organic phase. Additionally, they were also the largest particles, which, due to gravity, tended to descend towards the oil phase, further enhancing this observed behavior. Hence, if we solely focused on the values of interfacial tension, these particles would seem to be the most optimal for stabilization of the emulsion. However, it has been demonstrated that this is not the case.

Table V.4 – Interfacial results for nanoparticles with different polymer ratios

Polymer Ratio	γ_{ow-MIN}, mN/m	Std. Dev., mN/m
CS	2.89	± 0.14
3–1	4.39	± 0.34
2–1	5.88	± 0.29
1–1	10.82	± 0.28
1–2	7.72	± 0.17
1–3	17.68	± 0.09
GA	13.13	± 0.52

A similar behavior was observed in the CS–GA particles that had a higher proportion of chitosan. Likewise, the contact angles deviated from 90° , but in this case, they had a more hydrophilic character, remaining within the internal part of the aqueous phase without positioning themselves at the interface and not promoting the stabilization of the O/W emulsion.

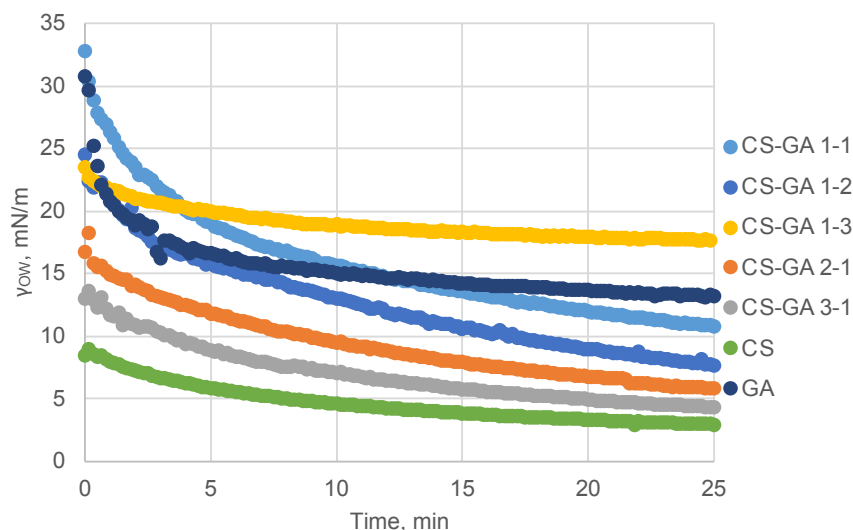


Figure V.81 – Interfacial tension values obtained for different CS–GA polymer ratio.

As for the particles with a higher proportion of Arabic gum, they attained higher values of equilibrium interfacial tension and exhibited a hydrophilic character.

Finally, the value achieved by the CS–GA 1–2 particles, which exhibited the best contact angle result, also yielded a relatively low value of interfacial tension. This indicated that these particles tended to migrate towards the interface, wrapping the oil droplets and consequently, contributing to the stabilization of the emulsion.

Thus, if we compare the overall results of the characterization studies of the different particles, the CS–GA 1–2 nanoparticles were the best option for forming O/W Pickering emulsions and were chosen to conduct the subsequent experiments for the encapsulation of oregano essential oil.

3.6. Biodegradability test

GA is a natural plant polysaccharide, the oldest in use by humankind. Its use began around 5000 years ago [121]. The physicochemical and functional properties of GA may vary significantly depending on its source. Prasad et al. [122] conducted a review of the recent research on the production, processing, properties, application, and marketing of GA. The unique properties possessed by GA make it ideal for different industrial applications. Specifically, encapsulation has found a wide range of applications, in both the pharmaceutical and food industries. GA has been used as wall material for the encapsulation of essential oils using the coacervation technique [123] and isoflavones [124]. The extensive use of GA as a material for these purposes is due to its natural origin and, consequently, its biodegradable characteristics. In fact, Prasad et al. [122] described

GA as biocompatible and biodegradable, and its source is renewable [125]. However, there are no data in the literature regarding the biodegradability of GA.

We tested the biodegradability of GA (Figure V.82 (a)) and found a biodegradation lower than 60%. Angelo et al. [48] studied the biodegradability of CS and found a final biodegradation of 59.9%. The addition of chitosan significantly increased the biodegradation of GA, making it more useful as a material for encapsulation (Figure V.82 (b)). Furthermore, the properties for the formation of Pickering emulsions were also enhanced.

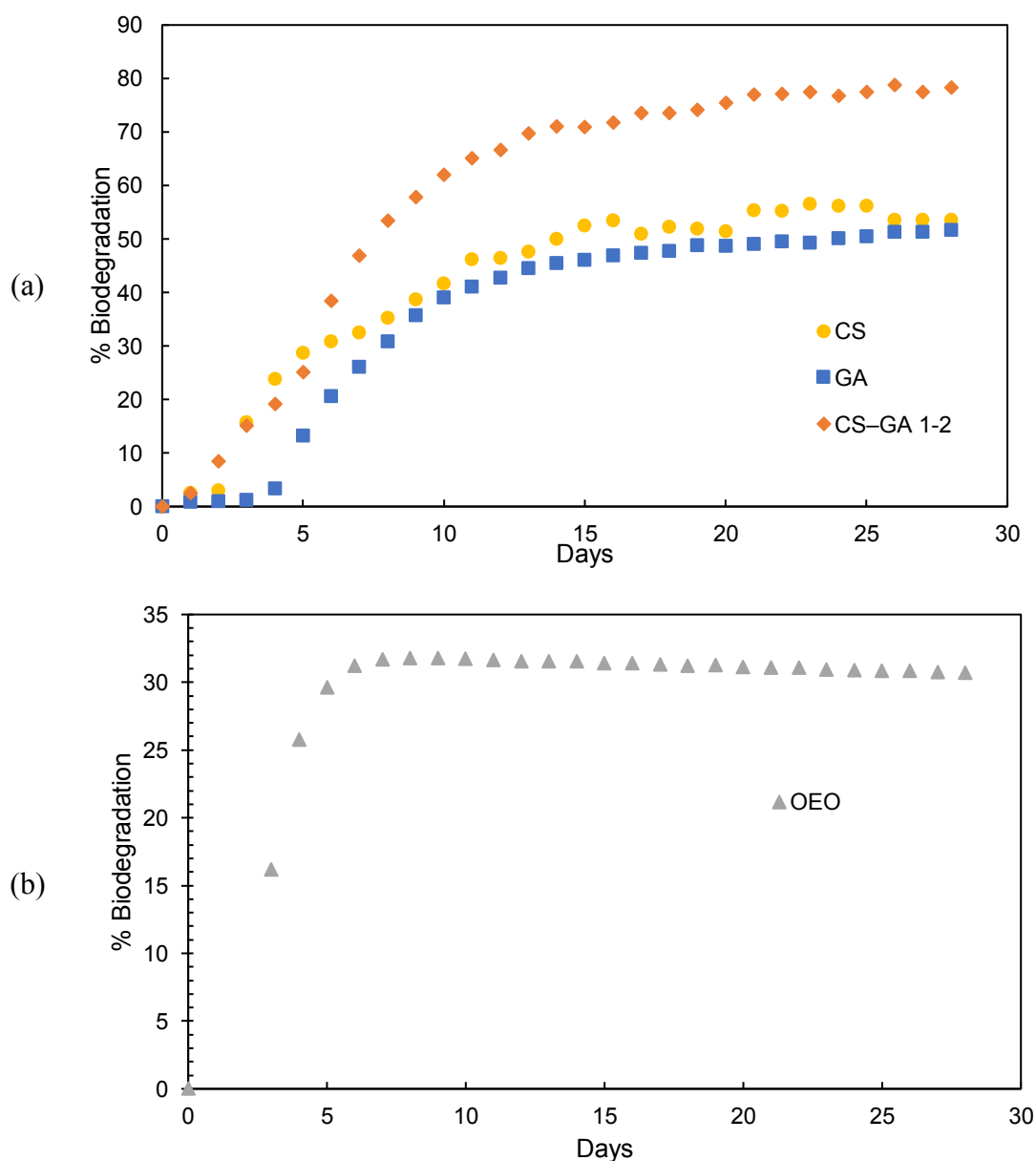


Figure V.82 – Biodegradability test curves for (a) CS, GA and CS-GA 1-2, and (b) OEO

The biocidal capacity of oregano essential oil has been extensively demonstrated and reported in the literature, having been applied for a wide range of uses.

Bayramoglu [126] showed that the essential oil of oregano had much stronger bactericidal activity than a commercial bactericide and fennel oil, making it useful in the leather industry. Eltai et al. [127] studied the efficacy of oregano oil as a biocide agent, measuring the reduction of genetically modified bioluminescent bacteria and yeast (*E. coli*, *P. aeruginosa*, and *S. aureus*). Gatti et al. [69] evaluated the biocidal activity of selected EOs against fungal and bacterial collections, and they concluded that oregano EO may be applied in the conservation of oil paintings, as it may potentially inhibit the growth of oil paintings' biodeteriogens.

The synergy between the two biopolymers improves the biodegradability of the compounds separately.

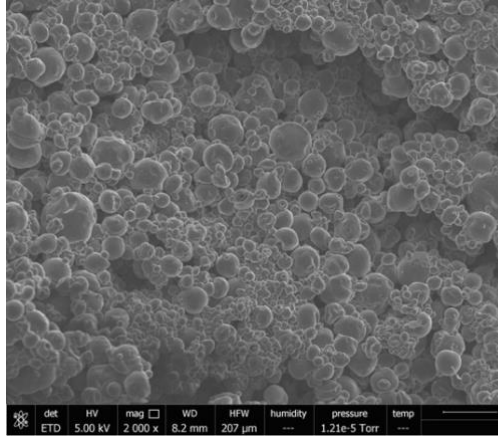
3.7. Encapsulación

Buchi experiments for two very different concentrations of OEO were carried out following the method described above. OEO emulsions of 10% wt and 0.5% wt were prepared to test how the concentration of oil influenced the formation of capsules.

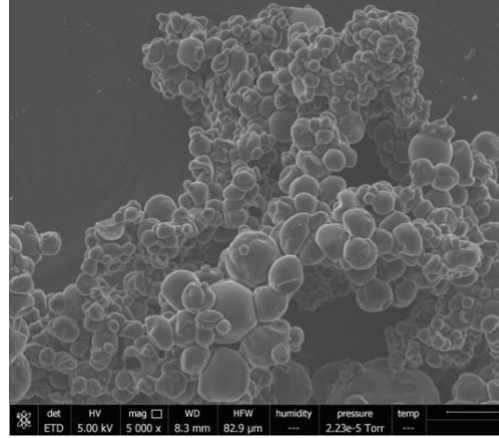
3.7.1. Characterization of formed capsules

By using the images captured with SEM (Figure V.83), it was possible to ascertain the size and morphology of the capsules formed with each concentration of OEO.

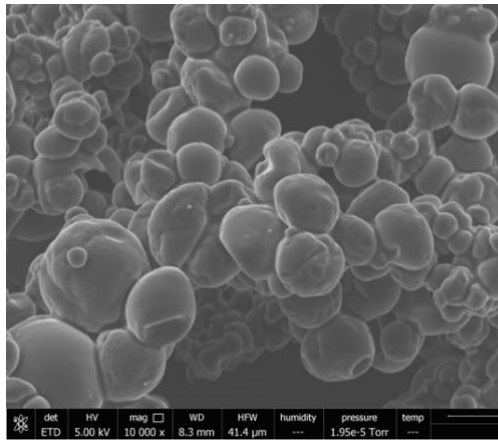
Morphologically, both concentrations showed very similar appearances. Capsules tended to remain and form some aggregations; this could have been favored due to the deposition of the capsules on adhesive carbon tape.



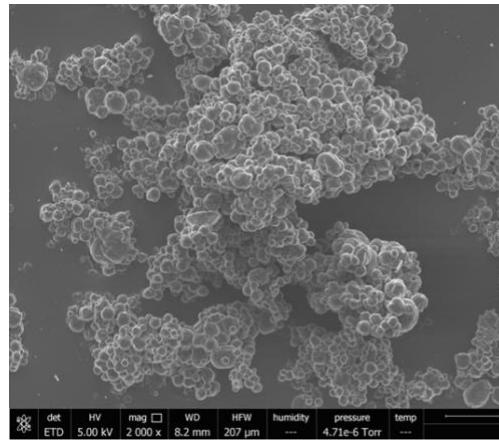
(a)



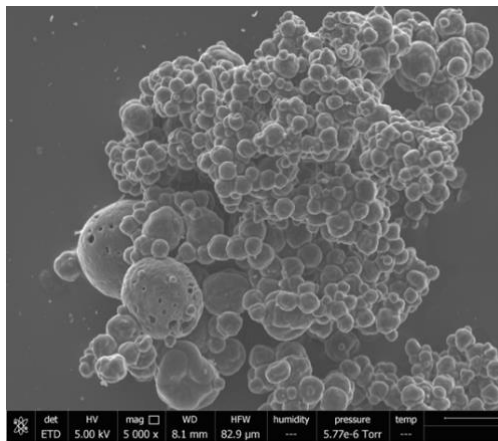
(b)



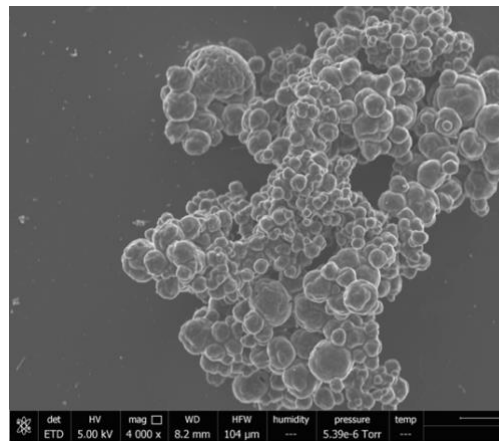
(c)



(d)



(e)



(f)

Figure V.83 – SEM images of the formed capsules: (a–c) 10% wt OEO and (d–f) 0.5% wt OEO. The horizontal field widths (HFWs) were (a) 207 μm , (b) 82.9 μm , (c) 41.4 μm , (d) 207 μm , (e) 82.9 μm , and (f) 104 μm . Scale bar indicates (a,d) 50 μm , (b,e,f) 20 μm , and (c), 10 μm

By adjusting the particles' diameter with Equation (17) to the BEST model described above, optimized parameters were achieved for both concentrations of OEO

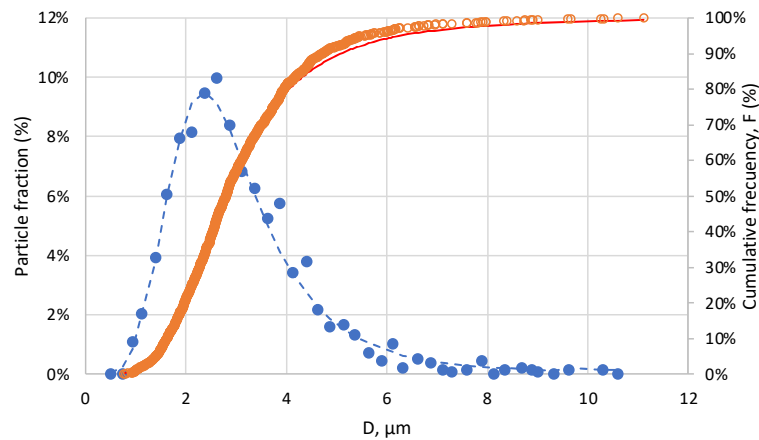
(Table V.5). As observed in the SEM images, both exhibited very similar parameters, resulting in a narrower distribution for particles with 10% OEO compared with those with 5% OEO. The latter showed slightly more variation in particle size.

Table V.5 – Optimized parameters for the BEST model, Equation (17)

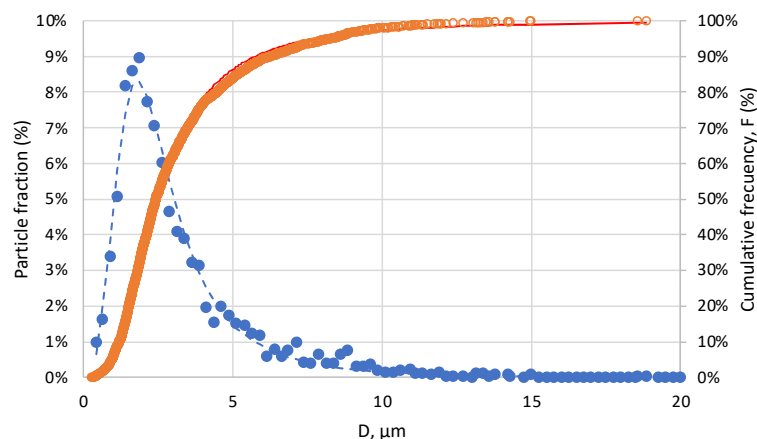
%v OEO	N	M	D _g , μm
0.5%	3.51	1.41	2.45
10%	2.47	1.45	2.02

The greatest difference was observed in the D_g values, which provide an indication of most of the particles. A comparison of the values revealed that D₅₀ = 2.79 μm for 0.5%v and D₅₀ = 2.45 μm for 10%v, with the width of the distribution being 1.23 μm and 1.86 μm, respectively, which signified a smaller size and less dispersion for particles with a higher concentration of oil, likely attributed to the potential aggregation of oil droplets during emulsification due to excess oil. The particles could not involve the aggregated droplets, and the surface oil increased after spray drying. shows particle size distributions for each concentration of OEO, where the lines correspond to the fit achieved using the BEST model.

Therefore, it is evident that the concentration of oil used in the preparation of the emulsion did not contribute significantly to the morphology and size of the capsules formed.



(a)



(b)

Figure V.84 - Adjustments to the BEST model and distributions of particle diameter: (a) 0.5%v OEO and (b) 10%v OEO. Blue marker: particle size fraction; orange marker: cumulative frequency

3.7.2. AEO Encapsulation efficiency

By following the described method, a calibration curve for the determination of the OEO concentration in the samples was obtained. The measures showed a high linearity with an R^2 higher than 0.999 and a standard deviation that was, in all cases, lower than 0.02 in the determination of the absorbance of OEO %v. Thus, the method was valid for determining the concentration of oregano oil in the solution.

The total and surface oil for each concentration of OEO and a blank sample of the CS–GA 1–2 particles were measured to determine the %v OEO present in each sample.

Through calculations using Equation (18), disparities were identified between the two different concentrations of OEO (%v) used for the formation of the emulsion. The capsules prepared with 0.5%v OEO achieved an encapsulation efficiency of 60.1%, as outlined in Equation (17), while those prepared with 10%v achieved 36.4%.

Thus, as indicated by the results, it is evident that significantly increasing the oil concentration did not enhance the efficiency of encapsulation. This may be attributed to the presence of numerous oil droplets during the formation of the emulsion, leading to coalescence, which hindered the complete coating of oil droplets by CS–GA particles.

Figure V.85 shows a schematic diagram with the main optimized parameters.

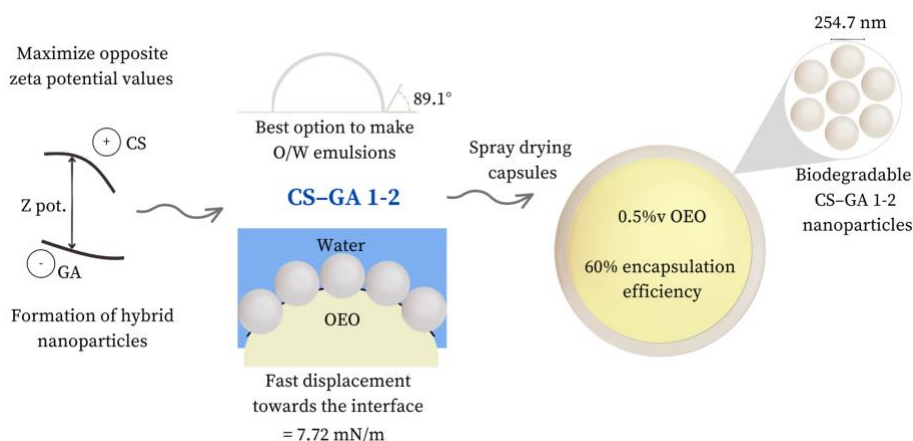


Figure V.85 – Schematic diagram with the main optimized parameters

3.8. Conclusions

Capsules comprised of chitosan–Arabic gum nanoparticle complexes were successfully synthesized through spray-drying. To optimize the parameters of preparing the emulsion, the particle size, zeta potential, contact angle, and interfacial tension were evaluated. The CS–GA 1–2 nanoparticles reached a size of 257.4 nm after complex coacervation when conducted under acidic pH conditions, generating a distinct zeta potential between the two polymers. The measured contact angle was 89.1 degrees, indicating their suitability for stabilizing oil-in-water (O/W) emulsions. This was due to their hydrophilic properties, which caused the particles to predominantly gather at the interface and effectively encapsulate the oil droplets. A 2% wt concentration of these particles notably reduced the equilibrium interfacial tension to 7.72 mN/m and facilitated particles' migration to the interface.

Additionally, the inclusion of chitosan enhanced the biodegradability of Arabic gum nanoparticles, fulfilling expectations. The capsules demonstrated effective encapsulation of oregano oil through atomization-based drying. The concentration of oil did not directly impact the particles' formation and maintained capsule sizes between 2 and 3 μm . However, capsules prepared with a 5%v concentration of OEO achieved a 60% oil encapsulation efficiency, outperforming the outcomes of higher oil concentrations that increased the surface oil content.

These capsules, leveraging the properties of chitosan and Arabic gum, as well as oregano oil, offer remarkable versatility for various applications. Their potential relevance in biodetergent formulations is particularly noteworthy and will be explored in future research endeavors

VI. CONCLUSIONES

De todo el trabajo realizado, se pueden extraer las conclusiones que a continuación se detallan. La conclusión general se centra en la obtención de cápsulas de diferentes materiales capaces de retener un aditivo de interés en su interior para la formulación de detergentes. Las conclusiones específicas de esta Tesis Doctoral se han dividido en los tres capítulos en que se han separado los resultados según el material utilizado para la formación de las cápsulas.

Comenzando con las nanopartículas de sílice Aerosil® A200, a pesar de demostrarse la formación de cápsulas con un tamaño de 1 μm en una primera instancia, su marcado carácter hidrofílico y sus elevados valores de tensión interfacial en la zona de contacto agua-aceite, no las colocan como unas partículas idóneas para la estabilización de emulsiones de Pickering. Además, se encuentra una falta de reproducibilidad en los resultados obtenidos con el método seguido y el fracaso en el intento de formación de capas de recubrimiento para mejorar la impermeabilidad de las cápsulas

El lado positivo de las nanopartículas de sílice es su comportamiento medioambiental. Los resultados obtenidos sugieren que las nanopartículas podrían ser consideradas no tóxicas, dado que los porcentajes de inhibición del crecimiento de bacterias bioluminiscentes *Vibrio fischeri* no superaron el 10%, incluso en concentraciones elevadas. Se calculó un valor de EC20 de 1654 mg/L, el cual corresponde a concentraciones altamente improbables en entornos acuáticos.

Por esta razón, se procede al uso de unas nanopartículas de similar naturaleza, para aprovechar su comportamiento respetuoso con el medio ambiente, pero con ciertas modificaciones, encontrándose en una suspensión coloidal comercial estable.

Así, para la producción de cápsulas empleando las nanopartículas de sílice Ludox, los mejores resultados se obtienen usando el agitador de alta velocidad y cizalla Silverson. En este caso, se obtienen cápsulas de un diámetro medio de aproximadamente 2 μm con una pequeña variabilidad en el tamaño de cápsula obtenido. Se ha comprobado que las cápsulas son efectivas para retener en su interior, durante el proceso de emulsificación, tanto un tinte como un biocida comercial, obteniendo unos perfiles de liberación similares en ambos casos. Se concluye además que la permeabilidad de las cápsulas es alta, puesto

que se lleva a cabo una liberación instantánea de los compuestos una vez las cápsulas son diluidas en agua.

Por ello, se requiere de la formación de una capa extra de recubrimiento para conseguir el sellado de las cápsulas porosas previamente formadas. La estanqueidad de las cápsulas se consigue aplicando una capa de quitosano alrededor de éstas, aprovechando la diferencia de potencial zeta entre las partículas de sílice de la superficie de las cápsulas y el marcado carácter positivo del biopolímero, obteniéndose una liberación inferior al 10% durante el proceso de dilución de las cápsulas en agua. Se demuestra la capacidad de las cápsulas para resistir sin romperse a la aplicación de esfuerzos cortantes y a la exposición a un medio ácido. Por otra parte, con la aplicación de ultrasonidos se consigue la ruptura de las cápsulas y obteniendo que un 50% del tinte teórico se libera después de aplicar el esfuerzo, lo que indica que las cápsulas con recubrimiento de quitosano son capaces de mantener en el interior el tinte hasta que se provoque la liberación en el momento oportuno de dosificación. Esto potencia las posibles aplicaciones que se le puedan dar a estas cápsulas, en este caso para la liberación de un biocida que permita la eliminación de microorganismos en el medio en el que se encuentre disperso.

Alternativamente, se ha llevado a cabo la encapsulación utilizando nanopartículas de un polímero sintético. Se lleva a cabo la formación de nanopartículas de látex mediante una reacción de polimerización a partir de tres monómeros de partida, obteniendo un diámetro medio de partícula ($D[3,2]$) de 121 nm. La formación de cápsulas se lleva cabo mediante diferentes mecanismos de homogeneización, obteniendo cápsulas mayores cuando se usa Vortex, entre 10 y 20 μm , y Ultraturrax, 20 μm , y considerablemente inferiores cuando se utiliza el agitador Silverson, 5 μm . Nuevamente se obtienen unas cápsulas porosas. Así se lleva a cabo la encapsulación y liberación de enzima proteasa con las cápsulas producidas mediante Vortex, siguiendo la liberación de la enzima mediante medidas de proteína total. Sin embargo, la actividad de la enzima disminuye una vez transcurrido el primer día de liberación, por lo que para su incorporación en una formulación detergentes se requiere de una capa de sellado alrededor de las cápsulas para evitar la liberación de la enzima antes de que sea requerido y, así maximizar las propiedades deterativas de las enzimas y minimizar la cantidad de enzima requerida en las formulaciones. En este caso, la aplicación de recubrimientos metálicos de cobre y plata, mediante la reducción *in situ* del metal para que se deposite directamente sobre la

superficie de las cápsulas de látex, consigue una estanqueidad prácticamente total de las cápsulas en el ensayo de liberación por dilución. Se demuestra también que las cápsulas de látex con recubrimiento de cobre y plata son resistentes en medios ácidos y que los esfuerzos cortantes tampoco son capaces de provocar la ruptura de las cápsulas para la liberación del compuesto encapsulado. La ruptura de las cápsulas se produce con la aplicación de ultrasonidos, consiguiéndose una liberación global del 75% para la plata y del 50% para el cobre, sobre el total de tinte teórico máximo que pueden retener las cápsulas. Además, el comportamiento ambiental de las nanopartículas de látex es adecuado para su inclusión en las formulaciones detergentes puesto que se alcanza una biodegradabilidad superior al 60% según el ensayo estático de determinación de la biodegradación siguiendo la norma OCDE 301E.

Por último, el proceso de síntesis de cápsulas compuestas por nanopartículas complejas de quitosano y goma arábica mediante secado por pulverización se ha llevado a cabo exitosamente. Para optimizar la preparación de la emulsión, se evaluaron parámetros como el tamaño de partícula, el potencial zeta, el ángulo de contacto y la tensión interfacial.

Las nanopartículas de CS-GA 1-2 tienen un tamaño de 257.4 nm después de la coacervación compleja bajo condiciones de pH ácido, generando un potencial zeta opuesto entre ambos polímeros. Se midió un ángulo de contacto de 89.1 grados, indicando su capacidad para estabilizar emulsiones de aceite en agua (O/W). Esto se debe a sus propiedades ligeramente hidrofílicas, lo que permite que las partículas se concentren cerca de la interfase y logren encapsular de manera eficiente las gotas de aceite. Una concentración de partículas del 2% en peso redujo significativamente la tensión interfacial de equilibrio a 7.72 mN/m, facilitando la migración de partículas hacia la interfase.

Además, la inclusión de quitosano mejoró la biodegradabilidad de las nanopartículas de goma arábica, cumpliendo con las expectativas. Las cápsulas demostraron una encapsulación efectiva de aceite de orégano mediante secado por atomización. La concentración de aceite no afectó directamente a la formación de las partículas, manteniendo tamaños de cápsulas entre 2 y 3 μm . Sin embargo, las cápsulas preparadas con una concentración de 5% v/v de aceite de orégano lograron una eficiencia

de encapsulación de aceite del 60%, superando los resultados de concentraciones más altas que aumentaron el contenido superficial de aceite.

Estas cápsulas, aprovechando las propiedades del quitosano y la goma arábica, así como del aceite de orégano, muestran una notable versatilidad para diversas aplicaciones. Su relevancia potencial en formulaciones de biodegradables es particularmente destacable.

Así pues, una vez optimizados los diferentes métodos de formación de cápsulas y su recubrimiento con el empleo del tinte para la optimización de los procedimientos y el estudio del comportamiento de las cápsulas en las diferentes situaciones probadas, se podría proceder a la encapsulación de enzimas, que ya se demostró que se comportaban de forma similar al tinte, o de cualquier otro compuesto que se considere útil en el campo de aplicación del estudio. Por tanto, se puede crear una sinergia que aúne las propiedades y aplicaciones que aporta el compuesto encapsulado y el material elegido para el recubrimiento. De esta forma, actuaría en primer lugar el metal o el quitosano situados en el exterior de las cápsulas cubriendo toda su superficie y, posteriormente, en el momento deseado se procedería a liberar los compuestos encapsulados mediante la aplicación de ultrasonidos, aprovechando al máximo las cápsulas formadas.

CONCLUSIONS

From all the research conducted, the following conclusions can be drawn. The general conclusion focuses on obtaining capsules made of different materials capable of retaining an additive of interest inside for detergent formulation. The specific conclusions of this doctoral thesis have been divided into three chapters according to the material used for capsule formation.

Beginning with Aerosil® A200 silica nanoparticles, despite the initial demonstration of capsule formation with a size of 1 μm , their marked hydrophilic nature and high interfacial tension values at the water-oil contact zone do not position them as suitable particles for Pickering emulsion stabilization. Additionally, there is a lack of reproducibility in the results obtained using the method followed and a failure in attempting to form coating layers to enhance the impermeability of the capsules.

The positive aspect of silica nanoparticles lies in their environmental behavior. The results suggest that these nanoparticles could be considered non-toxic since the inhibition percentages of the growth of bioluminescent bacteria *Vibrio fischeri* did not exceed 10%, even at elevated concentrations. An EC20 value of 1654 mg/L was calculated, which corresponds to highly improbable concentrations in aquatic environments.

Therefore, similar environmentally friendly nanoparticles are utilized with certain modifications, found in a stable commercial colloidal suspension.

For the production of capsules using Ludox® silica nanoparticles, the best results are achieved using the high-speed Silverson shear mixer. In this case, capsules with an average diameter of approximately 2 μm and minimal variability in capsule size are obtained. It has been verified that these capsules effectively retain both a dye and a commercial biocide during the emulsification process, exhibiting similar release profiles in both cases. It is further concluded that the capsules' permeability is high, leading to an immediate release of compounds once the capsules are diluted in water.

Hence, an additional coating layer is required to seal the previously formed porous capsules. Capsule tightness is achieved by applying a layer of chitosan around them, leveraging the zeta potential difference between the silica particles on the capsule surface and the markedly positive nature of the biopolymer. This results in a release of less than 10% during the capsules' dilution in water. The capsules demonstrate the ability to resist

without breaking under shear stress and exposure to an acidic medium. Furthermore, ultrasound application leads to capsule rupture, releasing 50% of the theoretical dye after the stress, indicating that chitosan-coated capsules can retain the dye until the opportune dosing moment. This enhances potential applications for these capsules, particularly for releasing a biocide to eliminate microorganisms in the dispersed medium.

Alternatively, encapsulation using synthetic polymer nanoparticles has been carried out. Latex nanoparticles were formed through a polymerization reaction from three starting monomers, yielding an average particle diameter ($D_{[3,2]}$) of 121 nm. Capsule formation occurred via different homogenization mechanisms, resulting in larger capsules when using Vortex, between 10 and 20 μm , and Ultraturrax, 20 μm , and considerably smaller capsules when employing the Silverson mixer, 5 μm . Once again, porous capsules were obtained.

Enzyme protease encapsulation and release were carried out using capsules produced through Vortex, monitoring enzyme release by total protein measurements. However, the enzyme's activity decreased after the first day of release. Therefore, for incorporation into detergent formulations, a sealing layer around the capsules is required to prevent premature enzyme release, maximizing enzymatic detergent properties, and minimizing the required enzyme quantity in formulations. In this scenario, applying copper and silver metallic coatings via in situ metal reduction directly onto the latex capsule surface achieves nearly complete capsule tightness in the dilution release assay. It is also demonstrated that latex capsules with copper and silver coatings withstand acidic media, and shear stresses do not cause capsule rupture for the encapsulated compound release. Capsule rupture occurs with ultrasound application, resulting in an overall release of 75% for silver and 50% for copper, concerning the total theoretical dye capacity of the capsules. Additionally, the environmental behavior of latex nanoparticles is suitable for inclusion in detergent formulations, achieving over 60% biodegradation according to the OECD 301E standard in static biodegradation testing.

Finally, the synthesis process of capsules composed of complex nanoparticles of chitosan and gum Arabic through spray drying has been successfully conducted. To optimize emulsion preparation, parameters such as particle size, zeta potential, contact angle, and interfacial tension were evaluated.

CS-GA 1-2 nanoparticles have a size of 257.4 nm after complex coacervation under acidic pH conditions, generating opposing zeta potentials between both polymers. A contact angle of 89.1 degrees was measured, indicating their capability to stabilize oil-in-water (O/W) emulsions. This is due to their slightly hydrophilic properties, allowing particles to concentrate near the interface and efficiently encapsulate oil droplets. A particle concentration of 2% by weight significantly reduced the equilibrium interfacial tension to 7.72 mN/m, facilitating particle migration toward the interface.

Furthermore, the inclusion of chitosan improved the biodegradability of Arabic gum nanoparticles, meeting expectations. The capsules effectively encapsulated oregano oil via spray drying. The oil concentration did not directly affect particle formation, maintaining capsule sizes between 2 and 3 μm . However, capsules prepared with a 5% v/v oregano oil concentration achieved 60% oil encapsulation efficiency, surpassing results from higher concentrations that increased surface oil content.

These capsules, leveraging the properties of chitosan, gum Arabic, and oregano oil, exhibit notable versatility for various applications. Their potential relevance in biode detergent formulations is particularly noteworthy.

Therefore, once the different capsule formation methods are optimized and their coating with dye for procedure optimization and capsule behavior study in various tested situations, the encapsulation of enzymes, which behaved similarly to the dye, or any other compound considered useful in the study's application field, can be pursued. Thus, a synergy can be created that combines the properties and applications provided by the encapsulated compound and the chosen coating material. Accordingly, the metal or chitosan situated on the capsules' exterior covering their entire surface would act first, and subsequently, at the desired moment, the encapsulated compounds would be released by ultrasound application, fully utilizing the formed capsules.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Wang, X.; Du, L.; Xu, Y. Stabilizers Screening Method Development for Liquid Detergent Protease. *China Surfactant Detergent and Cosmetics* **2023**, *53*, 796–801, doi:10.3969/j.issn.2097-2806.2023.07.009.
2. Sands, D.; Davis, A.; Banfield, S.; Pottie, I.R.; Darvesh, S. Solvents and Detergents Compatible with Enzyme Kinetic Studies of Cholinesterases. *Chem Biol Interact* **2023**, *383*, 110667, doi:10.1016/j.cbi.2023.110667.
3. Betancor, L.; Luckarift, H.R. Bioinspired Enzyme Encapsulation for Biocatalysis. *Trends Biotechnol* **2008**, *26*, 566–572, doi:10.1016/j.tibtech.2008.06.009.
4. David, A.E.; Yang, A.J.; Wang, N.S. Enzyme Stabilization and Immobilization by Sol-Gel Entrapment. *Methods Mol Biol* **2011**, *679*, 49–66, doi:10.1007/978-1-60761-895-9_6.
5. Zhang, C.; Yan, K.; Hu, C.; Zhao, Y.; Chen, Z.; Zhu, X.; Möller, M. Encapsulation of Enzymes in Silica Nanocapsules Formed by an Amphiphilic Precursor Polymer in Water. *J Mater Chem B* **2015**, *3*, 1261–1267, doi:10.1039/C4TB01701C.
6. Lamprecht, A.; Bodmeier, R. Microencapsulation. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; 2010; pp. 157–172 ISBN 9783527306732.
7. Yow, H.N.; Routh, A.F. Formation of Liquid Core–Polymer Shell Microcapsules. *Soft Matter* **2006**, *2*, 940–949, doi:10.1039/B606965G.
8. Baker, P.J.; Patwardhan, S. V.; Numata, K. Synthesis of Homopolypeptides by Aminolysis Mediated by Proteases Encapsulated in Silica Nanospheres. *Macromol Biosci* **2014**, *14*, 1619–1626, doi:10.1002/mabi.201400295.
9. Wu, J.; Ma, G.H. Recent Studies of Pickering Emulsions: Particles Make the Difference. *Small* **2016**, *12*, 4633–4648.
10. Thompson, K.L.; Williams, M.; Armes, S.P. Colloidosomes: Synthesis, Properties and Applications. *J Colloid Interface Sci* **2014**, *447*, 217–228, doi:10.1016/j.jcis.2014.11.058.
11. Risch, S.J. Encapsulation: Overview of Uses and Techniques. **1995**, 2–7, doi:10.1021/BK-1995-0590.CH001.

12. McClements, D.J. Encapsulation, Protection, and Release of Hydrophilic Active Components: Potential and Limitations of Colloidal Delivery Systems. *Adv Colloid Interface Sci* **2015**, *219*, 27–53.
13. Guarnido, I.L.; Routh, A.F.; Mantle, M.D.; Serrano, M.F.; Marr, P.C. Ionic Liquid Microcapsules: Formation and Application of Polystyrene Microcapsules with Ionic Liquid Cores. *ACS Sustain Chem Eng* **2019**, *7*, 1870–1874, doi:10.1021/ACSSUSCHEMENG.8B05478.
14. Simó, G.; Fernández-Fernández, E.; Vila-Crespo, J.; Ruipérez, V.; Rodríguez-Nogales, J.M. Research Progress in Coating Techniques of Alginate Gel Polymer for Cell Encapsulation. *Carbohydr Polym* **2017**, *170*, 1–14, doi:10.1016/j.carbpol.2017.04.013.
15. Strachan, J.B.; Dyett, B.; Chan, S.; McDonald, B.; Vlahos, R.; Valery, C.; Conn, C.E. A Promising New Oral Delivery Mode for Insulin Using Lipid-Filled Enteric-Coated Capsules. *Biomaterials Advances* **2023**, *148*, 213368, doi:10.1016/j.bioadv.2023.213368.
16. Salar-Behzadi, S.; Corzo, C.; Schaden, L.; Laggner, P.; Zimmer, A. Correlation between the Solid State of Lipid Coating and Release Profile of API from Hot Melt Coated Microcapsules. *Int J Pharm* **2019**, *565*, 569–578, doi:10.1016/j.ijpharm.2019.05.036.
17. Mishra, G.; Mittal, N.; Sharma, A. Multifunctional Mesoporous Carbon Capsules and Their Robust Coatings for Encapsulation of Actives: Antimicrobial and Anti-Bioadhesion Functions. *ACS Appl Mater Interfaces* **2017**, *9*, 19371–19379, doi:10.1021/ACSAMI.6B07831/SUPPL_FILE/AM6B07831_SI_001.PDF.
18. Matsui, Y.; Fujisaki, W.; Torimoto, J.; Tanaka, K.; Nishizawa, M.; Yamamoto, M.; Kawagucci, S.; Shimane, Y.; Tei, M.; Uematsu, K.; et al. Gold-Coated Silver Capsule for Elemental Analyzer-Isotope Ratio Mass Spectrometer: Robust against Pretreatment of Rock Material for Organic Carbon and $\Delta^{13}\text{C}$ Analyses. *Geochem J* **2021**, *55*, E1–E8, doi:10.2343/geochemj.2.0626.
19. Gibaldi, M.; Feldman, S. Establishment of Sink Conditions in Dissolution Rate Determinations. Theoretical Considerations and Application to Nondisintegrating Dosage Forms. *J Pharm Sci* **1967**, *56*, 1238–1242, doi:10.1002/jps.2600561005.

20. Adepu, S.; Ramakrishna, S. Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. *Molecules* **2021**, *26*, doi:10.3390/MOLECULES26195905.
21. Gupta, A.; Eral, H.B.; Hatton, T.A.; Doyle, P.S. Nanoemulsions: Formation, Properties and Applications. *Soft Matter* **2016**, *12*, 2826–2841.
22. Sen, D.; Das, A.; Kumar, A.; Bahadur, J.; Chaurasia, R.K.; Khan, A.; Ganguly, R. Amphiphilic Interaction-Mediated Ordering of Nanoparticles in Pickering Emulsion Droplets. *Soft Matter* **2023**, *19*, 3953–3965, doi:10.1039/d2sm01544g.
23. Hu, X.; Long, Y.; Xuan, G.; Wang, Y.; Huang, X.; Xu, Y.; Liu, J.; Wang, B.; Song, F. Optimized Hydrophobic Magnetic Nanoparticles Stabilized Pickering Emulsion for Enhanced Oil Recovery in Complex Porous Media of Reservoir. *Front Energy Res* **2023**, *11*, 1212664, doi:10.3389/fenrg.2023.1212664.
24. Cavallaro, G.; Milioto, S.; Nigamatzyanova, L.; Akhatova, F.; Fakhrullin, R.; Lazzara, G. Pickering Emulsion Gels Based on Halloysite Nanotubes and Ionic Biopolymers: Properties and Cleaning Action on Marble Surface. *ACS Appl Nano Mater* **2019**, *2*, 3169–3176, doi:10.1021/acsanm.9b00487.
25. Cui, S.; McClements, D.J.; Shi, J.; Xu, X.; Ning, F.; Liu, C.; Zhou, L.; Sun, Q.; Dai, L. Fabrication and Characterization of Low-Fat Pickering Emulsion Gels Stabilized by Zein/Phytic Acid Complex Nanoparticles. *Food Chem* **2023**, *402*, 134179, doi:10.1016/j.foodchem.2022.134179.
26. Gricius, Z.; Øye, G. Recent Advances in the Design and Use of Pickering Emulsions for Wastewater Treatment Applications. *Soft Matter* **2023**, *19*, 818–840.
27. Xia, T.; Xue, C.; Wei, Z. Physicochemical Characteristics, Applications and Research Trends of Edible Pickering Emulsions. *Trends Food Sci Technol* **2021**, *107*, 1–15, doi:10.1016/J.TIFS.2020.11.019.
28. Ge, S.; Xiong, L.; Li, M.; Liu, J.; Yang, J.; Chang, R.; Liang, C.; Sun, Q. Characterizations of Pickering Emulsions Stabilized by Starch Nanoparticles: Influence of Starch Variety and Particle Size. *Food Chem* **2017**, *234*, 339–347, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2017.04.150.

29. Horváth, B.; Pál, S.; Széchenyi, A. Preparation and in Vitro Diffusion Study of Essential Oil Pickering Emulsions Stabilized by Silica Nanoparticles. *Flavour Fragr J* **2018**, *33*, 385–396, doi:10.1002/ffj.3463.
30. Gao, J.; Bu, X.; Zhou, S.; Wang, X.; Bilal, M.; Hassan, F.U.; Hassanzadeh, A.; Xie, G.; Chelgani, S.C. Pickering Emulsion Prepared by Nano-Silica Particles – A Comparative Study for Exploring the Effect of Various Mechanical Methods. *Ultrason Sonochem* **2022**, *83*, 105928, doi:10.1016/j.ultsonch.2022.105928.
31. Teixeira, R.F.A.; McKenzie, H.S.; Boyd, A.A.; Bon, S.A.F. Pickering Emulsion Polymerization Using Laponite Clay as Stabilizer to Prepare Armored “Soft” Polymer Latexes. *Macromolecules* **2011**, *44*, 7415–7422, doi:10.1021/ma201691u.
32. Sachdev, S.; Maugi, R.; Kirk, C.; Zhou, Z.; Christie, S.D.R.; Platt, M. Synthesis and Assembly of Gold and Iron Oxide Particles Within an Emulsion Droplet; Facile Production of Core@Shell Particles. *Colloid Interface Sci Commun* **2017**, *16*, 14–18, doi:10.1016/J.COLCOM.2016.12.005.
33. Xie, C.Y.; Meng, S.X.; Xue, L.H.; Bai, R.X.; Yang, X.; Wang, Y.; Qiu, Z.P.; Binks, B.P.; Guo, T.; Meng, T. Light and Magnetic Dual-Responsive Pickering Emulsion Micro-Reactors. *Langmuir* **2017**, *33*, 14139–14148, doi:10.1021/ACS.LANGMUIR.7B03642/ASSET/IMAGES/LARGE/LA-2017-03642S_0010.JPEG.
34. Zheng, R.; Binks, B.P. Pickering Emulsions Stabilized by Polystyrene Particles Possessing Different Surface Groups. *Langmuir* **2022**, *38*, 1079–1089, doi:10.1021/acs.langmuir.1c02648.
35. Zdarta, J.; Meyer, A.; Jesionowski, T.; Pinelo, M. A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility. *Catalysts* **2018**, *8*, 92, doi:10.3390/catal8020092.
36. Li, Z.Z.; Chen, J.G.; Wang, Y.L.; Sun, Y.H. Catalytic Performances of Co/SiO₂ Prepared through Thermal Decomposition for Fischer-Tropsch Synthesis. *Ranliao Huaxue Xuebao/Journal of Fuel Chemistry and Technology* **2011**, *39*, 54–58.

37. Lechuga, M.; Avila-Sierra, A.; Lobato-Guarnido, I.; García-López, A.I.; Ríos, F.; Fernández-Serrano, M. Mitigating the Skin Irritation Potential of Mixtures of Anionic and Non-Ionic Surfactants by Incorporating Low-Toxicity Silica Nanoparticles. *J Mol Liq* **2023**, *383*, doi:10.1016/j.molliq.2023.122021.
38. Perino, A.; Noik, C.; Dalmazzone, C. Effect of Fumed Silica Particles on Water-in-Crude Oil Emulsion: Emulsion Stability, Interfacial Properties, and Contribution of Crude Oil Fractions. *Energy and Fuels* **2013**, *27*, 2399–2412, doi:10.1021/EF301627E.
39. Perino, A.; Noik, C.; Dalmazzone, C. Effect of Fumed Silica Particles on Water-in-Crude Oil Emulsion: Emulsion Stability, Interfacial Properties, and Contribution of Crude Oil Fractions. *Energy and Fuels* **2013**, *27*, 2399–2412, doi:10.1021/EF301627E.
40. Vasile, F.E.; Martinez, M.J.; Pizones Ruiz-Henestrosa, V.M.; Judis, M.A.; Mazzobre, M.F. Physicochemical, Interfacial and Emulsifying Properties of a Non-Conventional Exudate Gum (Prosopis Alba) in Comparison with Gum Arabic. *Food Hydrocoll* **2016**, *56*, 245–253, doi:10.1016/j.foodhyd.2015.12.016.
41. Shi, Y.; Li, C.; Zhang, L.; Huang, T.; Ma, D.; Tu, Z. cai; Wang, H.; Xie, H.; Zhang, N. hai; Ouyang, B. ling Characterization and Emulsifying Properties of Octenyl Succinate Anhydride Modified Acacia Seyal Gum (Gum Arabic). *Food Hydrocoll* **2017**, *65*, 10–16, doi:10.1016/j.foodhyd.2016.10.043.
42. Golkar, A.; Taghavi, S.M.; Dehnavi, F.A. The Emulsifying Properties of Persian Gum (Amygdalus Scoparia Spach) as Compared with Gum Arabic. *Int J Food Prop* **2018**, *21*, 416–436, doi:10.1080/10942912.2018.1454464.
43. Bai, L.; Huan, S.; Li, Z.; McClements, D.J. Comparison of Emulsifying Properties of Food-Grade Polysaccharides in Oil-in-Water Emulsions: Gum Arabic, Beet Pectin, and Corn Fiber Gum. *Food Hydrocoll* **2017**, *66*, 144–153, doi:10.1016/j.foodhyd.2016.12.019.
44. Yanat, M.; Schroën, K. Preparation Methods and Applications of Chitosan Nanoparticles; with an Outlook toward Reinforcement of Biodegradable Packaging. *React Funct Polym* **2021**, *161*, doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2021.104849.

45. Cheung, R.C.F.; Ng, T.B.; Wong, J.H.; Chan, W.Y. *Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications*; 2015; Vol. 13; ISBN 8523943803.
46. Tavares, L.; Barros, H.L.B.; Vaghetti, J.C.P.; Noreña, C.P.Z. Microencapsulation of Garlic Extract by Complex Coacervation Using Whey Protein Isolate/Chitosan and Gum Arabic/Chitosan as Wall Materials: Influence of Anionic Biopolymers on the Physicochemical and Structural Properties of Microparticles. *Food Bioproc Tech* **2019**, *12*, 2093–2106, doi:10.1007/s11947-019-02375-y.
47. Ding, S.; Wang, Y.; Li, J.; Chen, S. Progress and Prospects in Chitosan Derivatives: Modification Strategies and Medical Applications. *J Mater Sci Technol* **2021**, *89*, 209–224, doi:10.1016/j.jmst.2020.12.008.
48. Espinosa-Andrews, H.; Báez-González, J.G.; Cruz-Sosa, F.; Vernon-Carter, E.J. Gum Arabic–Chitosan Complex Coacervation. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1313–1318, doi:10.1021/bm0611634.
49. Merkl, P.; Long, S.; McInerney, G.M.; Sotiriou, G.A. Antiviral Activity of Silver, Copper Oxide and Zinc Oxide Nanoparticle Coatings against Sars-Cov-2. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 1312, doi:10.3390/NANO11051312/S1.
50. Deyá, C.; Bellotti, N. Biosynthesized Silver Nanoparticles to Control Fungal Infections in Indoor Environments. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* **2017**, *8*, 025005, doi:10.1088/2043-6254/AA6880.
51. Adelere, I.A.; Lateef, A.; Adabara, N.U.; Babayi, H.; Aboyeji, D.O. Neem Root Mediated-Biosynthesis of Silver Nanoparticles: Antimicrobial Activities and Application as Detergent Additive. *Ogbomoso* **2019**.
52. Birjandi, N.*; Karami, F.; Tavakoli, D. Synthesis of Silver Nanoparticles by Environmentally Friendly Method and Study of Its Antimicrobial Properties in Soap Detergent Production. *Journal of Health* **2021**, *12*, 432–444, doi:10.52547/J.HEALTH.12.3.432.
53. Grass, G.; Rensing, C.; Solioz, M. Metallic Copper as an Antimicrobial Surface. *Appl Environ Microbiol* **2011**, *77*, 1541, doi:10.1128/AEM.02766-10.
54. Mitra, D.; Kang, E.T.; Neoh, K.G. Antimicrobial Copper-Based Materials and Coatings: Potential Multifaceted Biomedical Applications. *ACS Appl Mater*

- Interfaces* **2020**, *12*, 21159–21182, doi:10.1021/ACSAMI.9B17815/ASSET/IMAGES/MEDIUM/AM9B17815_0015.GIF.
55. Santo, C.E.; Morais, P.V.; Grass, G. Isolation and Characterization of Bacteria Resistant to Metallic Copper Surfaces. *Appl Environ Microbiol* **2010**, *76*, 1341–1348, doi:10.1128/AEM.01952-09.
 56. Miranzadeh, M.; Kassae, M.Z.; Afshari, F. Efficiency of Cu, Ag, and Fe Nanoparticles As Detergents Preservatives Against E. Coli and S. Aureus. *Nanochemistry Research* **2020**, *4*, 170–178, doi:10.22036/NCR.2019.02.009.
 57. Kong, M.; Chen, X.G.; Xing, K.; Park, H.J. Antimicrobial Properties of Chitosan and Mode of Action: A State of the Art Review. *Int J Food Microbiol* **2010**, *144*, 51–63, doi:10.1016/J.IJFOODMICRO.2010.09.012.
 58. Mu, H.; Liu, Q.; Niu, H.; Sun, Y.; Duan, J. Gold Nanoparticles Make Chitosan–Streptomycin Conjugates Effective towards Gram-Negative Bacterial Biofilm. *RSC Adv* **2016**, *6*, 8714–8721, doi:10.1039/C5RA22803D.
 59. de Paz, L.E.C.; Resin, A.; Howard, K.A.; Sutherland, D.S.; Wejse, P.L. Antimicrobial Effect of Chitosan Nanoparticles on Streptococcus Mutans Biofilms. *Appl Environ Microbiol* **2011**, *77*, 3892–3895, doi:10.1128/AEM.02941-10/ASSET/0D74DF56-C154-483E-84F7-B2504FA6112E/ASSETS/GRAPHIC/ZAM9991021310003.JPEG.
 60. Perinelli, D.R.; Fagioli, L.; Campana, R.; Lam, J.K.W.; Baffone, W.; Palmieri, G.F.; Casettari, L.; Bonacucina, G. Chitosan-Based Nanosystems and Their Exploited Antimicrobial Activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2018**, *117*, 8–20, doi:10.1016/J.EJPS.2018.01.046.
 61. Yilmaz Atay, H. Antibacterial Activity of Chitosan-Based Systems. *Functional Chitosan* **2020**, 457, doi:10.1007/978-981-15-0263-7_15.
 62. Sheng, Z.; Guo, A.; Wang, J.; Chen, X. Preparation, Physicochemical Properties and Antimicrobial Activity of Chitosan from Fly Pupae. *Heliyon* **2022**, *8*, e11168, doi:10.1016/J.HELİYON.2022.E11168.

63. Al-Salihi, S.S.; Jumaah, I.A.M. Activity of Some Disinfectants, Detergents and Essential Oils on Growth of the Yeast *Candida Albicans*. *Al-Mustansiriyah Journal of Science* **2017**, *28*, 25–34, doi:10.23851/mjs.v28i1.308.
64. Mansour, A.; Enayat, K.; Neda, M.S.; Behzad, A. Antibacterial Effect and Physicochemical Properties of Essential Oil of *Zataria Multiflora* Boiss. *Asian Pac J Trop Med* **2010**, *3*, 439–442, doi:10.1016/S1995-7645(10)60105-8.
65. Abate, L.; Bachheti, A.; Bachheti, R.K.; Husen, A.; Getachew, M.; Pandey, D.P. Potential Role of Forest-Based Plants in Essential Oil Production: An Approach to Cosmetic and Personal Health Care Applications. *Non-Timber Forest Products: Food, Healthcare and Industrial Applications* **2021**, 1–18, doi:10.1007/978-3-030-73077-2_1/TABLES/2.
66. Wang, L.H. Fragrances: From Essential Oils to the Human Body and Atmospheric Aerosols. *Analytical Methods* **2012**, *5*, 316–322, doi:10.1039/C2AY25980J.
67. Sticher, O.; Heilmann, J.; Zündorf, I. Hänsel / Sticher Pharmakognosie Phytopharmazie. *Hänsel/Sticher Pharmakognosie Phytopharmazie* **2015**.
68. Leyva-López, N.; Gutiérrez-Grijalva, E.P.; Vazquez-Olivo, G.; Heredia, J.B. Essential Oils of Oregano: Biological Activity beyond Their Antimicrobial Properties. *Molecules* **2017**, *22*, doi:10.3390/molecules22060989.
69. Gatti, L.; Troiano, F.; Vacchini, V.; Cappitelli, F.; Balloi, A. An In Vitro Evaluation of the Biocidal Effect of Oregano and Cloves' Volatile Compounds against Microorganisms Colonizing an Oil Painting—A Pioneer Study. *Applied Sciences* **2021**, *Vol. 11, Page 78* **2021**, *11*, 78, doi:10.3390/APP11010078.
70. Rhoades, J.; Gialagkolidou, K.; Gogou, M.; Mavridou, O.; Blatsiotis, N.; Ritzoulis, C.; Likotrafti, E. Oregano Essential Oil as an Antimicrobial Additive to Detergent for Hand Washing and Food Contact Surface Cleaning. *J Appl Microbiol* **2013**, *115*, 987–994, doi:10.1111/jam.12302.
71. Bollhorst, T.; Grieb, T.; Rosenauer, A.; Fuller, G.; Maas, M.; Rezwan, K. Synthesis Route for the Self-Assembly of Submicrometer-Sized Colloidosomes with Tailorable Nanopores. *Chemistry of Materials* **2013**, *25*, 3464–3471, doi:10.1021/cm401610a.

72. Hau, K.M.; Connell, D.W.; Richardson, B.J. Mechanism of Acute Inhalation Toxicity of Alkanes and Aliphatic Alcohols. *Environ Toxicol Pharmacol* **1999**, *7*, 159–167, doi:10.1016/S1382-6689(99)00010-1.
73. Alameda, E.J.; Bravo Rodríguez, V.; Bailón Moreno, R.; Núñez Olea, J.; Altmajer Vaz, D. Bath-Substrate-Flow Method for Evaluating the Detergent and Dispersant Performance of Hard-Surface Detergents. *Ind Eng Chem Res* **2003**, *42*, 4303–4310, doi:10.1021/ie030122a.
74. Brossault, D.F.F.; Routh, A.F. Salt-Driven Assembly of Magnetic Silica Microbeads with Tunable Porosity. *J Colloid Interface Sci* **2020**, *562*, 381–390, doi:10.1016/j.jcis.2019.12.032.
75. Brossault, D.F.F.; McCoy, T.M.; Routh, A.F. Self-Assembly of TiO₂/Fe₃O₄/SiO₂ Microbeads: A Green Approach to Produce Magnetic Photocatalysts. *J Colloid Interface Sci* **2021**, *584*, 779–788, doi:10.1016/j.jcis.2020.10.001.
76. Wu, S. Preparation of Fine Copper Powder Using Ascorbic Acid as Reducing Agent and Its Application in MLCC. *Mater Lett* **2007**, *61*, 1125–1129, doi:10.1016/j.matlet.2006.06.068.
77. Xiong, J.; Wang, Y.; Xue, Q.; Wu, X. Synthesis of Highly Stable Dispersions of Nanosized Copper Particles Using L-Ascorbic Acid. *Green Chemistry* **2011**, *13*, 900–904, doi:10.1039/c0gc00772b.
78. Piñero, S.; Camero, S.; Blanco, S. Silver Nanoparticles: Influence of the Temperature Synthesis on the Particles' Morphology. In Proceedings of the Journal of Physics: Conference Series; IOP Publishing, January 1 2017; Vol. 786, p. 012020.
79. Mulenós, M.R.; Liu, J.; Lujan, H.; Guo, B.; Lichtfouse, E.; Sharma, V.K.; Sayes, C.M. Copper, Silver, and Titania Nanoparticles Do Not Release Ions under Anoxic Conditions and Release Only Minute Ion Levels under Oxidic Conditions in Water: Evidence for the Low Toxicity of Nanoparticles. *Environ Chem Lett* **2020**, *18*, 1319–1328, doi:10.1007/S10311-020-00985-Z/FIGURES/4.
80. Goikoetxea, M.; Minari, R.J.; Beristain, I.; Paulis, M.; Barandiaran, M.J.; Asua, J.M. Polymerization Kinetics and Microstructure of Waterborne Acrylic/Alkyd

- Nanocomposites Synthesized by Miniemulsion. *J Polym Sci A Polym Chem* **2009**, *47*, 4871–4885, doi:10.1002/pola.23535.
81. Yow, H.N.; Beristain, I.; Goikoetxea, M.; Barandiaran, M.J.; Routh, A.F. Evolving Stresses in Latex Films as a Function of Temperature. *Langmuir* **2010**, *26*, 6335–6342, doi:10.1021/la1007439.
 82. Keen, P.H.R.; Slater, N.K.H.; Routh, A.F. Encapsulation of Amylase in Colloidosomes. *Langmuir* **2014**, *30*, 1939–1948, doi:10.1021/la4047897.
 83. Sun, Q.; Routh, A.F. Aqueous Core Colloidosomes with a Metal Shell. *Eur Polym J* **2016**, *77*, 155–163.
 84. Naskar, B.; Dey, A.; Moulik, S.P. Counter-Ion Effect on Micellization of Ionic Surfactants: A Comprehensive Understanding with Two Representatives, Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) and Dodecyltrimethylammonium Bromide (DTAB). *J Surfactants Deterg* **2013**, *16*, 785–794, doi:10.1007/s11743-013-1449-1.
 85. Khodaparast, S.; Sharratt, W.N.; Tyagi, G.; Dalglish, R.M.; Robles, E.S.J.; Cabral, J.T. Pure and Mixed Aqueous Micellar Solutions of Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) and Dimethyldodecyl Amine Oxide (DDAO): Role of Temperature and Composition. *J Colloid Interface Sci* **2021**, *582*, 1116–1127, doi:10.1016/j.jcis.2020.08.002.
 86. Kumar, S.; Aswal, V.K.; Kohlbrecher, J. Size-Dependent Interaction of Silica Nanoparticles with Different Surfactants in Aqueous Solution. *Langmuir* **2012**, *28*, 9288–9297, doi:10.1021/LA3019056/SUPPL_FILE/LA3019056_SI_001.PDF.
 87. Ríos, F.; Fernández-Arteaga, A.; Fernández-Serrano, M.; Jurado, E.; Lechuga, M. Silica Micro- and Nanoparticles Reduce the Toxicity of Surfactant Solutions. *J Hazard Mater* **2018**, *353*, 436–443, doi:10.1016/J.JHAZMAT.2018.04.040.
 88. Fruijtier-Pölloth, C. The Toxicological Mode of Action and the Safety of Synthetic Amorphous Silica—A Nanostructured Material. *Toxicology* **2012**, *294*, 61–79, doi:10.1016/J.TOX.2012.02.001.

89. Fruijtier-Pölloth, C. The Toxicological Mode of Action and the Safety of Synthetic Amorphous Silica—A Nanostructured Material. *Toxicology* **2012**, *294*, 61–79, doi:10.1016/J.TOX.2012.02.001.
90. Moreno, M.; Lampard, C.; Williams, N.; Lago, E.; Emmett, S.; Goikoetxea, M.; Barandiaran, M.J. Eco-Paints from Bio-Based Fatty Acid Derivative Latexes. *Prog Org Coat* **2015**, *81*, 101–106, doi:10.1016/J.PORGCOAT.2015.01.001.
91. Gupta, A.; Eral, H.B.; Hatton, T.A.; Doyle, P.S. Nanoemulsions: Formation, Properties and Applications. *Soft Matter* **2016**, *12*, 2826–2841, doi:10.1039/C5SM02958A.
92. Fernández-Serrano, M.; Routh, A.F.; Ríos, F.; Caparrós-Salvador, F.; Alhaj Salih Ortega, M. Calcium Alginate as a Novel Sealing Agent for Colloidosomes. *Langmuir* **2020**, *36*, 8398–8406, doi:10.1021/acs.langmuir.0c00724.
93. Jia, J.; Liu, R.K.; Sun, Q.; Wang, J.X. Efficient Construction of PH-Stimuli-Responsive Colloidosomes with High Encapsulation Efficiency. *Langmuir* **2023**, doi:10.1021/ACS.LANGMUIR.3C02415/ASSET/IMAGES/LARGE/LA3C02415_0008.JPEG.
94. Sharkawy, A.; Barreiro, F.; Rodrigues, A. Pickering Emulsions Stabilized with Chitosan/Gum Arabic Particles: Effect of Chitosan Degree of Deacetylation on the Physicochemical Properties and Cannabidiol (CBD) Topical Delivery. *J Mol Liq* **2022**, *355*, 118993, doi:10.1016/j.molliq.2022.118993.
95. Sharkawy, A.; Barreiro, M.F.; Rodrigues, A.E. Preparation of Chitosan/Gum Arabic Nanoparticles and Their Use as Novel Stabilizers in Oil/Water Pickering Emulsions. *Carbohydr Polym* **2019**, *224*, 115190, doi:10.1016/j.carbpol.2019.115190.
96. Espinosa-andrews, H.; Ba, J.G.; Cruz-sosa, F.; Vernon-carter, E.J. Gum Arabic - Chitosan Complex Coacervation. **2007**, 1313–1318.
97. Butstraen, C.; Salaün, F. Preparation of Microcapsules by Complex Coacervation of Gum Arabic and Chitosan. *Carbohydr Polym* **2014**, *99*, 608–616, doi:10.1016/j.carbpol.2013.09.006.
98. Da Silva Abreu, F.O.M.; Da Silva, N.A.; De Sousa Sipaubá, M.; Pires, T.F.M.; Bomfim, T.A.; De Castro Monteiro, O.A.; De Camargo Forte, M.M. Chitosan

- and Gum Arabic Nanoparticles for Heavy Metal Adsorption. *Polimeros* **2018**, 28, 231–238, doi:10.1590/0104-1428.02317.
99. Slyusarenko, N. V.; Vasilyeva, N.Y.; Kazachenko, A.S.; Gerasimova, M.A.; Romanchenko, A.S.; Slyusareva, E.A. Synthesis and Properties of Interpolymer Complexes Based on Chitosan and Sulfated Arabinogalactan. *Polymer Science - Series B* **2020**, 62, 272–278, doi:10.1134/S1560090420020050/FIGURES/4.
 100. Avadi, M.R.; Sadeghi, A.M.M.; Mohamadpour Dounighi, N.; Dinarvand, R.; Atyabi, F.; Rafiee-Tehrani, M. Ex Vivo Evaluation of Insulin Nanoparticles Using Chitosan and Arabic Gum. *ISRN Pharm* **2011**, 2011, 1–6, doi:10.5402/2011/860109.
 101. Appolonia Ibekwe, C.; Modupe Oyatogun, G.; Ayodeji Esan, T.; Michael Oluwasegun, K. Synthesis and Characterization of Chitosan/Gum Arabic Nanoparticles for Bone Regeneration. *American Journal of Materials Science and Engineering* **2017**, 5, 28–36, doi:10.12691/ajmse-5-1-4.
 102. Cota-Arriola, O.; Onofre Cortez-Rocha, M.; Burgos-Hernández, A.; Marina Ezquerro-Brauer, J.; Plascencia-Jatomea, M. Controlled Release Matrices and Micro/Nanoparticles of Chitosan with Antimicrobial Potential: Development of New Strategies for Microbial Control in Agriculture. *J Sci Food Agric* **2013**, 93, 1525–1536, doi:10.1002/JSFA.6060.
 103. Hernández-Téllez, C.N.; Plascencia-Jatomea, M.; Cortez-Rocha, M.O. Chitosan-Based Bionanocomposites: Development and Perspectives in Food and Agricultural Applications. *Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities* **2016**, 315–338, doi:10.1016/B978-0-12-802735-6.00012-4.
 104. Raj, V.; Kim, Y.; Kim, Y.G.; Lee, J.H.; Lee, J. Chitosan-Gum Arabic Embedded Alizarin Nanocarriers Inhibit Biofilm Formation of Multispecies Microorganisms. *Carbohydr Polym* **2022**, 284, 118959, doi:10.1016/j.carbpol.2021.118959.
 105. Tan, C.; Xie, J.; Zhang, X.; Cai, J.; Xia, S. Polysaccharide-Based Nanoparticles by Chitosan and Gum Arabic Polyelectrolyte Complexation as Carriers for Curcumin. *Food Hydrocoll* **2016**, 57, 236–245, doi:10.1016/j.foodhyd.2016.01.021.

106. Rajabi, H.; Jafari, S.M.; Rajabzadeh, G.; Sarfarazi, M.; Sedaghati, S. Chitosan-Gum Arabic Complex Nanocarriers for Encapsulation of Saffron Bioactive Components. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* **2019**, 578, 123644, doi:10.1016/J.COLSURFA.2019.123644.
107. De Oliveira, J.L.; Campos, E.V.R.; Pereira, A.E.S.; Nunes, L.E.S.; Da Silva, C.C.L.; Pasquoto, T.; Lima, R.; Smaniotto, G.; Polanczyk, R.A.; Fraceto, L.F. Geraniol Encapsulated in Chitosan/Gum Arabic Nanoparticles: A Promising System for Pest Management in Sustainable Agriculture. *J Agric Food Chem* **2018**, 66, 5325–5334, doi:10.1021/acs.jafc.8b00331.
108. Hasani, M.; Hasani, S. Nano-Encapsulation of Thyme Essential Oil in Chitosan-Arabic Gum System: Evaluation of Its Antioxidant and Antimicrobial Properties. *Trends in Phytochemical Research (TPR) Trends Phytochem. Res* **2018**, 2, 75–82.
109. Rinaudo, M. Chitin and Chitosan: Properties and Applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)* **2006**, 31, 603–632, doi:10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001.
110. Bordi, F.; Chronopoulou, L.; Palocci, C.; Bomboi, F.; Di Martino, A.; Cifani, N.; Pompili, B.; Ascenzioni, F.; Sennato, S. Chitosan-DNA Complexes: Effect of Molecular Parameters on the Efficiency of Delivery. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* **2014**, 460, 184–190, doi:10.1016/j.colsurfa.2013.12.022.
111. Jones, O.G.; McClements, D.J. Functional Biopolymer Particles: Design, Fabrication, and Applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2010, 9, 374–397.
112. Beyer, M.; Reichert, J.; Heurich, E.; Jandt, K.D.; Sigusch, B.W. Pectin, Alginate and Gum Arabic Polymers Reduce Citric Acid Erosion Effects on Human Enamel. *Dental Materials* **2010**, 26, 831–839, doi:10.1016/j.dental.2010.04.008.
113. Rabelo, R.S.; Tavares, G.M.; Prata, A.S.; Hubinger, M.D. Complexation of Chitosan with Gum Arabic, Sodium Alginate and κ -Carrageenan: Effects of PH, Polymer Ratio and Salt Concentration. *Carbohydr Polym* **2019**, 223, 115120, doi:10.1016/J.CARBPOL.2019.115120.
114. Sabet, S.; Rashidinejad, A.; Melton, L.D.; Zujovic, Z.; Akbarinejad, A.; Nieuwoudt, M.; Seal, C.K.; McGillivray, D.J. The Interactions between the Two

- Negatively Charged Polysaccharides: Gum Arabic and Alginate. *Food Hydrocoll* **2021**, *112*, 106343, doi:10.1016/J.FOODHYD.2020.106343.
115. Weinbreck, F.; Tromp, R.H.; de Kruif, C.G. Composition and Structure of Whey Protein/Gum Arabic Coacervates. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 1437–1445, doi:10.1021/bm049970v.
 116. Gulão, E. da S.; de Souza, C.J.F.; da Silva, F.A.S.; Coimbra, J.S.R.; Garcia-Rojas, E.E. Complex Coacervates Obtained from Lactoferrin and Gum Arabic: Formation and Characterization. *Food Research International* **2014**, *65*, 367–374, doi:10.1016/j.foodres.2014.08.024.
 117. Yeh, H.Y.; Lin, J.C. Surface Characterization and in Vitro Platelet Compatibility Study of Surface Sulfonated Chitosan Membrane with Amino Group Protection-Deprotection Strategy. *J Biomater Sci Polym Ed* **2008**, *19*, 291–310, doi:10.1163/156856208783720985.
 118. de Moraes, W.A.; Silva, G.T.M.; Nunes, J.S.; Wanderley Neto, A.O.; Pereira, M.R.; Fonseca, J.L.C. Interpolyelectrolyte Complex Formation: From Lyophilic to Lyophobic Colloids. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* **2016**, *498*, 112–120, doi:10.1016/J.COLSURFA.2016.03.052.
 119. Aveyard, R.; Binks, B.P.; Clint, J.H. Emulsions Stabilised Solely by Colloidal Particles. *Adv Colloid Interface Sci* **2003**, *100–102*, 503–546, doi:10.1016/S0001-8686(02)00069-6.
 120. Blute, I.; Pugh, R.J.; van de Pas, J.; Callaghan, I. Industrial Manufactured Silica Nanoparticle Sols. 2: Surface Tension, Particle Concentration, Foam Generation and Stability. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* **2009**, *337*, 127–135, doi:10.1016/j.colsurfa.2008.12.009.
 121. Dave, P.N.; Gor, A. *Natural Polysaccharide-Based Hydrogels and Nanomaterials: Recent Trends and Their Applications*; Elsevier Inc., 2018; ISBN 9780128133514.
 122. Prasad, N.; Thombare, N.; Sharma, S.C.; Kumar, S. Gum Arabic – A Versatile Natural Gum: A Review on Production, Processing, Properties and Applications. *Ind Crops Prod* **2022**, *187*, 115304, doi:10.1016/J.INDCROP.2022.115304.

123. Ocak, B. Gum Arabic and Collagen Hydrolysate Extracted from Hide Fleshing Wastes as Novel Wall Materials for Microencapsulation of Origanum Onites L. Essential Oil through Complex Coacervation. *Environmental Science and Pollution Research* **2020**, 27, 42727–42737, doi:10.1007/S11356-020-10201-8/METRICS.
124. Rahman Mazumder, M.A.; Ranganathan, T.V. Encapsulation of Isoflavone with Milk, Maltodextrin and Gum Acacia Improves Its Stability. *Curr Res Food Sci* **2020**, 2, 77–83, doi:10.1016/J.CRFS.2019.12.003.
125. Rahman Mazumder, M.A.; Ranganathan, T.V. Encapsulation of Isoflavone with Milk, Maltodextrin and Gum Acacia Improves Its Stability. *Curr Res Food Sci* **2020**, 2, 77–83, doi:10.1016/J.CRFS.2019.12.003.
126. Bayramoglu, E.E. Unique Biocide for the Leather Industry; Essential Oil of Oregano. *Journal of the American Leather Chemists Association* **2007**, 102, 347–352.
127. ELtai, N.O.; Salisbury, V.; Greenman, J. Efficacy of Oregano Oil as a Biocide Agent against Pathogens in Vitro, Using Lux Reporter Gene Technology. *Afr J Microbiol Res* **2015**, 9, 2172–2182, doi:10.5897/AJMR2015.7646.