



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

DESARROLLO DE MICROCÁPSULAS DE FRAGANCIAS CON MATERIALES DE ALTA DISPONIBILIDAD COMERCIAL PARA SU USO EN DETERGENCIA



GRUPO CARINSA®



Alex Ayala Garcia

Tesis Doctoral

Doctorado Industrial en Ciencia de Materiales

Directores: Dr. Daniel Ruiz Molina

Dr. Claudio Roscini

Tutor: Dr. Jordi Hernando Campos

Programa de Ciència de Materials

Departament de Química

Facultad de Ciències, UAB

2019

DESARROLLO DE MICROCÁPSULAS DE FRAGANCIAS CON MATERIALES DE ALTA DISPONIBILIDAD COMERCIAL PARA SU USO EN DETERGENCIA

Memoria presentada para la obtención de la mención de Doctor en Ciencia de Materiales y Doctorado Industrial

Por:

Alex Ayala Garcia

Supervisado por:

Dr. Claudio Roscini: Senior Researcher, Nanostructured Functional Materials

Dr. Daniel-Ruiz Molina: Group Leader, Nanostructured Functional Materials

Cristóbal Bernal Labrador: Director técnico división perfumería de CARINSA

Tutor: Dr. Jordi Hernando Campos

Bellaterra, 20 de Febrer de 2019

Programa de Ciencia de Materials

Departament de Química

Universitat Autònoma de Barcelona

El trabajo descrito en la presente Tesis se ha llevado a cabo gracias a la colaboración de las siguientes instituciones:

- **Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca de la Generalitat de Catalunya (AGAUR).** Por la concesión de una beca de cofinanciación (Doctorat Industrial) para la realización de esta Tesis Doctoral 2015-2019.
- **Creaciones Aromáticas Industriales, S.A.** Por su contratación para llevar a cabo este proyecto de doctorado industrial.



“Choose not a life of imitation”

Red Hot Chili Peppers, Can't Stop

*A mi familia, amigos y a toda la gente
que ha estado a mi lado en esta aventura*

Gracias a todos

AGRADECIMIENTOS

Primero de todo me gustaría expresar mi agradecimiento a Creaciones Aromáticas Industriales, S.A. por la confianza depositada en mí en el momento de la elección de mi candidatura. En especial me gustaría agradecer a la señora Denia Martínez, subdirectora de la empresa, por su genial trato y cercanía y por ser mi principal valedora. Por supuesto, también quiero dar las gracias al señor Cristobal Bernal por su supervisión del proyecto dentro de la empresa y por la simpatía siempre mostrada hacia mi persona. También quiero mostrar mi agradecimiento a Vanesa Martínez, CEO de la compañía, por su visión de futuro y su ferviente apuesta por la I+D.

De CARINSA también me gustaría acordarme de todo el personal que me ha ayudado a nivel técnico en el proyecto y ha dedicado su tiempo para explicarme de la mejor manera el sector de las fragancias. Así pues, agradecer a Albert Puigpinós su ayuda en los procesos de escalado, a Jordi Picart, por los estudios de cromatografía de gases, a Sebastien Lacouture por su importante aportación sobre las fragancias y productos de mercado y a Lola Muñoz por sus conocimientos en aplicaciones y formulaciones en detergencia.

Por otro lado, al Instituto de Nanociencia i Nanotecnología de Cataluña (ICN2) también le debo mucho de lo que se muestra en esta Tesis, tanto a nivel técnico como personal. Primero de todo me gustaría agradecer al Dr. Daniel Ruiz, *group-leader* de Nanosfun por su confianza, su interés y su seguimiento durante este proyecto. Él junto a Denia Martinez han sido los que han hecho posible la realización de este proyecto y esta Tesis doctoral. Otra persona muy importante en el proyecto para mí es el Dr. Claudio Roscini, al cual conozco desde el año 2012 y me introdujo por primera vez en el campo de la microencapsulación. Claudio ha sido el responsable de reconducir muchos aspectos técnicos en los que la investigación se podía torcer así como también me ha exigido para mejorar en muchos aspectos del día a día.

También me llevo una gran experiencia con el resto de compañeros de NANOSFUN, sobretodo los que han trabajado en los laboratorios del CM3. Muchas gracias a Bea García, Héctor Torres, Alex Julià, Christian Bellacanzone y Pablo González por mantener desde el primer día una gran complicidad y un gran compañerismo. Agradecer también su aportación a los compañeros que ya marcharon del CM3 como son Giuseppina Massaro, Emmanuella Verdini, Maria Cifuentes, o Laura Alberó entre otros. También estoy agradecido a todo el resto de personal que está o ha pasado por el grupo de investigación. Muchas gracias a Salvio Suárez, Jaume Otaegui, Miguel Ángel, Josep Sedó, Fernando Novio, Javier García, Fabiana Nador, Juan Mancebo, Jon Vilasau, Adarsh Nassarayeri, Payam Hayati, David Montpeyó, Rubén Solórzano, a las Carolinas y a todos los estudiantes que han participado en el grupo. He aprendido mucho de cada uno de ellos.

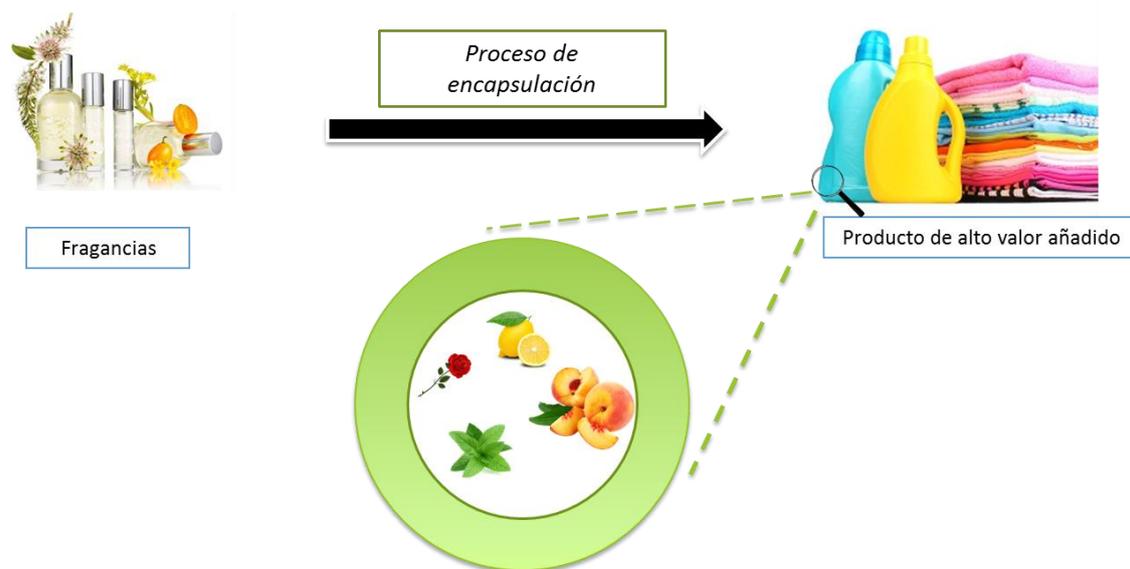
Más allá de CARINSA y de NANOSFUN, otros miembros del ICN2 también han aportado su granito de arena en este proyecto. Tengo que agradecer la implicación a todo el personal involucrado en mi formación en técnicas de caracterización y quiero dar las gracias especialmente a Javier Saiz Poseu tanto por la enseñanza en distintas técnicas como también por la gran amistad forjada, que ha resultado en un proyecto musical fantástico. No quiero olvidarme tampoco del equipo del Servei de Microscopía Electrònica y en especial de Marcos Rosado por su profesional soporte técnico en SEM y por su buen rollo.

Por último me gustaría dar las gracias a mis seres más queridos en esta última parte. A mis padres, por su ayuda en muchos aspectos del día a día y por darme el impulso necesario para cumplir esta y otras metas en la vida. A Bianca, por su apoyo diario y por su comprensión en los momentos más duros y difíciles a nivel anímico durante el proyecto. Y por supuesto, a mis amigos, els #amicsquesonfamilia, por estar siempre ahí y ser tan cojonudos. Muchas gracias Carles, Cristina, Xavi, Laura, Venta, Eli, Tiscar, Christian, Abigail, Noemí, Miki, Toni, Nerea, Edu, Ricky...sin ellos la vida sería mucho más aburrida.

Os doy las gracias a todos, de corazón.

RESUMEN

El sector de la perfumería, en el que CARINSA posee un largo recorrido, está en constante evolución y cada vez más involucrado en la investigación y desarrollo de nuevos tipos de productos. Una de las tecnologías que se han introducido en las últimas décadas es la microencapsulación, sobretodo destinada al ámbito de la detergencia. La encapsulación de fragancias consiste en un proceso de síntesis mediante el cual éstas son recubiertas con una corteza polimérica y posteriormente introducidas en un producto de aplicación. En los últimos años se ha aplicado esta tecnología en prácticamente todos los productos pertenecientes a las grandes compañías del sector. El interés por este tipo de tecnología y los buenos resultados ofrecidos han motivado a numerosas compañías a producir sus propios microencapsulados, observándose además en los últimos años la publicación de gran número de patentes en relación a procesos y tecnologías de encapsulación. Estos procesos de encapsulación han demostrado en muchos casos ser económicos y le aporta al compuesto a encapsular un alto valor añadido.



La cantidad de materiales y metodologías de encapsulación que existen a día de hoy son numerosas y por lo tanto difícilmente todas acaban llegando al mercado, ya sea por su inviabilidad económica o la dificultad de industrialización. Las microcápsulas de fragancias producidas en mayor cantidad para el mercado son las basadas en aminoresinas, siendo la melamina-formaldehído la más importante por su buen rendimiento y su bajo coste. No obstante, la presencia de formaldehído en estos productos no es respetuosa con la salud a pesar de los continuos avances para disminuir sus niveles. Por ello resulta de especial interés desarrollar microcápsulas con otros materiales que puedan competir con el actual producto de referencia.

Otra de las tendencias actuales referentes al impacto ambiental se basa en desarrollar sistemas con la mayor biodegradabilidad posible y que permitan aprovechar materiales de fuentes naturales, sin que eso encarezca excesivamente el producto final. Por todos los motivos comentados en este proyecto se seleccionó un abanico de materiales altamente disponibles comercialmente, entre los cuales biopolímeros, para llevar a cabo el proceso de encapsulación sin que esto supusiera un retroceso de competitividad ante los productos ya comerciales.

En este proyecto se trabajó en tres técnicas para la encapsulación de núcleos de carácter hidrófobo como son las fragancias y algunos aceites. Estas técnicas son:

1. Polimerización *in-situ*: para la elaboración de cápsulas de fragancia con resina melamina-formaldehído y tomadas como referencia para el resto de cápsulas desarrolladas.
2. Polimerización interfacial: Para la síntesis de cápsulas de poliamida mediante un proceso de polimerización rápido y de bajo gasto energético.
3. Coacervación compleja: Para el desarrollo de cápsulas biodegradables y biocompatibles con el uso de biopolímeros. Esta técnica fue a la que más tiempo se le dedicó en el transcurso de la tesis por el alto valor añadido de este tipo de microcápsulas.

Tabla de contenidos

| | |
|---------------------------|------|
| Tabla de Contenidos | i-vi |
|---------------------------|------|

| | |
|---------------------|----------|
| Abreviaciones | vii-viii |
|---------------------|----------|

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

| | |
|--|----|
| 1.1. Descripción del consorcio/colaboración | 3 |
| 1.1.1. CARINSA | 3 |
| 1.1.2. Institut Català de Nanociència i Nanotecnologia | 5 |
| 1.2. Mercado de deterencia | 8 |
| 1.3. Fragancias | 10 |
| 1.3.1. Extracción de fragancias | 10 |
| 1.3.2. Síntesis de fragancias | 12 |
| 1.3.3. Clasificación de fragancias | 13 |
| 1.3.4. Producción | 14 |
| 1.4. Microencapsulación: mercado global..... | 16 |
| 1.5. Microencapsulación: fundamentos | 19 |
| 1.5.1. Estructuras y componentes | 19 |
| 1.5.2. Parámetros cuantitativos..... | 21 |
| 1.5.3. Técnicas de encapsulación..... | 22 |
| 1.5.3.1. Métodos físicos..... | 23 |
| 1.5.3.2. Métodos químicos | 25 |
| 1.5.3.3. Métodos físico-químicos..... | 30 |
| 1.6. Contextualización y plan de trabajo de la tesis doctoral..... | 33 |
| 1.7. Referencias | 37 |

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

| | |
|---------------------|----|
| 2.1. Objetivos..... | 45 |
|---------------------|----|

CAPÍTULO 3. ENCAPSULACIÓN POR POLIMERIZACIÓN *IN-SITU*

| | | |
|----------|--|----|
| 3.1. | Introducción | 49 |
| 3.1.1 | Datos de mercado | 50 |
| 3.1.1.1 | <i>Melamina</i> | 50 |
| 3.1.1.2 | <i>Formaldehído</i> | 50 |
| 3.1.2. | Toxicidad del formaldehído | 51 |
| 3.1.3. | Estrategias de control del formaldehído | 53 |
| 3.1.3.1. | <i>Atrapadores de formaldehído</i> | 53 |
| 3.1.3.2. | <i>Sustitutos del formaldehído</i> | 54 |
| 3.1.4. | Polimerización en los procesos de encapsulación | 55 |
| 3.1.4.1. | <i>Preparación del prepolímero</i> | 55 |
| 3.1.4.2. | <i>Polimerización y curado</i> | 55 |
| 3.1.4.3. | <i>Otros requerimientos para la encapsulación de núcleos hidrofóbicos</i> | 55 |
| 3.1.5. | Principales características de las cápsulas MF | 58 |
| 3.2. | Encapsulación de un aceite monocomponente | 61 |
| 3.2.1. | Selección de aceite, síntesis y optimización | 61 |
| 3.3. | Encapsulación de fragancias simples | 67 |
| 3.3.1. | Síntesis iniciales..... | 67 |
| 3.3.2. | Optimización de parámetros para la encapsulación de la fragancia APPLE | 67 |
| 3.4. | Encapsulación de fragancia compleja | 70 |
| 3.4.1. | Optimización de síntesis con fragancias complejas mediante la mezcla con aceites..... | 70 |
| 3.4.2. | Optimización de síntesis con fragancias complejas mediante el uso de polielectrolitos y/o estabilizantes | 71 |
| 3.5. | Conclusiones y futuro trabajo..... | 80 |
| 3.6. | Referencias..... | 81 |

CAPÍTULO 4. ENCAPSULACIÓN POR POLIMERIZACIÓN INTERFACIAL

| | | |
|------|--------------------|----|
| 4.1. | Introducción | 85 |
|------|--------------------|----|

| | | |
|----------|--|-----|
| 4.1.1. | Estado del arte | 85 |
| 4.1.2. | Reacción de policondensación | 86 |
| 4.1.3. | Encapsulación mediante la polimerización interfacial..... | 87 |
| 4.1.4. | Objetivos específicos en microcápsulas de poliamida | 90 |
| 4.2. | Encapsulación de un aceite monocomponente | 91 |
| 4.2.1. | Síntesis | 91 |
| 4.2.2. | Lavados..... | 92 |
| 4.2.3. | Caracterización de cápsulas de aceite | 93 |
| 4.3. | Encapsulación de fragancias simples | 95 |
| 4.3.1. | Síntesis de cápsulas con fragancias simples adaptadas al proceso de polimerización interfacial | 95 |
| 4.3.2. | Reducción de tamaño | 99 |
| 4.3.2.1. | <i>Primeras pruebas</i> | 99 |
| 4.3.2.2. | <i>Selección del tipo de PVA y su concentración óptima en la fase acuosa</i> | 101 |
| 4.3.2.3. | <i>Relación entre la velocidad de emulsificación y tamaño obtenido</i> | 103 |
| 4.3.3. | Modificación de la corteza para la mejora de la estanqueidad | 104 |
| 4.4. | Encapsulación de fragancia compleja | 108 |
| 4.5. | Conclusiones y futuro trabajo | 113 |
| 4.6. | Referencias..... | 114 |

CAPÍTULO 5. ENCAPSULACIÓN POR COACERVACIÓN COMPLEJA

| | | |
|--------|--|-----|
| 5.1. | Introducción | 119 |
| 5.1.1. | Biopolímeros seleccionados para la encapsulación | 119 |
| 5.1.2. | Interacción goma arábica-gelatina..... | 122 |
| 5.1.3. | Factores que afectan a la separación de fases (coacervación) | 123 |
| 5.2. | Encapsulación por coacervación compleja | 126 |
| 5.2.1. | Disolución de los polímeros | 126 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 5.2.2. | Emulsión..... | 127 |
| 5.2.3. | Proceso de coacervación..... | 128 |
| 5.2.4. | Gelificación de la corteza | 128 |
| 5.2.5. | Endurecimiento del polímero de corteza | 129 |
| 5.3. | Encapsulación de un aceite monocomponente | 134 |
| 5.3.1. | Optimización de las condiciones para la encapsulación de Miglyol | 134 |
| 5.3.1.1. | <i>Efecto de la agitación/emulsión sobre la estructura de la microcápsula</i> | 135 |
| 5.3.1.2. | <i>Tiempos necesarios para las etapas de encapsulación</i> | 141 |
| 5.3.1.3. | <i>Selección del tipo de gelatina para la encapsulación.....</i> | 141 |
| 5.3.1.4. | <i>Ajuste del pH óptimo para la coacervación.....</i> | 142 |
| 5.3.1.5. | <i>Orden de los reactivos y etapas de síntesis.....</i> | 143 |
| 5.3.1.6. | <i>Uso de tensioactivos.....</i> | 143 |
| 5.3.2. | Síntesis optimizada para la encapsulación de Miglyol y caracterización morfológica .. | 144 |
| 5.3.3. | Purificación de las microcápsulas | 146 |
| 5.3.4. | Aislamiento de las microcápsulas | 148 |
| 5.3.5. | Determinación de la cantidad de aceite de las cápsulas | 152 |
| 5.3.5.1. | <i>Método de ruptura y extracción del aceite liberado.....</i> | 152 |
| 5.3.5.2. | <i>Cuantificación del aceite por ¹H-RMN.....</i> | 155 |
| 5.4. | Encapsulación de fragancias simples | 156 |
| 5.4.1. | Encapsulación de la fragancia APPLE | 156 |
| 5.4.2. | Encapsulación de limoneno y acetato de bencilo..... | 158 |
| 5.4.3. | Estudios para la mejora de la carga útil de limoneno..... | 162 |
| 5.4.3.1. | <i>Detección del mecanismo de pérdida de fragancia</i> | 163 |
| 5.4.3.2. | <i>Mejoras para incrementar la carga útil de limoneno de las cápsulas</i> | 167 |
| 5.4.4. | Reducción del tamaño de cápsulas de limoneno..... | 176 |
| 5.5. | Encapsulación de fragancia compleja | 183 |
| 5.6. | Conclusiones y futuro trabajo | 186 |
| 5.7. | Referencias..... | 187 |

CAPÍTULO 6. ESCALADO DE LOS MÉTODOS DE ENCAPSULACIÓN

| | |
|--|-----|
| 6.1. Introducción | 191 |
| 6.2. Escalado del método de polimerización <i>in-situ</i> | 192 |
| 6.3. Escalado del método de polimerización interfacial | 198 |
| 6.3.1. Optimización del proceso de escalado | 198 |
| 6.3.2. Síntesis optimizada | 203 |
| 6.4. Escalado del método de coacervación compleja | 205 |
| 6.4.1. Escalado de cápsulas mononucleares $\geq 50 \mu\text{m}$ | 207 |
| 6.4.2. Escalado de cápsulas mononucleares $< 50 \mu\text{m}$ | 211 |
| 6.5. Observaciones técnico-económicas de los procesos de encapsulación | 214 |
| 6.6. Conclusiones | 216 |

CAPÍTULO 7. APLICACIONES

| | |
|--|-----|
| 7.1. Introducción | 221 |
| 7.2. Estabilización de cápsulas para su uso en detergencia | 221 |
| 7.2.1. Estabilidad y resistencia de las cápsulas al pH | 221 |
| 7.2.2. Estabilización de las suspensiones en combinación con polielectrolitos y modificadores reológicos | 224 |
| 7.2.2.1. <i>Estudio del efecto de la presencia de polielectrolitos en la estabilidad de las cápsulas</i> | 225 |
| 7.2.2.2. <i>Estabilidad mediante el uso de modificadores de viscosidad</i> | 228 |
| 7.3. Aplicación de microcápsulas en tejidos | 230 |
| 7.3.1. Aplicaciones en baños de agua | 231 |
| 7.3.2. Estudio para una aplicación por pulverización | 237 |
| 7.4. Conclusiones | 239 |
| 7.5. Referencias | 240 |

CAPÍTULO 8. ESTUDIO DE PRODUCTOS COMERCIALES (BENCHMARKING)

| | | |
|-------|--|-----|
| 8.1 | Análisis de suspensiones de cápsulas de mercado | 243 |
| 8.1.1 | Análisis morfológico mediante microscopía | 243 |
| 8.1.2 | Aspecto macroscópico y concentración | 245 |
| 8.2 | Caracterización de suavizantes con cápsulas..... | 245 |
| 8.3 | Contaje de cápsulas con cámara Neubauer..... | 249 |
| 8.4 | Caracterización por SEM tras la aplicación en tejido | 252 |
| 8.5 | Conclusiones | 253 |

CAPÍTULO 9. CONCLUSIONES GENERALES

| | | |
|-----|------------------------------|-----|
| 8.1 | Conclusiones generales | 257 |
|-----|------------------------------|-----|

ANEXO I. PARTE EXPERIMENTAL (PROCOLOS)

ANEXO II. FORMULACIONES DE FRAGANCIAS UTILIZADAS

Abreviaciones

| | | | |
|--------------------|---|-------------------------------------|---|
| %p/p | Tanto por ciento en peso | MZ | Técnica de Mastersizer |
| %v/v | Tanto por ciento en volúmen | Na ₂ SO ₄ Anh | Sulfato de sodio anhidro |
| °C | Grados centígrados | NaTPP | Tripolifosfato de sodio |
| ¹ H-RMN | Resonancia magnética nuclear de protón | NFC | Celulosa nanofibrilada |
| APPLE | Fragancia Apple TOP FCAP | O/W | Emulsión aceite en agua |
| BnAc | Acetato de Bencilo | O/W/O | Emulsión aceite en agua en aceite |
| CDCl ₃ | Cloroformo deuterado | OM | Microscopía óptica |
| C-L | <i>Cross-linking</i> o entrecruzamiento | PA | Poliamida |
| DETA | Dietilentriamina | PPD | p-fenilendiamina |
| DMF | Dimetilformamida | PU | Poliuretano |
| DSC | Calorimetría diferencial de barrido | PVA | Alcohol polivinílico |
| EDA | Etilendiamina | rpm | Revoluciones por minuto |
| EtOH | Etanol | SC | Cloruro de sebacoilo |
| For | Formaldehído | SDBS | Dodecil bencensulfonato de sodio |
| GA | Goma arábica | SDS | Dodecil sulfonato de sodio |
| GA _{sol} | Solución acuosa goma arábica | SEM | Microscopía electrónica de Barrido |
| GC-MS | Cromatografía de gases con espectrometría de masas acoplado | SMA | Co-polímero de estireno y maleico anhidro |
| GEL | Gelatina | T | Temperatura |
| GEL/GA | Sistema gelatina-goma arábica | TA | Ácido tánico |
| GEL _{sol} | Solución acuosa de gelatina | TEA | Trietanolamina |
| HAc | Ácido Acético | TGA | Análisis termogravimétrico |
| HMDA | Hexametildiamina | TM | Cloruro de trimesoilo |

| | | | |
|--------|-------------------------------|----------|--|
| IR | Espectroscopia de infrarrojos | TR | Cloruro de tereftaolilo |
| LIM | Limoneno | TROPICAL | Fragancia Tropical P780765 |
| Liof | Muestras liofilizadas | UF | Resina urea-formaldehído |
| Magn. | Agitación magnética | UV-VIS | Espectroscopia de ultravioleta-visible |
| Mel | Melamina | XG | Goma de xantano |
| MeOH | Metanol | | |
| MF | Resina melamina-formaldehído | | |
| MilliQ | Agua desionizada | | |

Capítulo 1.

Introducción

1.1. Descripción del consorcio/colaboración

La base de esta tesis doctoral, enmarcada dentro del programa de Doctorats Industrials (GENCAT), se ha llevado a cabo a través de una colaboración entre la empresa Creaciones Aromáticas Industriales S.A. (CARINSA) y el Institut Català de Nanociència i Nanotecnologia (CSIC-ICN2). Por un lado, CARINSA ha aportado su conocimiento en fragancias y formulaciones, y por el otro el ICN2 ha contribuido con su experiencia en técnicas de encapsulación y caracterización avanzadas. A continuación se describen brevemente los aspectos más relevantes de ambas entidades colaboradoras.

1.1.1. CARINSA

Creaciones Aromáticas Industriales S.A. (CARINSA, <https://www.carinsa.com/>) es una empresa familiar fundada el año 1993 en Barcelona. Actualmente su domicilio social se encuentra en Sant Quirze del Valles, donde se encuentran sus oficinas centrales y sus dos centros de fabricación.



Figura 1.1. Logo corporativo del grupo CARINSA.

La actividad principal de CARINSA es la creación, fabricación y comercialización de toda clase de aromas y fragancias. La actividad de la compañía se estructura en 3 divisiones principales:

- División de fragancias: dedicada a la creación y fabricación de perfumes para el sector de la detergencia, cosmética y ambientación.
- División de Alimentación Humana: centrada en la creación de aromas y fabricación para el sector de la alimentación humana.
- División Alimentación Animal: se ocupa del desarrollo y producción de productos destinados al sector de la alimentación animal.

La plantilla de CARINSA consta actualmente de 48 trabajadores y según los datos del ejercicio 2017, se fabricaron 1000 toneladas de aromas y 750 toneladas de fragancias, obteniéndose una facturación que ascendió a 44M € y un beneficio de 6.5M€.

La estrategia de la empresa se basa en tres pilares fundamentales:

1. **Internacionalización:** la empresa posee clara vocación internacional, exportando a más de 50 países.
2. **Diversificación especializada:** ofreciendo servicio integral a los clientes.
3. **Innovación:** la investigación y desarrollo de productos innovadores permite ofrecer soluciones con alto valor añadido. CARINSA invierte en I+D+i más del 20% de su presupuesto, teniendo más de 20 personas dedicadas a dichas actividades.

CARINSA dispone de laboratorios de I+D, de aplicaciones y de control de calidad dotados de equipamiento necesario para el desarrollo de sus actividades, pudiéndose destacar: un laboratorio para el diseño y preparación de fragancias y detergentes, cabinas de análisis sensorial, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas equipado con *Head-Space* (GC-MS), cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y microscopía óptica.

CARINSA considera la realización de proyectos I+D la base que permite reafirmar el crecimiento de la empresa durante los próximos años. La compañía se encuentra ampliamente implementada en el tejido I+D nacional, colaborando activamente con otras empresas y centros tecnológicos, reduciendo la distancia que determina la implantación de investigación básica a nivel industrial. A continuación se destacan algunos de los proyectos de investigación más destacados de la división de perfumería:

- IDI-20130466: TOTALCAP, “Sistemas de microencapsulación de fragancias alternativos a la melamina-formaldehído para uso en productos de cuidado del hogar” (2013-2015, CDTI).
- RTC-2014-2183-5: QUATFORFRAG, “Aplicación de la tecnología Quatsomes para el desarrollo de una nueva gama de suavizantes perfumados con menor impacto medioambiental” (2014-2016, MINECO, Retos-Colaboración).
- RD14-1-0049: PERFUMIC, “Perfums higienitzants basats en ingredients de síntesi biotecnològica” (2014-2016, ACCIÓ).
- IDI-20150920: FLYFRAG, “Desarrollo de nuevos productos con actividad repelente frente a los vectores *Aedes sp* y *Anopheles sp*” (2015-2017, CDTI).
- IDI-20150929: ACTIVEODOR, “Desarrollo de nuevos materiales para aromaterapia en interior de vehículos” (2015-2017, CDTI).
- **IPT-2012-1125-420000: MICROFRAG, “Microencapsulación funcionalizada de fragancias para la formulación en suavizantes” (2012-2015, MINECO, INNPACTO).**
- SME-2015-0690: NANOFRAG, “Functionalized nanoencapsulated fragrances for fabric softeners” (2015, MINECO, Horizonte PYME).

- RTC-2016-5670-1: MICROREP, “Microcápsulas inteligentes con repelentes de mosquitos y fragancias en aplicación en textiles que eviten la propagación de enfermedades tropicales” (2016-2019, MINECO, Retos-Colaboración).

La mayoría de los proyectos presentados en la lista están relacionados con sistemas de encapsulación y fragancias funcionales, lo cual demuestra el interés de CARINSA en explorar este tipo de productos y las posibilidades que pueden ofrecer. Especial mención requiere el proyecto MICROFRAG, cuyos resultados han servido como punto de partida para el desarrollo de cápsulas de poliamida que se mostrarán en el **Capítulo 4**.

A mediados de 2017, CARINSA obtuvo la ayuda de *SME-Instrument* de la Comisión Europea (CE) mediante la cual podrá poner en marcha su propia fábrica de encapsulación de fragancias e iniciar las actividades de su nueva plataforma de encapsulación CARINCAP®. Mediante el conocimiento adquirido en todos los proyectos antes mencionados, y los próximos a desarrollar, se abre una gran oportunidad para establecer esta nueva línea de producción de cápsulas con aplicación en varios campos como la industria cosmética, de cuidado del hogar o la alimentación.

En el mercado de las fragancias existe una constante evolución y la clave para liderarlo consiste en la investigación continua de nuevos productos y procesos que respondan a las nuevas tendencias del mercado. Por eso, CARINSA apuesta por la búsqueda y desarrollo de nuevos productos mediante una intensa actividad de I+D+i tanto interna (mediante sus laboratorios) como externa (a través de colaboración con empresas y centros tecnológicos y universidades).

1.1.2. Institut Català de Nanociència i Nanotecnologia

El edificio del Instituto Catalán de Nanociencia y Nanotecnología (ICN2, <http://icn2.cat/>) en el Campus de la UAB se inauguró oficialmente en enero de 2014, culminando la unión de dos instituciones que ya atesoraban 10 años de experiencia: el Institut Català de Nanotecnologia (ICN-Generalitat de Catalunya) y Centro de Investigación en Nanociencia y Nanotecnologia (CIN2-CSIC). Esta sinergia aumentó el potencial científico e impacto, los recursos económicos y la competitividad del Instituto, que fue galardonado en 2014 con el reconocimiento como Centro de Excelencia Severo Ochoa y recientemente forma parte del Barcelona Institute of Science and Technology (BIST).



Figura 1.2. Edificio ICN2 en el campus de la Universitat Autònoma de Barcelona.

El objetivo del ICN2 es lograr el máximo nivel de excelencia científica y tecnológica en el ámbito de la nanociencia y de la nanotecnología. Con el fin de conseguir dichos logros, el ICN2 trabaja actualmente en:

1. Investigación en ciencia básica

Principalmente nanociencia a través de proyectos colaborativos nacionales y europeos. El ICN2 se ha situado en poco tiempo entre los mejores institutos de investigación españoles y ha conseguido financiación por el programa de investigación competitiva 7PM (Séptimo Programa Marco) de la Unión Europea. Además, sus científicos (procedentes de más de 27 nacionalidades diferentes) realizan investigación de alto nivel y son titulares de numerosas becas y premios de prestigio. Los trabajos se publican en revistas de alto impacto como Science, Nature International Edition, Nature Nanotechnology, Chemical Reviews, Physical Review Letters, Angewandte Chemie, International Nano Letters o Advanced Materials entre otros.

2. Investigación industrial basada en nanotecnología

El ICN2 mantiene una intensa actividad de transferencia de tecnología con empresas privadas a través de servicios o proyectos de colaboración. De esta unión se han desarrollado numerosas patentes y han salido al mercado algunos productos basados en micro- y nanotecnología.

➤ Nanostructured Functional Materials (NANOSFUN)

Dentro del ICN2, el grupo **NANOSFUN** (<http://nanosfun.icn2.cat/>), formado ahora hace más de 10 años, ha crecido como un equipo multidisciplinar de PhD y tecnólogos con conocimientos y formaciones muy complementarias en campos diferentes como la química, la ciencia de materiales, la física e ingeniería. A nivel de investigación, el grupo trabaja en el desarrollo de nuevos sistemas micro/nanoestructurados obtenidos principalmente por ensamblaje de moléculas (p.ej. polímeros)

orgánicas que aportan funcionalidades que no son posibles sin esta dimensión de tamaños. Las áreas de trabajo más representativas son:

- Fabricación de nanomateriales para nanomedicina.
- Síntesis de micro/nanomateriales fotofuncionales para ahorro y almacenamiento de energía.
- Síntesis de materiales basados en sistemas de coordinación .

A día de hoy el grupo es referente a nivel internacional en las áreas de trabajo anteriormente mencionadas, con una producción de 40 artículos científicos en los últimos cinco años, todos ellos de gran calidad y relevancia y publicados en revistas de alto índice de impacto (Chemical Society Reviews, Advanced Materials, Advanced Functional Materials, ACSnano, Chemistry of Materials, etc.). Además, los miembros han participado en múltiples congresos y reuniones nacionales e internacionales donde se han presentado los resultados de su investigación.

Además de la ciencia fundamental orientada, a lo largo de los últimos años también se ha establecido como un grupo de referencia en colaboraciones y proyectos de ciencia aplicada con el sector privado, en dos áreas fundamentales:

- 1. Micro-/nanoencapsulación de materiales de distinta naturaleza (aceites, fármacos, colorantes, etc).**
- 2. Fabricación de materiales fotocromáticos y termocromáticos.**

La investigación y desarrollo en estas áreas ha llevado a la presentación de cuatro patentes (tres de ellas ya licenciadas y/o presentadas) conjuntamente con una empresa y relacionadas con procesos de encapsulación y/o fotocromismo, habiéndose obtenido en los últimos 5 años una cantidad cercana a los 120.000 euros en concepto de licencias y regalías.

Además, del desarrollo de materiales fotocromáticos de rápida respuesta basados en encapsulación de disoluciones de fotocromos, se ha obtenido a un producto de gran interés industrial cuya puesta en el mercado se está llevando a cabo a través de un spin-off (Futurechromes, S.L.) que dos miembros del grupo han creado recientemente en conjunto con una inversión externa.

Los números que refuerzan la capacidad del grupo NANOSFUN para desarrollar estos trabajos son demostrativos. NANOSFUN acredita experiencia en numerosos proyectos colaborativos y contratos de servicios con empresas (Odotipo S.L., Henkel Ibérica S.A., Reverte Minerales S.A., ArtLens S.L. y ADAPTACOLOR S.A. entre otros), entre los cuales cabría destacar un proyecto INNPACTO liderado por CARINSA S.A., enfocado a procesos de microencapsulación de fragancias y finalizado terminado el año 2015 (MICROFRAG).

En números, en los últimos cinco años el grupo ha conseguido financiación de estos proyectos con empresas bien a través de convocatorias públicas (entre ellos tres proyectos de colaboración Retos/Innpacto) con una suma total que supera los 700.000 euros o bien a través de contratos directos con empresas, con una suma que supera los 500.000 euros. En paralelo a este proyecto de doctorado industrial, se está realizando otro perteneciente a la convocatoria 2015 con la spin-off antes mencionada. Además, recientemente el grupo ha obtenido un **Premio PIONER** otorgado por la Red de Centros de Investigación de Catalunya (CERCA) a la tesis doctoral de Nuria Vázquez, bajo la dirección del Prof. Daniel Ruiz. El premio distingue a investigadores que han desarrollado una tesis doctoral con claro potencial comercial. El premio fue entregado por la institución CERCA (Barcelona) el 17 de Diciembre de 2015. El grupo también ha recibido el reconocimiento a su tarea industrial a través del **Premio ASCAMM** de Innovación a la mejor colaboración científica que haya aportado unas ideas o proyectos industriales basados en el ámbito científico y con mejor proyección de transferencia tecnológica.

Todo esto sitúa al grupo en una situación privilegiada para afrontar cualquier reto tecnológico desde un punto de vista científico hasta su implementación en productos de interés industrial. Es importante remarcar que los conocimientos acumulados por NANOSFUN en relación a micro/nanoencapsulación están relacionados con las actividades del proyecto de esta tesis doctoral y serán de ayuda para su desarrollo

1.2. Mercado de detergencia

Tanto a nivel estatal como europeo, el mercado de los detergentes e higiene del hogar es un mercado bien asentado. El mercado en España para la detergencia, perfumería y cosmética alcanzó los 7.995 millones de euros en 2016 según el Instituto Nacional de Estadística (INE) y a nivel de Europa se situó en torno a los 35.000 millones de euros.

Los principales pilares en los que se mueven estos tipos de productos son la eficacia, la facilidad de uso, el precio, la seguridad para el usuario, y su impacto en el medio ambiente. Además, el mercado del hogar comprende productos muy variados. En general existe una gran variedad de formatos y formulaciones. En la detergencia de ropa, por ejemplo, se encuentran productos sólidos (polvos o pastillas) o líquidos. Los tipos de productos más usados en Europa Occidental en cuanto a detergencia se muestran en la **Figura 1.3**.

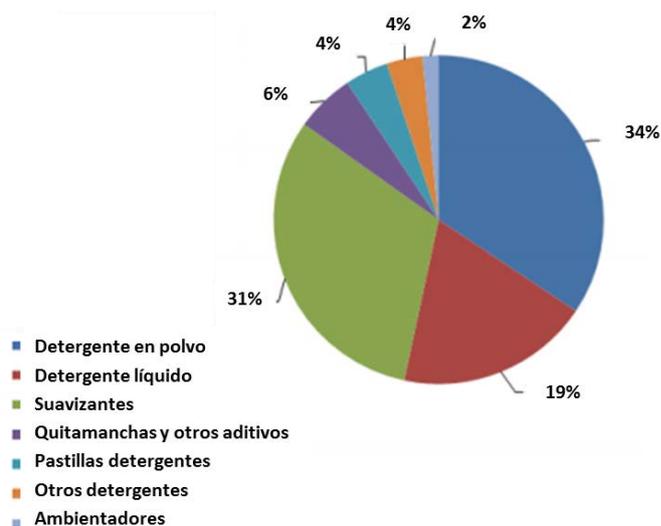


Figura 1.3. Distribución de los productos detergentes consumidos en Europa Occidental 2012 [1].

Como se puede apreciar en el gráfico, los suavizantes tienen un impacto muy grande en la industria de la detergencia. En Europa, la facturación respectiva a las ventas de suavizante rondó los 2.500 millones de euros en el año 2015. Aproximadamente 1.2 millones de toneladas de suavizante para la ropa se usan cada año en la Unión Europea, siendo utilizado por un 67% de la población.

Además, la tendencia del mercado europeo de los suavizantes marca un crecimiento anual de un 5% y unas ventas aproximadas de 11 mil millones de dólares para el año 2020 [2]. Por ello, se cree también conveniente establecer una serie de criterios para que estos productos tengan un menor impacto en el medio ambiente. Formulaciones con compuestos más biodegradables, disminución de la cantidad de fragancia libre o menos consumo de agua en el lavado, son algunas de las tendencias actuales del mercado [3]. Uno de los factores más importantes para los consumidores son las fragancias integradas en estos productos. De hecho, el 51% de los consumidores de todo el mundo declara que la fragancia del producto detergente tiene influencia alta o muy alta sobre su elección, mientras que para el 42% declara que tiene la misma influencia que el rendimiento. Con esta estadística, muchas de las compañías introducen nuevas fragancias en el mercado, añadiendo también tecnologías que aumentan la duración de las mismas en los productos (conocido como *long-lasting* en inglés) [1].

La demanda de nuevas fragancias es especialmente fuerte en Reino Unido (el mayor mercado de Europa en detergencia del hogar) donde un gran número de empresas han lanzado productos con nuevas fragancias año tras año. Esto ha dado pie a un incremento de la investigación en fragancias y su vehiculización en los productos de detergencia del hogar en toda Europa. Esto incluye la fuerza de la fragancia y su durabilidad, adaptándose siempre a los gustos de las diferentes regiones de Europa.

El actual proyecto pretende incidir en el mercado de los suavizantes de ropa mediante la incorporación de fragancias encapsuladas con el objetivo de mejorar su durabilidad una vez aplicadas y crear una liberación prolongada perceptible por el usuario.

1.3. Fragancias

Las fragancias o perfumes son mezclas de aceites esenciales, compuestos aromáticos o disolventes. Las fragancias tienen una identidad propia, única y estéticamente apropiada. El propósito de las fragancias en nuestra sociedad es la de aportar un olor agradable y reconocible mediante el sentido del olfato. La mayoría de estos compuestos son moléculas orgánicas que se pueden obtener principalmente mediante:

1. Extracción de aceites localizados en plantas.
2. Extracción de secreciones o fluidos de animales.
3. Síntesis químicas.

1.3.1. Extracción de fragancias

Desde hace miles de años los humanos han usado los aceites esenciales provenientes de las plantas, siendo aún a día de hoy la mayor fuente de compuestos fragrantés en perfumería. Los avances de la tecnología han permitido a la sociedad desarrollar metodologías para la extracción y aislamiento de estos aceites [4]. Las más conocidas se describen a continuación:

➤ Hidro-destilación:

La hidro-destilación (HD) es el método tradicional más antiguo para la extracción de aceites esenciales. El material a destilar se sumerge en agua en estado de ebullición, la cual penetra y arrastra los compuestos que son recolectados posteriormente por destilación. Este proceso requiere grandes cantidades de agua y tiempos muy largos lo que lo hace caro y poco efectivo.

➤ Destilación con vapor de agua:

Esta metodología es de las más utilizadas a nivel industrial y se usa para la extracción de compuestos sensibles a la temperatura. El vapor de agua a 100 °C es capaz de extraer y arrastrar compuestos volátiles con puntos de ebullición entre 150 y 300 °C. El vapor posteriormente se condensa y se obtiene una emulsión de los aceites esenciales en agua que luego es separada por decantación o destilación.

➤ Extracción con solvente:

También conocida como extracción líquido-líquido, es el método de separar un componente basado en su solubilidad. El método de extracción de solvente se usa en la extracción de aceites esenciales de plantas delicadas para producir grandes cantidades a un precio bajo. El componente se extrae mediante un disolvente que luego es evaporado. Los disolventes más comunes son etanol, metanol, éter etílico, acetona o hexano entre otros, que posteriormente se pueden recuperar por destilación y ser reutilizados. En contrapartida, los tiempos de extracción son largos y se consumen grandes cantidades de disolvente.

➤ Expresión (o exprimido):

La extracción se produce mediante el exprimido o prensado de la fuente. Este método es útil cuando el componente a obtener se encuentra en grandes cantidades.

➤ *Enfleurage*:

Este tipo de procedimiento consiste en una extracción de los compuestos mediante el uso de grasas absorbentes con bajas temperaturas de fusión. Tras esta absorción, se extrae el aceite oloroso retenido con alcohol u otros disolventes. La mezcla se destila bajo vacío, retirando todo el disolvente que pueda quedar, obteniéndose un aceite absoluto. Este proceso evita el trabajar a altas temperaturas y degradar los componentes.

La eficiencia de extracción de aceites esenciales depende de la técnica, de la naturaleza del producto y de la fuente de donde son extraídos. En la **Tabla 1.1** se muestran algunos ejemplos de extractos y su correspondiente precio de mercado.

| Producto | Material extraído (kg) de 1 T de producto | Precio de mercado (€/kg) | Fuente de extracción |
|----------------------|--|-----------------------------|----------------------|
| A.E. Rosa | 0.2-0.5 | 5.000 | Pétalos |
| Concreto de Jazmín | 2 | 3,000-5,000 | Pétalos |
| Manteca de orris | 0.1 | 9.000 | Raíces |
| Absoluto de tuberosa | 0.3 | 20.000 | Pétalos |
| A.E. Sándalo | 40-65 | 450 | Madera |
| A.E. Pachuli | 30 | 20-60 | Tallos |
| A.E. Jengibre | 40-44 | 75 | Raíces |
| A.E. Cedro | 30-35 | 20 | Madera |

Tabla 1.1. Datos del proceso de extracción y precio de diferentes fragancias [5].

Aunque la ingeniería de los procesos ha evolucionado dando lugar a procesos altamente eficientes, hay compuestos que mediante la extracción siguen teniendo un precio demasiado elevado, como por ejemplo el aceite esencial de rosa. Una de las alternativas en la industria para contrarrestar esto ha sido el desarrollo de procesos sintéticos para obtener moléculas responsables de los aromas y olores.

1.3.2. Síntesis de fragancias

Gracias a la evolución de la química orgánica se han logrado emular muchos de los compuestos que se encuentran en la naturaleza o, en su defecto, sintetizar nuevos compuestos con propiedades similares y que son imposibles de obtener mediante otras vías. Grandes compañías del sector de las fragancias dedican sus esfuerzos a sintetizar nuevas moléculas con propiedades fragrantas mediante una fuerte inversión en I+D y estrategias de protección de la propiedad intelectual mediante patentes. Algunas de las moléculas más utilizadas mundialmente de origen sintético se muestran en la **Tabla 1.2.**

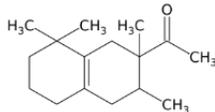
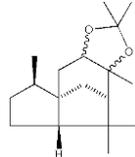
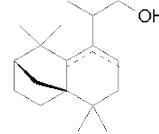
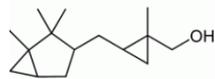
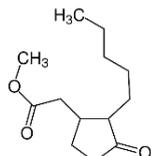
| Compuesto | Empresa | Molécula |
|-------------|-----------|---|
| Iso e Super | IFF |  |
| Ambrocenide | Symrise |  |
| Ambermax | Givaudan |  |
| Javanol | Givaudan |  |
| Hedione | Firmenich |  |

Tabla 1.2. Compuestos sintéticos propiedad de compañías del sector de las fragancias.

1.3.3. Clasificación de fragancias

Existen diferentes clasificaciones para la descripción de las fragancias aunque la más utilizada a día de hoy se basa en la rueda o círculo de las fragancias. En 1984, Michael Edwards diseñó la actual rueda de las fragancias que se ha convertido en un estándar para la industria [6]. En el campo de la enología, los profesionales usan, de hecho, este tipo de clasificación cuando identifican los compuestos aromáticos del vino.

Edwards ha modificado y perfilado su rueda de las fragancias varias veces hasta convertirla en una más precisa. La última revisión de 2010 engloba cuatro familias estándar (Floral, Oriental, Amaderada y Fresca) las cuales están divididas en tres o cuatro sub-grupos (**Figura 1.4**).



Figura 1.4. Actual versión de la rueda de las fragancias [6].

Otro tipo de clasificación para las fragancias es mediante la volatilidad de los compuestos detectados. Para ello se usa una clasificación gráfica denominada la pirámide olfativa que divide las percepciones en tres niveles según la intensidad y la persistencia (**Figura 1.5**).



Figura 1.5. Pirámide olfativa donde se muestran los tres niveles de clasificación de las notas percibidas [7].

- Las notas de salida son las primeras fragancias percibidas. Consisten en compuestos más volátiles, que se evaporan muy rápidamente y por ello se perciben muy intensamente, introduciendo al usuario en la fragancia y sirviendo como primera impresión. Las familias cítricas y aromáticas suelen ocupar esta posición de la pirámide.
- Las notas de cuerpo se perciben cuando las notas de salida desaparecen. Éstas son transitorias y persisten hasta que las de base empiezan a ser perceptibles. Se usan principalmente para esconder notas de base, las cuales necesitan tiempo para madurar y en algunos casos son desagradables al principio. Las familias verdes, florales o afrutadas son algunos ejemplos.
- Las notas de base constituyen el pilar de la fragancia. Son aromas duraderos que normalmente forman acordes con las notas de cuerpo y proporcionan a la fragancia longevidad, pudiendo llegar a durar hasta horas. Fragancias amaderadas u orientales son representativas de estas notas.

1.3.4. Producción

En el último año, la industria global de las fragancias ha facturado un total de 27.5 mil millones de dólares, creciendo un total de un 4.4% respecto al año anterior. La cuota de mercado dominada por los principales actores del sector ha pasado a ser de un 78%. Las compañías más relevantes y sus respectivos ingresos se muestran a continuación en la **Tabla 1.3**.

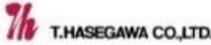
| Compañía | País | Ingresos (en millones de dólares) |
|---|----------|-----------------------------------|
|  | Suiza | \$4,600 |
|  | Suiza | \$3,100 |
|  | EE.UU. | \$3,100 |
|  | Alemania | \$3,050 |
|  | Japón | \$1,160 |
|  | Francia | \$1,112 |
|  | Israel | \$ 1,147 |
|  | EE.UU. | \$ 1,147 |
|  | Francia | \$ 492 |
|  | Japón | \$ 239 |

Tabla 1.3. Lista de las 10 empresas más grandes del sector de fragancias y aromas por orden de ingresos anuales [8].

Todas estas empresas, además, poseen un gran potencial en I+D. Como se ha mencionado en el apartado de mercado, la encapsulación es una de las líneas de investigación más actuales en el sector y estas compañías no han dejado pasar la oportunidad de convertirse en pioneras de estas tecnologías poseyendo la mayor parte de patentes del sector. Nombres como Mechachaps®, PopScent®, SymCap®, ManéCaps®, NeutraSensiCaps® son algunas marcas de cápsulas registradas por estas compañías.

Además, la investigación en formulaciones con microcápsulas es muy intensa y está enfocada en la incorporación de éstas en diferentes tipos de productos y en el desarrollo de distintos mecanismos de liberación (**Figura 1.6**).



Figura 1.6. Ejemplos de productos formulados con microcápsulas.

Con todo esto, queda patente que la microencapsulación es ya una tecnología disponible para productos de consumo y que se muestra como un pilar importante en las compañías de las fragancias y aromas. Por lo tanto, el poder competir con estas grandes empresas y obtener un producto diferencial con prestaciones mejoradas permite alcanzar un valor añadido importante.

1.4. Microencapsulación: Mercado global

El hecho de que las empresas de fragancias estén obteniendo beneficios gracias a las tecnologías de encapsulación, se ve reflejado en los datos de mercado de todo el mundo. A nivel global la micro/nanoencapsulación generó un total de 5.500 millones de dólares en ingresos el año 2015 y se prevé un crecimiento significativo para los siguientes 7-8 años en los sectores de la alimentación, en la detergencia y en la industria farmacéutica (Figura 1.7).

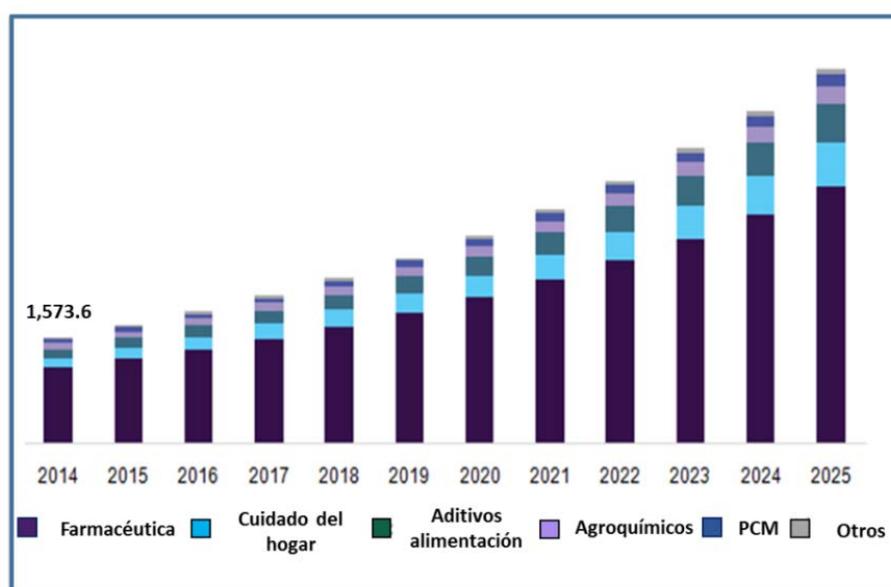


Figura 1.7. Previsión de crecimiento del mercado de microencapsulación para los próximos 10 años en EE.UU (valor en millones de dólares) [9].

La región con mayor producción de microcápsulas es América del Norte, con un 35% de cuota de mercado, orientada sobre todo al mercado de los aditivos alimenticios. En Europa, el crecimiento de este tipo de tecnologías también está siendo muy relevante y se espera un aumento anual de un 10% en la próxima década. Como se puede comprobar en el gráfico de la **Figura 1.8**, la mayor parte de la facturación en encapsulación pertenece a la industria farmacéutica ($\approx 75\%$) de la cual se prevee un crecimiento de un 11% anual. Las ventajas de estos productos son una liberación controlada y localizada de los medicamentos, el emmascaramiento del sabor y la protección del compuesto activo.

Mercado global de microencapsulación, por aplicación, 2015 (%)

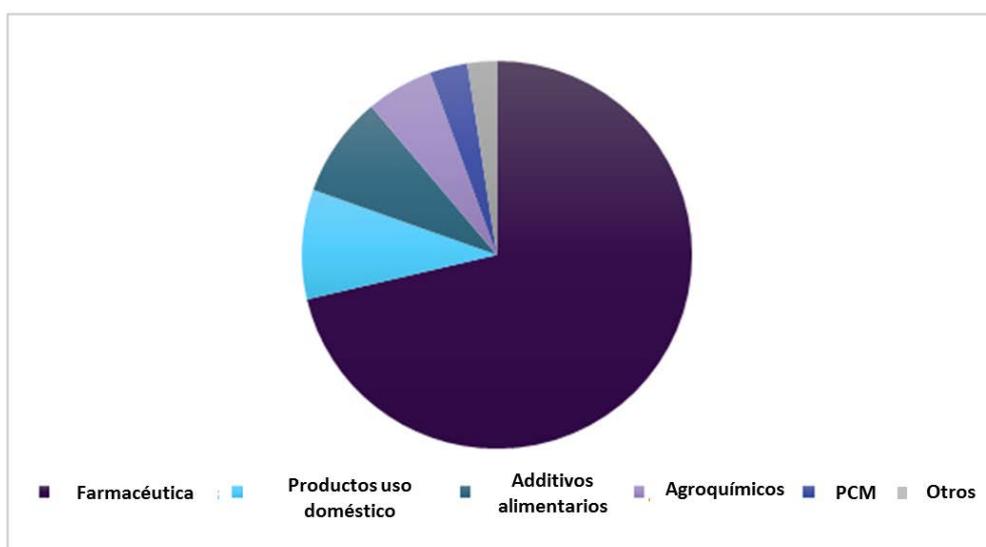


Figura 1.8. Principales campos de aplicación de productos microencapsulados [9].

Además, se prevé que la demanda de la tecnología de microencapsulación en los agroquímicos crezca un 10.5% anual en la próxima década. La microencapsulación de ingredientes activos para fertilizantes o herbicidas ofrece una protección más duradera de los cultivos, una liberación química controlada y un incremento de la efectividad [10]. Otros campos de aplicación de las microcápsulas donde el interés va al alza es en tintas y recubrimientos, en monitores electrónicos, en materiales para la regulación de temperatura (materiales de cambio de fase) o en cosmética.

La demanda de micro/nanocápsulas ha aumentado hasta tal punto que se han creado nuevas empresas a nivel mundial dedicadas a la producción a gran escala de este tipo de materiales. Algunos de los fabricantes más relevantes a nivel mundial se muestran en la **Tabla 1.4**.

| Compañía | País | Ejemplos de productos |
|--|-----------|--|
|  ENCAPSYS MICROENCAPSULATION | EE.UU. | Materiales de cambio de fase, fragancias |
|  | Alemania | Agroquímicos, fragancias |
|  AVEKA Group AVEKA Manufacturing, Inc. | EE.UU. | Sólidos para múltiples aplicaciones |
|  Capsulae Innovative microencapsulation | Francia | Múltiples tecnologías, materiales y núcleos |
|  MikroCaps Encapsulate your Business | Eslovenia | Materiales de cambio de fase, fragancias |
|  Lipotec Active Ingredients | España | Ingredientes cosméticos |
|  innoBio | China | Carotenoides, ácidos grasos, lípidos y aminoácidos |

Tabla 1.4. Productores relevantes de la industria de la microencapsulación.

La creciente demanda de cápsulas para distintos productos ha empujado a las empresas a buscar nuevas tecnologías de encapsulación, nuevos mecanismo de liberación, nuevos polímeros para la corteza o nuevos compuestos activos a encapsular, todo ello para conseguir nuevas propiedades funcionales.

Esto ha provocado un aumento de la actividad de I+D en el sector, tanto en las empresas como en las universidades y centros tecnológicos. Esta actividad se refleja en un incremento casi exponencial del número de patentes y artículos científicos publicados en los últimos años (**Figura 1.9**)

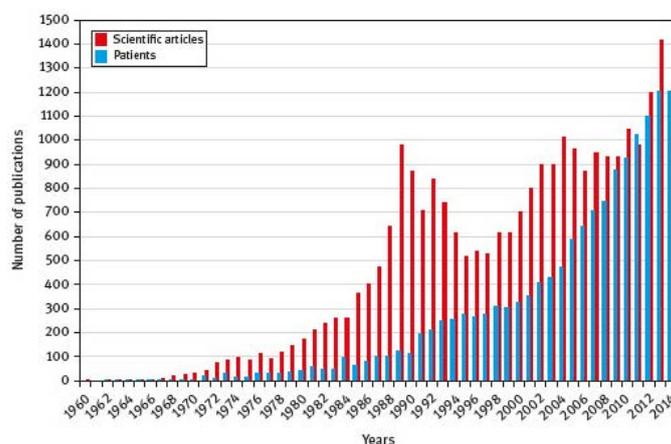


Figura 1.9. Evolución a través de los años del número de patentes (en azul) y publicaciones (en rojo) relacionadas con la microencapsulación [11].

1.5. Microencapsulación: Fundamentos

La microencapsulación es un proceso mediante el cual un material activo (con una funcionalidad específica) es cubierto por otro material que tiene función de confinar y proteger dicho activo del entorno, dando como resultado una partícula de tamaño micrométrico [12,13]. La microencapsulación se realiza para cumplir una serie de necesidades:

- Protección frente a la degradación por el entorno.
- Enmascaramiento de colores u olores/sabores.
- Liberación controlada de activos.
- Manipulación segura de compuestos tóxicos.
- Dispersiones estables del activo en medios no afines.
- Manipulación de un activo líquido en forma de partículas sólidas.

1.5.1. Estructuras y componentes

Dependiendo del material, núcleo a encapsular y la metodología empleada, se pueden obtener diferentes tipos de microcápsulas en cuanto a su estructura interna se refiere. Las más comunes se presentan en la **Figura 1.10**.

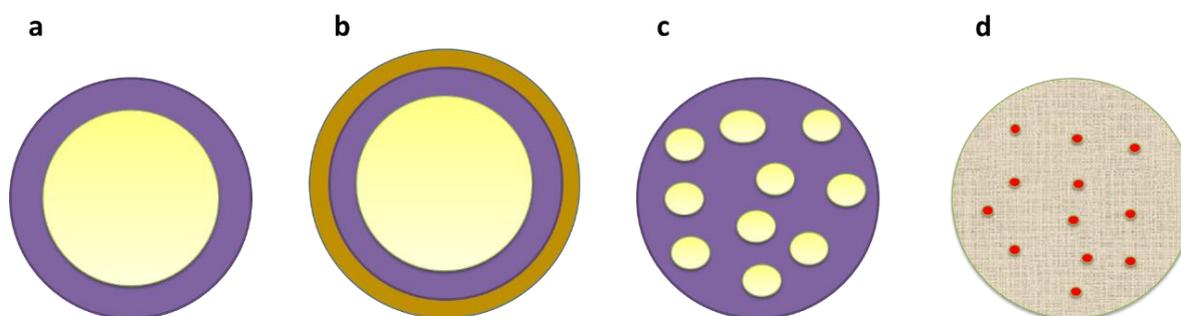


Figura 1.10. Tipos de estructuras internas de las microcápsulas. a) Estructura núcleo-corteza o 'core-shell'; b) estructura núcleo-corteza multicapa; c) estructura multinuclear; d) estructura tipo matriz.

La estructura mononuclear **(a)** consiste en la generación de una corteza alrededor de un único núcleo. Las partes están bien diferenciadas y la cantidad de material que puede contener es la más alta en comparación con otras estructuras aunque en caso de contener un líquido es la menos estable desde el punto de vista mecánico. El tipo **(b)** es una estructura multicapa, donde el número de recubrimientos del núcleo pueden ser dos o más y pueden estar compuestas por diferentes materiales encapsulantes. En el caso de una estructura multi-nuclear **(c)**, la cápsula contiene múltiples reservorios de núcleo en su interior. Por último la cápsula tipo matriz **(d)** contiene un activo repartido de manera

homogénea y disuelto en el material de corteza. Este último caso es el que posee proporciones más pequeñas de núcleo respecto a corteza, siendo útil en aplicaciones que requieran baja cantidad del material activo pero una alta protección de éste. Cada una de estas morfologías tiene sus propias características en cuanto a capacidad de carga útil, resistencia mecánica o capacidad de retención.

El **material de corteza** debe ser capaz de formar una película compatible con el núcleo, evitando reacciones químicas y proporcionando las propiedades deseadas de recubrimiento como pueden ser la resistencia (térmica y/o mecánica), la flexibilidad, o la impermeabilidad (si se requiriera). Para la corteza se pueden utilizar una gran variedad de polímeros, entre los cuales se encuentran materiales sintéticos (orgánicos e inorgánicos) o naturales (**Tabla 1.5**).

| Polímeros Sintéticos | | Biopolímeros | |
|-----------------------|----------------------|---------------|---------------------------|
| Polimetil metacrilato | Poliurea | Albuminas | Alginato |
| Resinas epoxy | Aminoresinas | Gelatina | Quitosano |
| Poliamida | Polisulfona | Colágeno | Carbohidratos modificados |
| Poliuretano | Poli (vinil alcohol) | Carbohidratos | Celulosa |
| Poliestireno | Policaprolactona | Carragenano | Ceras naturales |
| Ácido poliláctico | | | |

Tabla 1.5. Lista de materiales de corteza de diferente origen (sintético y natural) usados en microencapsulación [14].

La mayor durabilidad que ofrecen muchos de estos polímeros sintéticos los hace ideales para muchas aplicaciones, siendo el “*packaging*” y la construcción los más importantes. No obstante, el uso de estos materiales también supone su acumulación en el medio ambiente debido a su resistencia a la degradación microbiana. Por esta razón se tiende cada vez más a introducir biopolímeros, que se presentan como una alternativa a los actuales polímeros sintéticos por su mayor degradabilidad. Desafortunadamente, muchos de estos polímeros ofrecen peores propiedades de resistencia mecánica y química que sus homólogos sintéticos y por ello es necesario un post-tratamiento para dotarlos de mejores características.

Esta tendencia afecta también al sector de la microencapsulación, que busca sustituir para algunas aplicaciones los polímeros sintéticos por biopolímeros que garanticen una disminución del impacto en el medio ambiente. Para ello se pretende aprovechar los recursos naturales, o biomasa, disminuyendo así el riesgo de usar componentes tóxicos o no biodegradables. En la **Tabla 1.6** se muestran algunos de los biopolímeros de mayor interés en los últimos años y la fuente de donde son extraídos.

| Nombre | Tipo | Origen |
|---------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Alginato | Polisacárido | Algas |
| Carragenato | Polisacárido | Algas |
| Quitano | Polisacárido | Crustáceos e insectos |
| Celulosa | Polisacárido | Plantas y algas |
| Gelatina | Proteína | Animal |
| Proteína de Soja | Proteína | Soja |
| Goma Arábiga | Polisacárido/proteína | Plantas |
| Goma Xantana | Polisacárido | Bacterias |
| Ácido poliláctico (PLA) | Poliéster | Bacterias |
| Ácido polihidroxibutírico (PHB) | Poliéster | Bacterias |
| Almidón | Polisacárido | Vegetal |
| Maltodextrina | Polisacárido | Vegetal |

Tabla 1.6. Lista de los biopolímeros más utilizados y su correspondiente fuente de extracción [15,16].

El **núcleo** de la cápsula es la parte que se pretende proteger con la corteza y donde se sitúa el ingrediente activo. Éste puede existir en forma de sólido, líquido, gas o incluso como materiales de cambio de fase (MCF o PCM en inglés) y la naturaleza puede ser orgánica o inorgánica.

La compatibilidad del material de núcleo con la corteza es un criterio importante para mejorar la eficiencia de la microencapsulación. El material de corteza deberá estructurarse para dar lugar a la microcápsula en lugar de quedarse en disolución, reaccionando con otras moléculas o generando polimerizaciones lejos del material activo. Además, la proporción de material de núcleo también juega un rol importante en los fenómenos de difusión, permeabilidad o liberación controlada.

El ingrediente activo puede ocupar la totalidad del núcleo o encontrarse disuelto/dispersado en otro material compatible. Algunos ejemplos más comunes de núcleos microencapsulados son los medicamentos, aromas y fragancias, materiales de cambio de fase, catalizadores, reactivos o microorganismos entre otros.

La liberación posterior de estos activos microencapsulados se puede realizar mediante diferentes mecanismos como puede ser el térmico, el eléctrico, el lumínico, o el mecánico entre otros, siendo este último el más común [17].

1.5.2. Parámetros cuantitativos

La determinación cuantitativa para asegurar que un activo ha sido encapsulado eficientemente así como también la eficiencia del proceso se miden según diferentes parámetros [18].

➤ Carga útil o *payload*

La carga útil o *payload* en inglés, es la cantidad de material activo respecto al total de la cápsula y, por lo tanto, un valor alto de carga significa que la microcápsula contiene una proporción muy grande de la especie activa. Dependiendo de la aplicación y la técnica, la carga útil acostumbra a variar. Dependiendo de la técnica de encapsulación y la morfología de las cápsulas se pueden lograr valores entre 10% y 95%. Este valor se determina mediante la *ECUACIÓN (1)*.

➤ Rendimiento de encapsulación

El rendimiento de encapsulación (REn%) consiste en valorar el grado de conversión de los materiales iniciales (monómeros, polímeros, núcleos...) en microcápsulas. Un rendimiento ideal sería la mayor conversión posible para así evitar aplicar procesos de lavado o de neutralización de especies reactivas que hayan quedado en exceso. Por lo tanto, el rendimiento de encapsulación se cuantifica como se muestra en la *ECUACIÓN (2)*.

➤ Eficiencia de encapsulación

Por último, existe otro valor llamado eficiencia de encapsulación (EEn) el cual se refiere al grado de atrapamiento de núcleo. Valores altos de este parámetro indican que el proceso ha permitido encapsular la mayoría del material activo inicialmente añadido.

A continuación se muestran las ecuaciones correspondientes para la determinación de estos parámetros:

$$(1) \text{ Carga útil o } payload (\%) = \frac{\text{Masa de material activo encapsulado}}{\text{Masa total de la cápsula}} \times 100$$

$$(2) \text{ Rendimiento de encapsulación (REn) } (\%) = \frac{\text{Masa de cápsulas obtenida}}{\text{Masa de cápsulas teórica}} \times 100$$

$$(3) \text{ Eficiencia de encapsulación (EEn) } (\%) = \frac{\text{Masa de material activo encapsulado}}{\text{Masa de material activo inicial}} \times 100$$

1.5.3. Técnicas de encapsulación

Hoy en día se han desarrollado muchos tipos de técnicas de encapsulación que suelen clasificarse de distintas maneras. Una de ellas se basa en la clasificación del método de síntesis de las cápsulas (**Figura 1.11**)

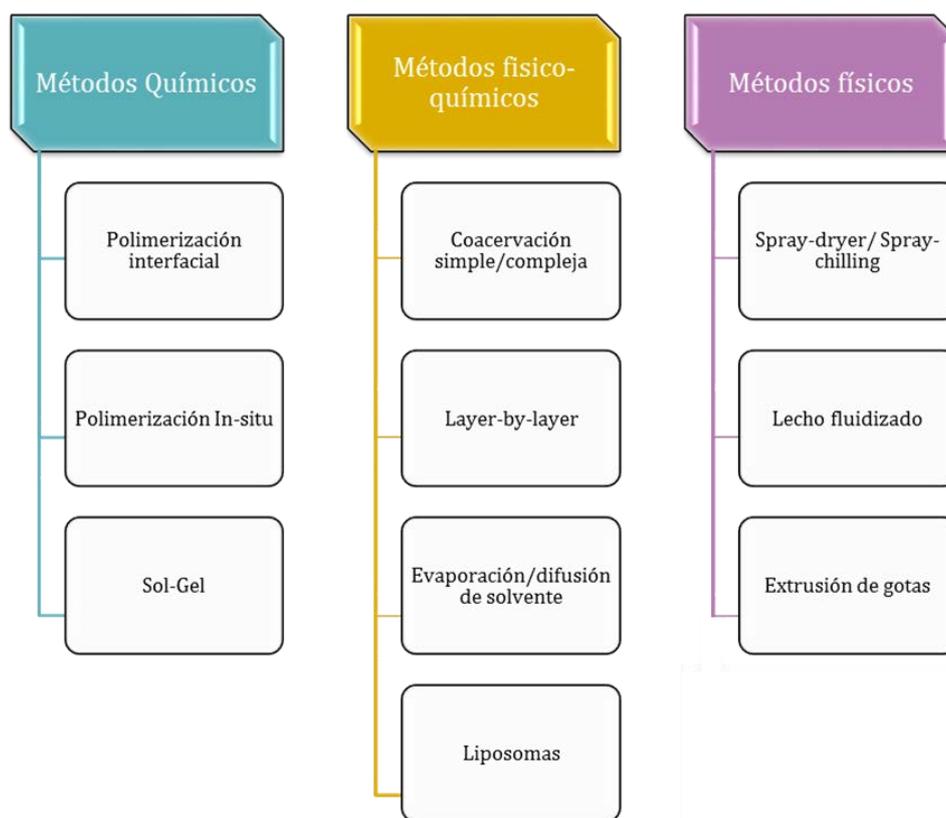


Figura 1.11. Clasificación de las principales técnicas de encapsulación.

A continuación se describen con más detalle las técnicas más importantes mostradas en el esquema anterior:

1.5.3.1. Métodos físicos

Los métodos físicos o físico-mecánicos son procedimientos de encapsulación donde no se producen reacciones químicas de los compuestos. Los métodos más representativos de esta familia son:

➤ *Secado por pulverización o spray-drying*

La técnica de secado por pulverización, comunmente conocida como *spray-drying* en inglés, se ha estado usando en la industria alimenticia desde finales de los años 50 para proteger los aromas de la degradación y para que compuestos líquidos se pudieran manipular como sólidos (p.ej. leche en polvo). La tecnología está bien establecida, es económica y relativamente simple de escalar.

Una emulsión de aceite en agua (o/w) o una suspensión de partículas en presencia del polímero encapsulante, se pulveriza a través de una cámara caliente mediante un atomizador. Las microgotas formadas viajan por la cámara de secado, donde gracias a la temperatura, se provoca la evaporación de los componentes volátiles [19]. De esta forma el polímero precipita alrededor del aceite o partícula formando las microcápsulas que se recogen finalmente en forma de polvo en el colector (**Figura 1.12**).

Al tratarse de un sistema muy enfocado a la industria alimentaria, como material de corteza se usan gomas (goma arábica, goma guar), polisacáridos (maltodextrinas, almidón, celulosa, alginato) o proteínas (proteínas del suero, proteína de soja, caseinato). No obstante, se pueden usar también polímeros sintéticos hidrosolubles como son el alcohol polivinílico (PVA) o la polivinilpirrolidona (PVP) entre otros. Los parámetros a ajustar en este tipo de sistemas son el caudal de entrada de la emulsión o suspensión, la presión y la temperatura del gas de secado.

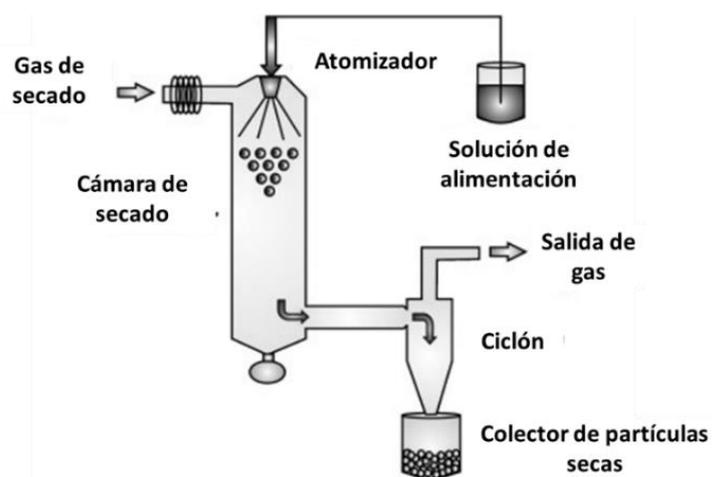


Figura 1.12. Representación gráfica mostrando las partes y el funcionamiento de un spray-dryer [19].

➤ Lecho fluidizado

Esta técnica se utiliza para el recubrimiento de partículas sólidas o para generar aglomerados de éstas. Las partículas en cuestión se encuentran suspendidas con la ayuda de un flujo continuo de aire caliente y mientras estas partículas están levitando, se les pulveriza una solución de material de recubrimiento. El solvente de esta solución se evapora rápidamente gracias al calor generado por el flujo de aire caliente, dejando una capa polimérica alrededor de las partículas sólidas (Figura 1.13). Este proceso permite variar el grosor del material de corteza según la cantidad de material pulverizado, e incluso crear varias capas de distintos polímeros alrededor de un mismo núcleo. Si las capas poliméricas tienen propiedades adhesivas, se pueden formar granulados de partículas agregadas entre ellas.

Esta técnica se puede usar para proteger un compuesto activo con varias capas o para depositar compuestos activos distintos en distintas capas alrededor de un soporte sólido. Existen diferentes tipos de lechos fluidizados dependiendo de la dirección del pulverizado: Top-spray bottom-spray y tangential spray.



Figura 1.13. Representación esquemática del funcionamiento de un lecho fluido, en este caso del tipo Top-spray [20].

➤ Extrusión y co-extrusión

Esta metodología es la más antigua para producir cápsulas con hidrocoloides (alginato, carragenato...) de tipo hidrófilo [21]. La suspensión a encapsular se hace pasar por una jeringa (escala laboratorio) o un extrusor (escala industrial) y se hace caer sobre una solución reaccionante que provoca la reticulación de la matriz. Para disminuir el tamaño de las gotas se usan distintas técnicas para romper el flujo de líquido extruido: ultrasonidos, presión de un gas, discos, etc. Para aumentar la velocidad del proceso se suelen usar sistemas de coextrusión en paralelo donde se generan gotas bajo la influencia de una vibración (**Figura 1.14**)

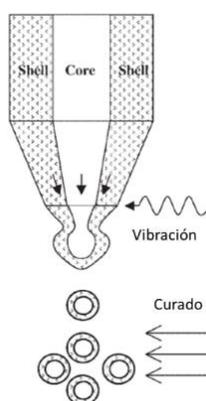


Figura 1.14. Ejemplo de microencapsulación por co-extrusión con el uso de vibraciones [21].

1.5.3.2. Métodos químicos

Los métodos químicos implican reacciones químicas para la formación de polímeros de corteza. En este tipo de síntesis los materiales de partida son monómeros y/o oligómeros que reaccionan en la interfase entre la fase acuosa y la de aceite (polimerización interfacial) o en la misma fase (polimerización *in-situ*) para la formación del polímero.

Para llevar a cabo este tipo de procesos es necesaria la formación de una emulsión, donde dos fases inmiscibles son mezcladas de manera homogénea [22,23]. La fase en menor proporción (fase dispersa o discontinua) es dispersada en otra mayoritaria (fase continua o dispersante). En el caso de que la fase dispersada sea la hidrofóbica la emulsión se llama aceite-en-agua (o *oil-in-water* en inglés, O/W), mientras que en el caso de que la fase dispersada sea la hidrófila, normalmente agua, la emulsión es del tipo agua-en-aceite (o *water-in-oil* en inglés, W/O) (Figura 1.15).

Para llevar a cabo esta mezcla homogénea es necesario el uso de sistemas energéticos (agitación magnética o mecánica, ultrasonidos, ruptura por cizalla...) y el uso de tensioactivos o estabilizadores de emulsiones. Estos compuestos tienen la función de situarse en la interfase de las fases estabilizando las gotas y evitando así procesos de inestabilidad de la emulsión como la coalescencia, floculación o flotación entre otros. La etapa de emulsificación tiene una gran importancia en los procesos de encapsulación ya que el tamaño de gota obtenido determinará el tamaño de microcápsula final.

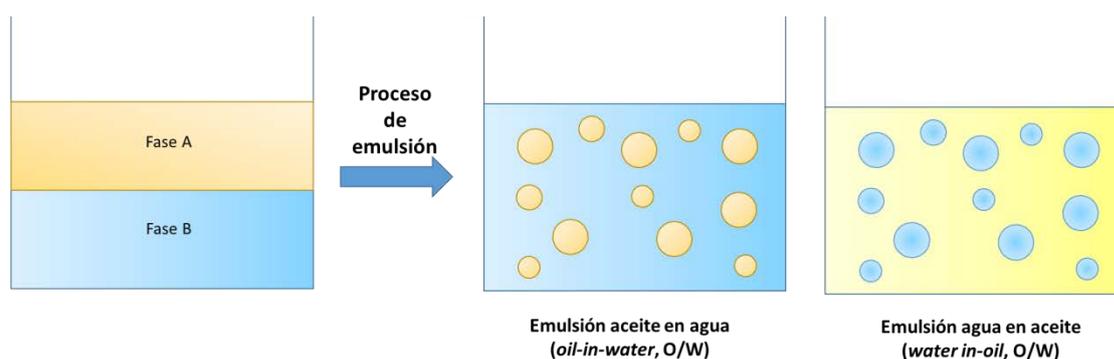


Figura 1.15. Esquema del proceso de emulsión partiendo de una mezcla de dos fases inmiscibles. Dependiendo de las proporciones entre ambas fases se obtienen emulsiones de aceite-en-agua o agua-en-aceite.

➤ *Polimerización in-situ*

En los métodos de encapsulación basados en la polimerización *in-situ*, los monómeros u oligómeros reactivos se añaden a la fase continua o a la dispersa, donde ocurre la polimerización. El peso molecular del polímero aumenta hasta convertirse en insoluble, precipitando y generando el material de corteza (Figura 1.16).

Un ejemplo de polimerización *in-situ* con monómeros/oligómeros disueltos en la fase acuosa es la que genera aminoresinas como corteza, siendo la melamina-formaldehído (MF) la más representativa [24]. Este tipo de material de corteza ha demostrado ser muy versátil, pudiendo encapsular una gran variedad de núcleos como aceites [25,26], compuestos fotocromáticos [27] o fluorescentes [28],

materiales de cambio de fase [29,30] y fragancias [31,32]. Este tipo de metodología de encapsulación se explica en más detalle en el **Capítulo 3**.

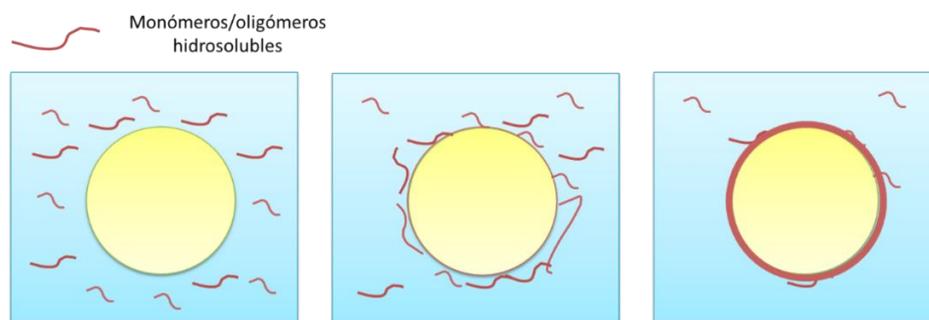


Figura 1.16. Esquema de la reacción de polimerización in-situ en fase acuosa. a) oligómero/monómero disuelto en la fase acuosa de una emulsión O/W; b) crecimiento del polímero y precipitación en la interfase; c) generación de la corteza y microcápsula.

Por otro lado, para la polimerización con monómeros disueltos inicialmente en la fase dispersa (aceite) se usa frecuentemente la polimerización radicalaria, donde la polimerización ocurre mediante la generación de radicales y su posterior reacción de propagación. Debido a que generalmente los monómeros reactivos son de carácter lipófilo, la corteza se produce en el interior de la fase dispersa, migrando el polímero hacia la interfase cuando se vuelve insoluble (**Figura 1.17**).

Los materiales más representativos en este tipo de polimerizaciones son el estireno [33-34] y los acrilatos [35], siendo necesaria la activación (generación de radicales) mediante el uso de catalizadores, radiación UV o temperatura.

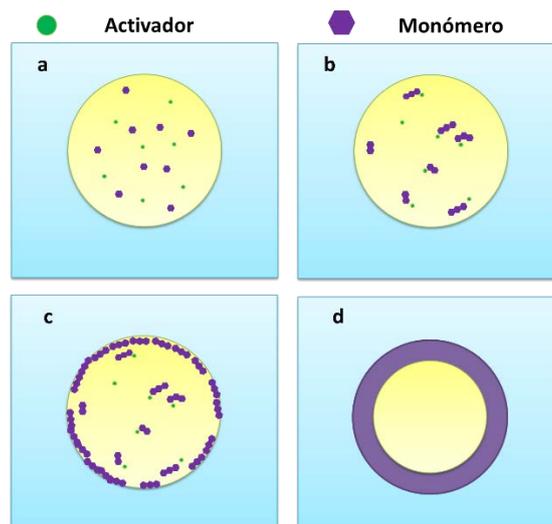


Figura 1.17. Esquema de encapsulación por polimerización radicalaria; a) emulsión O/W con el monómero y el activador en el interior de la fase hidrofóbica; b) activación e inicio del proceso de propagación; c) migración de las especies oligoméricas a la interfase; d) formación de la corteza polimérica y microcápsula.

➤ *Polimerización interfacial*

La polimerización interfacial es un tipo de método químico de encapsulación que, como el nombre indica, se produce en la interfase de las dos fases de una emulsión. En este tipo de polimerización, dos monómeros reactivos que son solubles en sus respectivas fases inmiscibles, entran en contacto en la interfase y reaccionan [36]. La resultante reacción de polimerización forma un film polimérico en la interfase cuyo grosor aumenta con el tiempo hasta que uno de los reactivos se termina o hasta bloquear la difusión de los monómeros entre una fase y la otra (**Figura 1.18**). Para poder producir una polimerización es necesario el uso de monómeros al menos di-funcionales para el crecimiento de cadenas poliméricas, y al menos tri-funcionales para asegurar el entrecruzamiento.

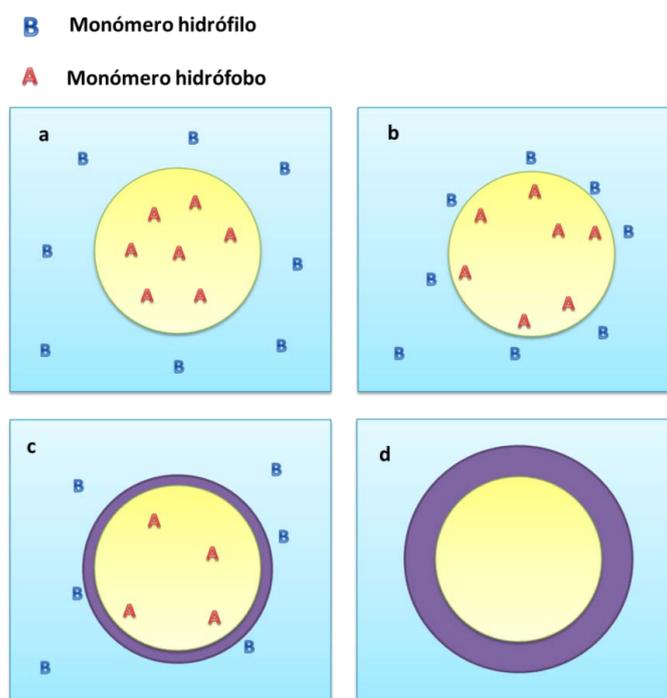


Figura 1.18. Esquema de encapsulación por polimerización interfacial en emulsiones O/W. a) Monómeros lipófilos/ hidrófilos disueltos en sus correspondientes fases; b) encuentro de los monómeros en la interfase agua/aceite; c) reacción de policondensación; d) formación de la microcápsulas tipo núcleo-corteza.

Dependiendo del tipo de monómeros utilizados se pueden obtener distintos tipos de polímeros. Con este método se pueden conseguir cortezas de tipo poliamida, poliurea, poliuretano o poliéster según los monómeros utilizados (**Tabla 1.7**).

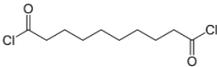
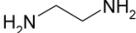
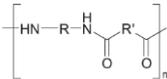
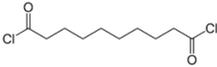
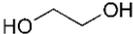
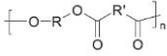
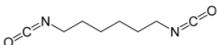
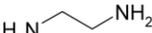
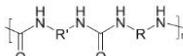
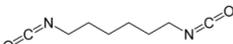
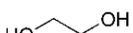
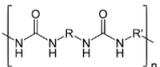
| Monómero lipófilo | Monómero hidrófilo | Polímero |
|---|--|--|
| Dicloruro de ácido  | Diamina  | Poliamida  |
| Dicloruro de ácido  | Diol  | Poléster  |
| Diisocianato  | Diamina  | Poliurea  |
| Diisocianato  | Diol  | Poliuretano  |

Tabla 1.7. Ejemplos de monómeros usados en polimerización interfacial y el tipo de polímero que se obtiene (el polímero mostrado es una fórmula general, no la correspondiente a la reacción entre los monómeros mostrados).

Las principales ventajas que ofrece esta metodología es la obtención de cápsulas con una alta carga útil de sustancia activa, la posibilidad de encapsular núcleos hidrófobos o hidrófilos, su relativo bajo coste y la gran variedad de monómeros disponibles comercialmente que permiten generar cortezas con propiedades físico-químicas distintas. Además, existen varios estudios de encapsulación de fragancias mediante esta metodología, sobretodo con el uso de poliuretanos, donde se ha demostrado unos buenos resultados [37-39].

En el **Capítulo 4** se explica con más detalle esta metodología y los parámetros más relevantes en la formación de las cápsulas.

➤ SOL-GEL

El proceso sol-gel consiste en un proceso de polimerización que ocurre tras una reacción de hidrólisis y condensación de un precursor molecular en fase líquida para formar una solución coloidal (Sol) que posteriormente se convierte en una polimérica (Gel) (**Figura 1.19**). Uno de los precursores más utilizados es el tetraetilcoxilano (TEOS) y su hidrolisis genera alcoxilatos que posteriormente condensan para dar lugar a enlaces de tipo óxido (-Si-O-Si-). La sílice (SiO₂), que se forma en la polimerización y es un material mecánicamente muy estable un material idóneo para la encapsulación y para la protección de sustancias en entornos químicos altamente agresivos.

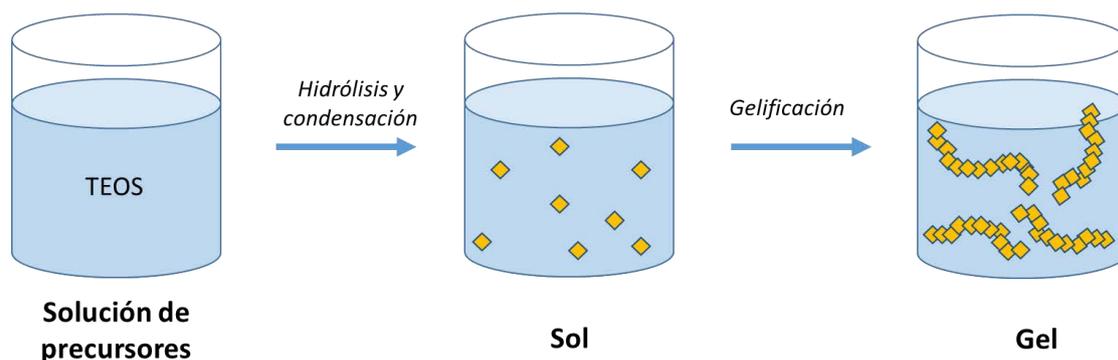


Figura 1.19. Esquema del proceso Sol-Gel.

El proceso en presencia de una emulsión permite la formación de microcápsulas con corteza inorgánica donde el núcleo puede ser hidrofílico o hidrofóbico [40-44].

1.5.3.3. Métodos físico-químicos

En estos métodos, la formación de la corteza se induce mediante la variación de las propiedades físico-químicas de la mezcla (pH, T, concentración) que provocan la precipitación del material polimérico pre-disuelto en la fase acuosa o dispersa. Estos métodos no involucran reacciones químicas en el proceso de formación de la corteza, evitando la degradación de los monómeros activos a encapsular.

➤ Coacervación

El método de coacervación se basa en un proceso de separación de fases de polímeros solubles en agua generando lo que se denomina coacervados. Los coacervados son agregados poliméricos (partículas coloidales) con alto contenido de agua que se separan del medio acuoso mediante un estímulo externo como el pH, la temperatura, o la adición de sales entre otros.

El término coacervado proviene del latín *acervus* que significa agregación y el prefijo *co-* que indica la unión de partículas coloidales. Este término fue usado por primera vez en 1929 por Bungerburg de Jong y Kruit [45]. Posteriores estudios sobre el proceso de coacervación dieron lugar al primer sistema de microencapsulación patentado de la historia, usado para el papel autocopiante con tinta coloreada encapsulada en gelatina [46].

La coacervación se puede clasificar en simple o compleja. En la coacervación simple, se parte de un solo polímero que se hace precipitar con los estímulos antes mencionados. En cambio, en la coacervación compleja, la separación de fases se produce por la interacción electrostática de dos polímeros de carga opuesta que inicialmente se encuentran solubilizados en agua. En la **Figura 1.20** se muestra un esquema de un proceso de encapsulación basado en coacervación compleja.

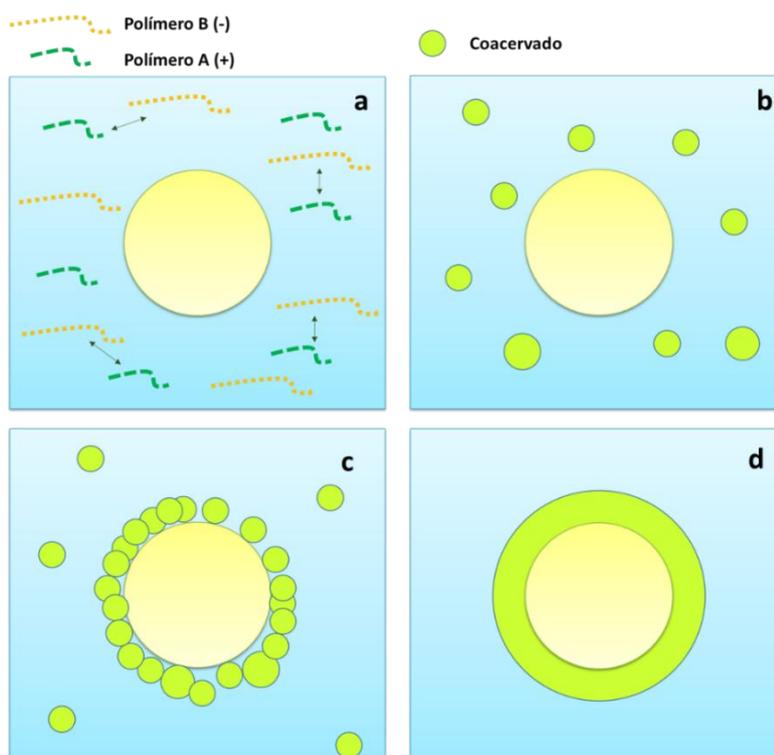


Figura 1.20. Esquema de un proceso de encapsulación mediante coacervación compleja. a) Interacción de los dos polímeros hidrosolubles de carga opuesta; b) formación del coacervado en la fase acuosa; c) deposición sobre la fase discontinua; d) formación de la corteza de la microcápsula.

En la primera fase se genera la atracción electrostática de los dos polímeros de carga opuesta dando lugar a un proceso de separación de fases, en el cual se forman los coacervados (**Figura 1.20.a y b**). Éstos continúan separándose de la fase acuosa y migran hacia a la interfase agua-aceite para finalmente depositarse completamente en esta interfase dando lugar a cápsulas (**Figura 1.20.d**).

Este tipo de metodología está destinada únicamente a la encapsulación de núcleos hidrófobos por la necesidad de utilizar polímeros hidrosolubles. Por otro lado, los tipos de polímeros destinados a la formación de la corteza y los materiales que se pueden encapsular con el uso de esta metodología son muy amplios [47-56].

En el **Capítulo 5**, dedicado a la encapsulación por coacervación compleja se describe en más detalle el proceso de formación de las cápsulas y los parámetros más relevantes.

➤ *Difusión/Evaporación de solvente*

En este tipo de metodologías de encapsulación, el polímero de la corteza y el material del núcleo se disuelven en un disolvente orgánico. Esta disolución se dispersa posteriormente en la fase continua acuosa y tras obtener la emulsión se promueve una separación de fases mediante varios métodos.

En el caso del método de *difusión* se elige un disolvente que no sólo disuelva el polímero y el material activo, sino que también tenga una buena afinidad con la fase continua. Así pues, tras mezclar esta fase con la continua, se induce una difusión del disolvente hacia la fase acuosa provocando un aumento de la concentración del polímero que rápidamente precipita formando las cápsulas (**Figura 1.21**). Los disolventes más comunes para este tipo de encapsulaciones son el acetato de etilo, acetona, acetonitrilo, o alcoholes [57]

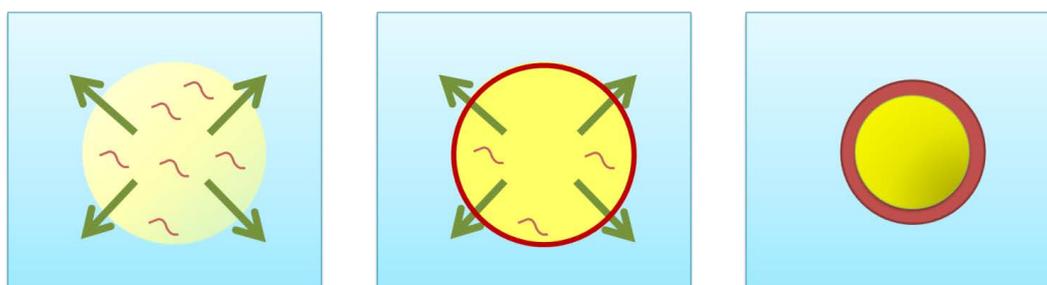


Figura 1.21.Proceso de encapsulación mediante difusión de disolvente.

En el método de la *evaporación* de solvente también se usa un disolvente capaz de disolver tanto polímero como el material activo a encapsular pero inmiscible con la fase continua. La precipitación del material de corteza se produce por la evaporación del disolvente que provoca la saturación de la fase discontinua y por lo tanto la precipitación del polímero (**Figura 1.22**). Este proceso puede necesitar la aplicación de calor y/o vacío para la completa evaporación del disolvente aunque también es posible a temperatura ambiente y presión atmosférica mediante disolventes altamente volátiles. Los disolventes más comunes usados en estos procesos son el diclorometano o el cloroformo por su baja temperatura de evaporación y su buena capacidad de disolver polímeros de corteza.

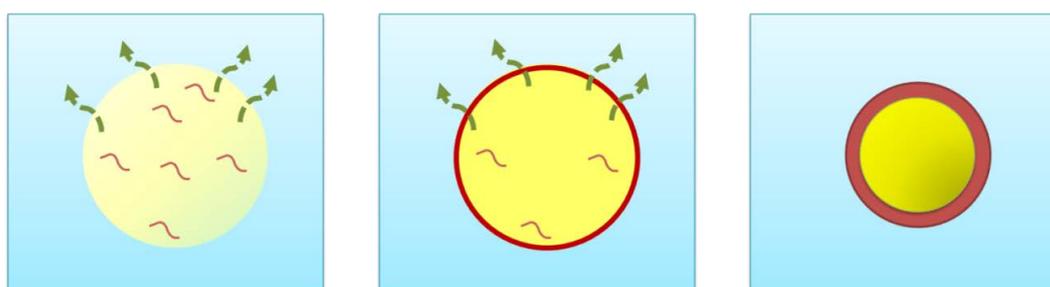


Figura 1.22. Proceso de encapsulación mediante evaporación de disolvente.

Esta metodología se usa tanto para la encapsulación de núcleos hidrófobos mediante emulsiones aceite en agua (O/W) como para la encapsulación de núcleos hidrófilos mediante emulsiones agua en aceite en agua (W/O/W) [58].

➤ *Formación capa por capa (Layer by layer)*

Este tipo de encapsulación se lleva a cabo mediante de la formación de multicapas alrededor de un núcleo. Para las capas se usan polímeros cargados o polielectrolitos. La corteza se constituye por capas, donde cada capa está formada por un polímero de carga opuesta a la anterior (**Figura 1.23**). Esta técnica es de gran interés por el hecho de que existen múltiples combinaciones de polielectrolitos y por lo tanto diferentes tipos de corteza a obtener con sus correspondientes propiedades. Por otro lado, el proceso de síntesis es muy lento debido a la adición secuencial de los polielectrolitos [59,60].

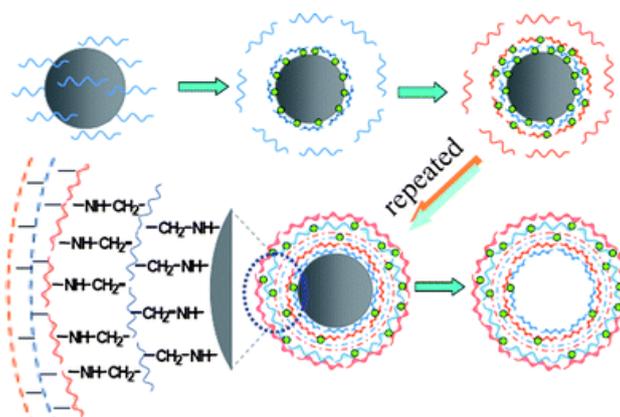


Figura 1.23. Representación gráfica de un proceso de encapsulación por capas.

1.6. Contextualización y plan de trabajo de la tesis doctoral

El objetivo principal del proyecto ha sido el de investigar, desarrollar, y caracterizar tres tipos diferentes de microcápsulas mediante el uso de polímeros/monómeros de alta disponibilidad comercial. Las técnicas y materiales usados por orden de ejecución han sido:

- Cápsulas de melamina-formaldehído por polimerización *in-situ*: El objetivo ha sido poder desarrollar las cápsulas referencia del mercado o '*benchmark*' con fragancias de la propia compañía para así poder comparar las prestaciones con el resto de cápsulas desarrolladas. El **Capítulo 3** de esta tesis está dedicada a este tipo de desarrollo.
- Cápsulas de poliamida por polimerización interfacial: El objetivo ha sido el de continuar el desarrollo de cápsulas de poliamida obtenidas durante el proyecto MICROFRAG para intentar mejorar las prestaciones de las microcápsulas obtenidas tras la finalización de dicho proyecto. El resultado obtenido fueron cápsulas de poliamida con fragancias formuladas por CARINSA para adaptadas a un suavizante. Las cápsulas además se modificaron superficialmente para

dotarlas de mayor adhesión a las fibras de ropa en un proceso de lavado. En el **Capítulo 4** se explica en más detalle este trabajo.

- Cápsulas de gelatina-goma arábica por coacervación compleja: El objetivo ha sido el de utilizar biopolímeros como material de corteza para la encapsulación de fragancias mediante un proceso totalmente seguro y libre de formaldehído. Las normativas a nivel mundial son más estrictas en relación a la producción de plásticos y microplásticos por su acumulación en el medioambiente. Por ello, una de las alternativas en el trabajo del proyecto fue utilizar materiales respetuosos con el planeta, no solamente por su alta degradabilidad y biocompatibilidad sino que hubiera una alta disponibilidad del material a un precio competitivo. El **Capítulo 5**, de mayor extensión del resto, expone el trabajo dedicado a esta técnica y el uso de estos materiales.

La fragancia objetivo a encapsular mediante las diferentes técnicas de encapsulación fue la desarrollada específicamente para este proyecto bajo el nombre de Tropical Fruit P780765 (TROPICAL). La fragancia fue diseñada por el equipo de expertos perfumistas de CARINSA, siendo ésta una mezcla variada de diferentes compuestos volátiles. La lista de los diferentes componentes y sus proporciones se muestran en la **Tabla 1.8**.

| Nombre | % Fórmula | Nombre | % Fórmula |
|---------------------------|-----------|-------------------------|-----------|
| Acetato etilo | 1.5 | Agrumex | 16 |
| 2-Metilbutirato etilo | 3 | Aldehido C11 Undecílico | 0.0585 |
| cis-3-Hexenol | 0.2 | Veloutone | 0.5 |
| Acetato isoamilo | 1.8 | Orivone | 0.2 |
| Manzanate | 2 | Acetato terpenilo | 0.001 |
| Acetato cis-3-hexenilo | 3 | Aldehido C12 MNA | 0.0025 |
| Acetato hexilo | 6 | Menta-8-tiol-3-ona | 0.002 |
| 2-Isopropil-4-metiltiazol | 0.01 | delta-Damascona | 0.4 |
| p-Cimeno | 0.0025 | Acetato geranilo | 1.5 |
| Limoneno | 7.075 | Aldehido C12 Láurico | 0.0535 |
| Eucaliptol | 0.4 | MAM | 0.01 |
| Melonal | 0.1 | Acetato verdilo | 7.5 |
| gamma-Terpineno | 0.0025 | Metil ionona | 0.5 |
| DHM | 3.5 | Floralozone | 0.2 |
| Caproato alilo | 1.5 | Yara yara | 2 |
| Butirato de amilo | 0.8 | trans-2-dodecenal | 0.006 |
| Liffaroma | 0.2 | Decadienoato etilo | 0.1 |
| Terpinoleno | 0.0015 | Acetato veticol | 0.2 |
| Linalol | 3.655 | Butirato DBC | 1.5 |

| | | | |
|-------------------------|--------|-----------------------------|--------|
| Alcohol feniletílico | 0.001 | Phenirat | 3 |
| Isobutirato hexilo | 0.4 | Bacdanol | 0.2 |
| Citronelal | 0.05 | Aldehido C14 | 9 |
| Mentona | 0.4 | Fructalate | 0.2 |
| Acetato bencilo | 0.0105 | DEP | 1.538 |
| Heptanoato alilo | 3 | Hedione | 3 |
| Butirato cis-3-hexenilo | 0.2 | TEC | 0.2648 |
| Terpineol | 0.02 | Iso E Super | 4 |
| Aldehido C10 | 0.206 | Salicilato hexilo | 4 |
| Terpenil metil eter | 0.6 | Habanolide | 2 |
| Alil amil glicolato | 0.2 | Aldehido alfa-amil cinámico | 0.0015 |
| Aldehido cumínico | 0.0002 | Salicilato metilo | 0.0005 |
| Citral | 0.5015 | Sandela | 0.5 |
| Carvona | 0.2 | | |
| Acetato linalilo | 1.026 | | |

Tabla 1.8. Listado de los componentes y su correspondiente proporción en la fragancia Tropical Fruit P780765.

Como se puede comprobar, la formulación es compleja, formada por muchos compuestos de diferente naturaleza y polaridad, lo que complica el proceso de encapsulación. Por ello, en esta tesis se planteó la encapsulación de una serie de núcleos más simples hasta lograr finalmente la encapsulación de la fragancia objetivo. La manera de proceder para las tres técnicas fue la siguiente por orden de ejecución:

- Encapsulación de un aceite monocomponente.
- Encapsulación de fragancias simples (entre 4 y 20 compuestos) o fragancias monocomponente.
- Encapsulación de la fragancia objetivo TROPICAL.

Respecto a los materiales de corteza investigados, se buscaron los que cumplieran en mayor grado las siguientes características:

- Inertes frente al núcleo a encapsular.
- Capaces de liberar el contenido por ruptura mecánica.
- Buena interacción con el sustrato final o la matriz donde se integran.
- Económicos y comercialmente disponibles.
- Biocompatibilidad y biodegradabilidad.

Además de estas condiciones, en este proyecto se fijaron una serie de requisitos a cumplir referente a la calidad de las microcápsulas sintetizadas. Las características deseadas para considerar el proceso de encapsulación satisfactorio fueron las siguientes:

- Cápsulas con estructura núcleo-corteza.
- Morfología esférica.
- Tamaños de partícula menores que 50 μm (deseable menor que 25 μm) con una baja polidispersión.
- Estabilidad química y coloidal en suspensión y tras el secado.
- Alta carga útil (>80%p/p).
- Reproducibilidad de la síntesis.

Para la caracterización de las microcápsulas obtenidas se usaron técnicas de microscopía para la determinación morfológica (óptica y electrónica), técnicas de determinación de los tamaños (Mastersizer®2000) y técnicas para la determinación cuantitativa de las cápsulas (^1H -RMN, GC-MS).

En este proyecto, la visión es además poder realizar síntesis de microcápsulas en reactores de grandes volúmenes (2-10 L) tras un desarrollo de procesos de escalado. La conversión de una síntesis desde escala laboratorio (50-150 g) a una escala de producción industrial para la fabricación de microcápsulas implica muchos factores, no solamente un incremento de los reactivos. El dominio de los tiempos, las variables físico-químicas o el manejo de los reactivos para su mezcla son algunos de los elementos que desde el principio del proyecto se han tenido en mente. Además, la próxima adquisición por parte de CARINSA de reactores de 100L y 400L para síntesis de microcápsulas permitirá continuar con este proceso de escalado de los procesos de encapsulación. En el **Capítulo 6**, centrado en el escalado de los procesos optimizados, se exponen más extensamente todos los detalles referentes a este procedimiento.

Los distintos procesos optimizados para la síntesis de microcápsulas y las correspondientes caracterizaciones vienen detallados en forma de protocolos de trabajo en el el **Anexo I** situado en la parte final de esta tesis. A continuación, en el **Anexo II**, se muestran las fragancias diseñadas para los distintos procesos de encapsulación.

1.7. REFERENCIAS

- [1] European Comisión. Revision of the European Ecolabel Criteria for: Laundry detergents and Industrial and institutional laundry detergents. <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC96846/laundry%20pubsy%2020151104.pdf> (Última visita 5 de Febrero de 2019) .
- [2] Techsi Research. Water Softeners Market to Cross \$ 11 billion by 2015, <https://www.techsciresearch.com/news/1897-water-softeners-market-to-cross-11-billion-by-2025.html> (Última visita 5 de Febrero de 2019).
- [3] European Ecolabel. Revision of Ecolabel Criteria for Laundry Detergents 2008-2010, <http://ec.europa.eu/environment/ecolabel/documents/Laundry%20Detergents%20technical%20report.pdf> (Última visita 5 de Febrero de 2019).
- [4] Asbahani, A. El; Miladi, K.; Badri, W.; Sala, M.; Addi, E. H. A.; Casabianca, H.; Mousadik, A. El; Hartmann, D.; Jilale, A.; Renaud, F. N. R.; *et al.* Essential Oils: From Extraction to Encapsulation. *Int. J. Pharm.* **2015**, *483* (1), 220–243.
- [5] Bernal, C. *Fragancias y Perfumería*, 2017.
- [6] Edwards, M. *Fragrances of the World*. Michael Edwards and Co: Sydney, 1992 .
- [7] Bernal, C. *Comunicació sensorial. Jugant amb les olors. Historia del perfum, les seves tipologies*, 2014.
- [8] Perfumer&Flavorist. An Update to the 2017 Flavor & Fragrance Leaderboard <https://www.perfumerflavorist.com/networking/news/company/2017-FlavorFragranceLeaderboard-431362033.html> (Última visita 5 de Febrero de 2019).
- [9] Grand View Research. Microencapsulation Market Analysis Report By Technology, By Coating Material, By Application (Pharmaceutical, Home & Personal Care, Food & Beverages, Textile, Agrochemicals), And Segment Forecasts, 2018-2025. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/microencapsulation-market> (Última visita 5 de Febrero de 2019).
- [10] Hack, B.; Egger, H.; Uhlemann, J.; Henriët, M.; Wirth, W.; Vermeer, A. W. P.; Duff, D. G. Advanced Agrochemical Formulations through Encapsulation Strategies? *Chemie Ing. Tech.* **2012**, *84* (3), 223–234.

- [11] Boh Podgornik, B.; Staresinic. Microencapsulation Technology and Applications in Added-Value Functional Textiles. *Physical Sciences Reviews*. **2016**, 1 (1), 1-27.
- [12] Gouin, S. Microencapsulation: Industrial Appraisal of Existing Technologies and Trends. *Trends Food Sci. Technol.* **2004**, 15 (7), 330–347.
- [13] Jyothi, N. V. N.; Prasanna, P. M.; Sakarkar, S. N.; Prabha, K. S.; Ramaiah, P. S.; Srawan, G. Y. Microencapsulation Techniques, Factors Influencing Encapsulation Efficiency. *J. Microencapsul.* **2010**, 27 (3), 187–197.
- [14] Malleswari, K.; Reddy, R. B. D.; Swathi, M. Microencapsulation: A Review A Novel Approach In Drug Delivery. *Eur. J. Pharm. Med. Res.* **2016**, 3 (6), 186–194.
- [15] Isabelle, V.; Lan, T. Biodegradable Polymers. *Materials*. **2009**; 2(2), 307-344 .
- [16] Aravamudhan, A.; Ramos, D. M.; Nada, A. A.; Kumbar, S. G. Chapter 4 - Natural Polymers: Polysaccharides and Their Derivatives for Biomedical Applications BT - Natural and Synthetic Biomedical Polymers; Elsevier: Oxford, **2014**; pp 67–89.
- [17] Teixeira, P.; Silva, D.; Leadir, I.; Fries, L. M.; Cristiano, I.; De Menezes, R.; Augusto, I.; Holkem, T.; Carla, I.; Schwan, L.; et al. Microencapsulation: Concepts, Mechanisms, Methods and Some Applications in Food Technology; *Ciência Rural* **2014**, 44744 (7), 1304–1311.
- [18] Mirabedini, S. M.; Dutil, I.; Farnood, R. R. Preparation and Characterization of Ethyl Cellulose-Based Core-Shell Microcapsules Containing Plant Oils. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2012**, 394, 74–84.
- [19] Sosnik, A.; Seremeta, K. P. Advantages and Challenges of the Spray-Drying Technology for the Production of Pure Drug Particles and Drug-Loaded Polymeric Carriers. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2015**, 223, 40–54.
- [20] Agnihotri, N.; Mishra, R.; Goda, C.; Arora, M. *Microencapsulation – A Novel Approach in Drug Delivery: A Review*; **2012**; Vol. 2.
- [21] Ghosh, S. K. Functional Coatings: by Polymer microencapsulation. Functional Coatings and Microencapsulation: A General Perspective; Dr. Swapan Kumar Ghosh; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006; p.1-28

- [22] Shah, P.; Bhalodia, D.; Shelat, P. Nanoemulsion: A Pharmaceutical Review. *Syst. Rev. Pharm.* **2010**, *1* (1), 24.
- [23] Gupta, A.; Eral, H. B.; Hatton, T. A.; Doyle, P. S. Nanoemulsions: Formation, Properties and Applications. *Soft Matter* **2016**, *12* (11), 2826–2841.
- [24] Nguon, O.; Lagugn -Labarhet, F.; Brandys, F. A.; Li, J.; Gillies, E. R. Microencapsulation by in Situ Polymerization of Amino Resins. *Polym. Rev.* **2018**, *58* (2), 326–375.
- [25] Lee, H. Y.; Lee, S. J.; Cheong, I. W.; Kim, J. H. Microencapsulation of Fragrant Oil via in Situ Polymerization: Effects of pH and Melamine-Formaldehyde Molar Ratio. *J. Microencapsul.* **2002**, *19* (5), 559–569.
- [26] Lee, A. R.; Han, C. H.; Yi, E. Preparation and Characterization of Melamine-Formaldehyde Microcapsules Containing Citrus Unshiu Essential Oil. *Fibers Polym.* **2014**, *15* (1), 35–40.
- [27] Zhou, Y.; Yan, Y.; Du, Y.; Chen, J.; Hou, X.; Meng, J. Preparation and Application of Melamine-Formaldehyde Photochromic Microcapsules. *Sensors Actuators, B Chem.* **2013**, *188*, 502–512.
- [28] Mercad -Prieto, R.; Pan, X.; Fernández-González, A.; Zhang, Z.; Bakalis, S. Quantification of Microcapsules Deposited in Cotton Fabrics before and after Abrasion Using Fluorescence Microscopy. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2012**, *51* (51), 16741–16749.
- [29] Jun-Feng, S.; Xin-Yu, W.; Sheng-Bao, W.; Yun-Hui, Z.; Kong-Ying, Z.; Xiao-Yan, Y. Interface Stability Behaviors of Methanol-melamine-formaldehyde Shell microPCMs/epoxy Matrix Composites. *Polym. Compos.* **2011**, *32* (5), 810–820.
- [30] Dawoud, B.; Amer, E.; Gross, D. Experimental Investigation of an Adsorptive Thermal Energy Storage. *Int. J. energy Res.* **2007**, *31* (August 2007), 135–147.
- [31] Fei, X.; Zhao, H.; Zhang, B.; Cao, L.; Yu, M.; Zhou, J.; Yu, L. Microencapsulation Mechanism and Size Control of Fragrance Microcapsules with Melamine Resin Shell. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2015**, *469*, 300–306.
- [32] Pretzl, M.; Neubauer, M.; Tekaat, M.; Kunert, C.; Kuttner, C.; Leon, G. G.; Berthier, D.; Erni, P.; Ouali, L.; Fery, A.; et al. Formation and Mechanical Characterization of Aminoplast Core/ Shell Microcapsules. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2012**, *4* (October 2015), 2940–2948.
- [33] Chen, W.; Liu, X.; Liu, Y.; Kim, H.-I. Synthesis of Microcapsules with polystyrene/ZnO Hybrid Shell by Pickering Emulsion Polymerization. *Colloid Polym. Sci.* **2010**, *288* (14), 1393–1399.

- [34] Cong, L.; Baijun, L.; Guang, S.; Zhicheng, L.; Xubin, Z.; Yang, H.; Li, L. Preparation and Characteristics of Nanocapsules Containing Essential Oil for Textile Application. *Flavour Fragr. J.* **2015**, *30* (4), 295–301.
- [35] Ma, Y.; Zong, J.; Li, W.; Chen, L.; Tang, X.; Han, N.; Wang, J.; Zhang, X. Synthesis and Characterization of Thermal Energy Storage Microencapsulated N-Dodecanol with Acrylic Polymer Shell. *Energy* **2015**, *87*, 86–94.
- [36] Perignon, C.; Ongmayeb, G.; Neufeld, R.; Frere, Y.; Poncelet, D. Microencapsulation by Interfacial Polymerisation: Membrane Formation and Structure. *J. Microencapsul.* **2015**, *32* (1), 1–15.
- [37] Nogueira Rodrigues Teixeira, C. S. Microencapsulation of Perfumes for Application in Textile Industry. Ph.D. Dissertation, Universidade do Porto, 2010.
- [38] Rodrigues, S. N.; Fernandes, I.; Martins, I. M.; Mata, V. G.; Barreiro, F.; Rodrigues, A. E. Microencapsulation of Limonene for Textile Application. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2008**, *47* (12), 4142–4147.
- [39] Rodrigues, S. N.; Martins, I. M.; Fernandes, I. P.; Gomes, P. B.; Mata, V. G.; Barreiro, M. F.; Rodrigues, A. E. Scentfashion®: Microencapsulated Perfumes for Textile Application. *Chem. Eng. J.* **2009**, *149* (1), 463–472.
- [40] Ashraf, M. A.; Khan, A. M.; Ahmad, M.; Sarfraz, M. Effectiveness of Silica Based Sol-Gel Microencapsulation Method for Odorants and Flavors Leading to Sustainable Environment. *Front. Chem.* **2015**, *3*, 42.
- [41] Butstraen, C.; Salaün, F.; Devaux, E. Sol-gel Microencapsulation of Oil Phase with Pickering and Nonionic Surfactant Based Emulsions. *Powder Technol.* **2015**, *284*, 237–244.
- [42] van Driessche Isabel; Serge, H. Encapsulations Through the Sol-Gel Technique and Their Applications in Functional Coatings. In *Functional Coatings*; Wiley-Blackwell, **2006**; pp 259–296.
- [43] Wang, L.-Y.; Tsai, P.-S.; Yang, Y.-M. Preparation of Silica Microspheres Encapsulating Phase-Change Material by Sol-Gel Method in O/W Emulsion. *J. Microencapsul.* **2006**, *23* (1), 3–14.

- [44] Ciriminna, R.; Sciortino, M.; Alonzo, G.; Schrijver, A. de; Pagliaro, M. From Molecules to Systems: Sol–Gel Microencapsulation in Silica-Based Materials. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (2), 765–789.
- [45] Bungenberg de Jong, H. G.; Kruyt, H. R. Coacervation (Partial Miscibility in Colloid Systems). *Proc. Natl. Acad. Sci. Amsterdam* **1929**, *32* (1927), 849–856.
- [46] NCR CORP. Pressure Responsive Record Raterial. US2730557 A, 1953.
- [47] Zuobing, X.; Wanlong, L.; Guangyong, Z.; Rujun, Z.; Yunwei, N. A Review of the Preparation and Application of Flavour and Essential Oils Microcapsules Based on Complex Coacervation Technology. *J. Sci. Food Agric.* **2013**, *94* (8), 1482–1494.
- [48] Onder, E.; Sarier, N.; Cimen, E. Encapsulation of Phase Change Materials by Complex Coacervation to Improve Thermal Performance of Woven Fabrics. *Thermochim. Acta.* **2008**, *467* (1-2), 64-72.
- [49] Wu, H.; Xue, N.; Hou, C.; Feng, J.; Zhang, X. Microcapsule Preparation of Allyl Isothiocyanate and Its Application on Mature Green Tomato Preservation. *Food Chem.* **2015**, *175*, 344–349.
- [50] Yan Cheng, S.; Chun Wah Yuen, M.; Wai Kan, C.; Ka Leung Cheuk, K.; Hin Chui, C.; Hung Lam, K. Cosmetic Textiles with Biological Benefits: Gelatin Microcapsules Containing Vitamin C. *Int J Mol Med.* **2009**, *24*, 411-419.
- [51] Aziz, S.; Gill, J.; Dutilleul, P.; Neufeld, R.; Kermasha, S. Microencapsulation of Krill Oil Using Complex Coacervation. *J. Microencapsul.* **2014**, *31* (8), 774–784.
- [52] Dong, Z. J.; Touré, A.; Jia, C. S.; Zhang, X. M.; Xu, S. Y. Effect of Processing Parameters on the Formation of Spherical Multinuclear Microcapsules Encapsulating Peppermint Oil by Coacervation. *J. Microencapsul.* **2007**, *24* (7), 634–646.
- [53] Hideaki, I.; Yoshitsugu, K. Direct Preparation of Gelatin Microcapsules on Paper Surface Using Simple Coacervation Technique. *J. Appl. Polym. Sci.* **2013**, *129* (4), 2139–2144
- [54] Pérez-Limiñana, M. Á.; Payá-Nohales, F. J.; Arán-Ais, F.; Orgilés-Barceló, C. Effect of the Shell-Forming Polymer Ratio on the Encapsulation of Tea Tree Oil by Complex Coacervation as a Natural Biocide. *J. Microencapsul.* **2014**, *31* (2), 176–183.
- [55] Huang, G.-Q.; Sun, Y.-T.; Xiao, J.-X.; Yang, J. Complex Coacervation of Soybean Protein Isolate and Chitosan. *Food Chem.* **2012**, *135* (2), 534–539.

- [56] Butstraen, C.; Salaün, F. Preparation of Microcapsules by Complex Coacervation of Gum Arabic and Chitosan. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *99*, 608-616.
- [57] Perumal, D. Microencapsulation of Ibuprofen and Eudragit® RS 100 by the Emulsion Solvent Diffusion Technique. *Int. J. Pharm.* **2001**, *218* (1), 1–11.
- [58] Li, M.; Rouaud, O.; Poncelet, D. Microencapsulation by Solvent Evaporation: State of the Art for Process Engineering Approaches. *Int. J. Pharm.* **2008**, *363* (1), 26–39.
- [59] Déjugnat, C.; Shchukin, D. G.; Sukhorukov, G. B. Microcapsules through Layer-by-Layer Assembly Technique. *Funct. Coatings By Polym. Microencapsul.* **2006**, No. i, 67–83.
- [60] De Temmerman, M.-L.; Demeester, J.; De Vos, F.; De Smedt, S. C. Encapsulation Performance of Layer-by-Layer Microcapsules for Proteins. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (4), 1283–1289.

Capítulo 2.

Objetivos

2. Objetivos

El objetivo general de esta tesis doctoral es la microencapsulación de fragancias creadas por CARINSA para su introducción en detergencia, concretamente en suavizantes.. Mediante este proceso de transformación, las fragancias estarán protegidas frente a la volatilización y serán liberadas mediante la aplicación de fricción. En el trabajo de obtención de estas microcápsulas, se buscará cumplir una serie de características específicas como por ejemplo una alta carga útil (>80%) y unos tamaños inferiores a 50 μm . Además, el desarrollo de esta tecnología propia permitirá ofrecer nuevas estrategias en las formulaciones de fragancias y también abrir una nueva oportunidad de negocio para la compañía.

Para darle un valor añadido al objetivo principal, se delimitaron unos objetivos específicos a cumplir al finalizar esta tesis:

1. **Microcápsulas de melamina-formaldehído con fragancia Tropical Fruit P780765**

Obtención de cápsulas de melamina-formaldehído adaptadas a la fragancia objetivo Tropical Fruit P780765 formulada por CARINSA y con las características especificadas en el **apartado 1.6**. Las cápsulas serán caracterizadas con diferentes técnicas analíticas para determinar que cumplen los requisitos. Se establecerán protocolos para realizar una comparativa precisa con el resto de microcápsulas desarrolladas.

2. **Microcápsulas de poliamida con fragancia Tropical Fruit P780765**

Se investigará mejorar las prestaciones de las cápsulas poliamida desarrolladas en el proyecto MICROFRAG mejorando la estanqueidad y reduciendo el tamaño. Esto implicará modificaciones del proceso en varias etapas y con variaciones en los reactivos de partida. El valor para la compañía de este sistema de encapsulación es su bajo coste energético y sus cortos tiempos necesarios para la obtención de microcápsulas. El objetivo es lograr cápsulas de poliamida con la fragancia de interés Tropical Fruit P780765 y con las modificaciones aplicadas, además de los requisitos genéricos (carga total, estabilidad, estanqueidad...).

3. **Microcápsulas de gelatina-goma arábica con fragancia Tropical Fruit P780765**

Se trabajará en la síntesis de microcápsulas con la fragancia objetivo Tropical Fruit P780765 con el uso de biopolímeros de alta disponibilidad como material de corteza. El valor diferencial de esta técnica de encapsulación es su carácter biocompatible y biodegradable, lo que lo hace un producto muy atractivo para el mercado y para los usuarios finales. Se buscará obtener cápsulas de tamaños similares a los obtenidos con los métodos químicos y que cumplan las características deseadas.

4. **Escalar los procesos desarrollados para la fragancia Tropical Fruit P780765**

En esta etapa del proyecto se buscará obtener microcápsulas de las tres técnicas desarrolladas mediante un escalado (1-3 kg) de las síntesis optimizadas. Se adaptarán los diferentes equipamientos y parámetros para lograr cápsulas con similares características a las obtenidas a escala laboratorio (50-150 g).

5. Aplicación de las cápsulas desarrolladas en tejidos

El objetivo final de las cápsulas es ir implementadas en un producto de detergencia, principalmente suavizantes. Se realizarán estudios de estabilidad para su introducción en este tipo de productos y también se realizaran estudios sobre su adhesión en un tejido y su posterior liberación por fricción.

6. Estudio de mercado o 'benchmarking'

Uno de los trabajos que se realizaran de forma continuada durante este proyecto es la caracterización de productos microencapsulados presentes en el mercado para así comparar sus características con las microcápsulas desarrolladas.

Capítulo 3.

*Encapsulación por
Polimerización in-situ*

3.1. Introducción

El primer estudio que se presenta en esta tesis corresponde a la síntesis y optimización de microcápsulas de melamina-formaldehído (MF) a través del método de polimerización *in-situ* y su adaptación a las fragancias formuladas por CARINSA. El desarrollo de estas cápsulas poliméricas se creyó relevante principalmente por dos motivos.

1. Desarrollo de las cápsulas de referencia (*benchmarking*)

El primero de ellos es poder sintetizar el tipo de cápsulas referencia del mercado (melamina-formaldehído) adaptado a las fragancias formuladas por CARINSA, debido al interés de tener esta tecnología en el portfolio de la compañía.

2. Comparativa con las otras técnicas de encapsulación

La alta presencia de este tipo de microcápsulas en el mercado no es casual ya que, como se explica más adelante en el capítulo, muestran una gran versatilidad y unas prestaciones superiores respecto a otro tipo de microcápsulas. En el transcurso de esta tesis se muestran dos metodologías de encapsulación (polimerización interfacial y coacervación compleja) que pretenden sustituir las cápsulas de melamina-formaldehído para igualar o mejorar diferentes aspectos de calidad como pueden ser la carga útil, la resistencia al entorno o la eficiencia energética de la síntesis entre otros. Por lo tanto, partiendo de los resultados de referencia obtenidos en este capítulo, se valoraran los resultados obtenidos con las otras dos técnicas.

Tal y como se mencionó en la introducción, en este tipo de procesos la reacción de polimerización se produce en la fase acuosa. Tras el proceso de polimerización, se obtiene un recubrimiento polimérico altamente entrecruzado y termoestable.

El polímero se obtiene a través de la reacción entre grupos amino, con carácter nucleófilo, y grupos carbonilo de carácter electrófilo. El producto resultante es un polímero que se denomina aminoresina. Las combinaciones más conocidas son:

- Urea-formaldehído (UF).
- Melamina-formaldehído (MF).
- Urea-melamina-formaldehído (MUF).
- Urea/Melamina-resorcinol.

Cada una de estas resinas tiene unas características fisicoquímicas concretas (resistencia a la hidrólisis, resistencia mecánica, resistencia química...) aunque se encuentran similitudes por la naturaleza del polímero y los enlaces covalentes generados.

De las resinas presentadas, para el desarrollo del proyecto se decidió la encapsulación con los monómeros melamina y formaldehído (**Figura 3.1**) para dar lugar a la resina MF. A nivel químico, lo que se produce en este tipo de reacción es una condensación entre los grupos amino de la melamina y el carbonilo del aldehído. Debido a la estructura de la melamina, con tres aminas reactivas en los extremos, se obtiene un polímero muy ramificado y con alto grado de entrecruzamiento (resina termoestable).

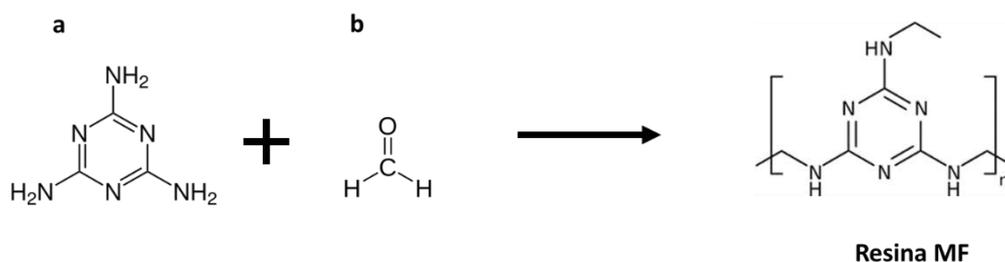


Figura 3.1. Estructura molecular de la melamina (a), formaldehído (b) y de la resina resultante de la reacción de condensación.

3.1.1. Datos de mercado

Como se ha comentado anteriormente, el amplio uso de estos polímeros en la industria de la encapsulación es debido a la elevada disponibilidad de las materias primas y su bajo coste. Por ello, a continuación se describe brevemente la situación de mercado de los monómeros implicados en el proceso de síntesis.

3.1.1.1. Melamina

La melamina es un compuesto que tiene múltiples usos en la industria química y alimentaria aunque principalmente su producción va destinada a la producción de resinas o adhesivos.

La melamina se produce mundialmente a partir de la urea mediante un proceso de dos etapas, siendo China el mayor productor mundial. Inicialmente, la urea descompone en amoníaco y ácido ciánico para posteriormente polimerizar con el propio amoníaco dando lugar a melamina [1].

Recientemente la tendencia de los precios de la melamina está en ligera subida por la gran demanda para su uso en diferentes tipos de resina [2]

3.1.1.2. Formaldehído

El formaldehído se obtiene principalmente de un proceso de oxidación catalítica del metanol. El más conocido es el proceso BASF®, mediante el cual se obtienen soluciones finales de formaldehído al 50%

y con una conversión cuantitativa del metanol [3]. Por este motivo la subida de los precios observada para el formaldehído durante los últimos años también ha afectado al precio del metanol [4]. A pesar de este incremento el formaldehído continúa ofreciendo un precio muy competitivo debido a la gran producción mundial para su uso en diferentes aplicaciones, sobretodo en resinas.

La producción anual de formaldehído se sitúa en torno a las 52 millones de toneladas. La región de mayor producción es Asia, siendo China el país con mayor capacidad con diferencia, produciendo hasta el 50% del volumen mundial (**Figura 3.2**).

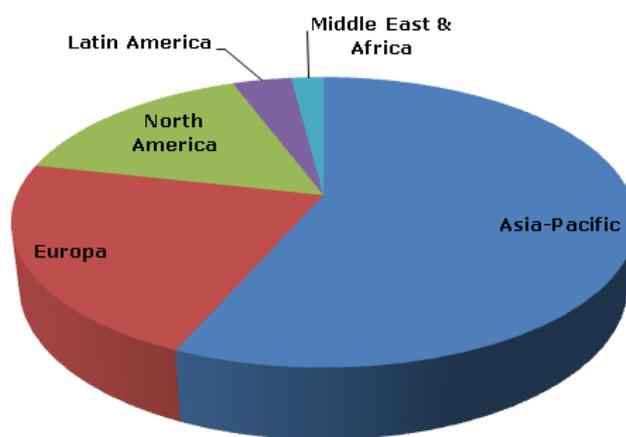


Figura 3.2. Distribución de la producción mundial de formaldehído por regiones [5].

3.1.2. Toxicidad del formaldehído

El formaldehído está considerado como tóxico en la Unión Europea [6], Estados Unidos [7] y en otras regiones del mundo por su capacidad para generar alergias en las personas más sensibles a él. Por ello, las empresas responsables de la producción de resinas basadas en formaldehído no deben sobrepasar unos límites de formaldehído libre, no sólo durante la fabricación sino también en el momento de poner el producto en el mercado, sobre todo si se trata de materiales que puedan entrar en contacto con la piel.

Un aspecto a tener en cuenta es que no todo el formaldehído está destinado a la síntesis de resinas. En la industria del tejido es un componente usado con frecuencia para dotar a las prendas de mejores propiedades como menor arrugabilidad, capacidad fungicida o mejor fijación del color.

En algunas regiones del mundo, como en Japón, Estados Unidos o la Unión Europea, ya se está legislando respecto a los niveles máximos permitidos de formaldehído presente en prendas destinadas a varios usos. Dependiendo del tejido y el país, los niveles varían, no obstante todos se

encuentran alrededor de las partes por millón (ppm). En la **Tabla 3.1** se muestran algunos de estos límites establecidos dependiendo de la normativa reguladora.

| | Prendas infantiles (ppm) | Prendas en contacto con la piel (ppm) | Otras prendas o tejidos (ppm) |
|---|---------------------------------|--|---|
| Ley Japón No.112 | 20 | 75 | |
| Union Europea Eco-label | 30 | 75 | 300 |
| Oeko-tex standard 100 | 20 | 75 | 300 |
| Certificación DIN CERTCO para productos textiles | 20 | 75 | 300 |
| EU eco.label para calzado | | | <ul style="list-style-type: none"> • Textil 75 • Piel 150 |
| EU eco-label para colchones | | | <ul style="list-style-type: none"> • Colchones 30 |
| EU eco.label para mobiliario | | | <ul style="list-style-type: none"> • Piel 150 |

Tabla 3.1. Límites máximos permitidos de formaldehído libre en textiles y productos similares según diferentes normativas a nivel mundial [8].

Por todos los motivos mencionados, es muy importante tener sistemas fiables para la detección de formaldehído libre. Para ello, se han ido desarrollando diferentes métodos analíticos que permiten cuantificar la presencia de este compuesto. Los métodos más usados para la determinación de formaldehído están basados en:

- Colorimetría y espectrofotometría
- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)
- Cromatografía de gases (GC y GC-MS)
- Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)
- Fluorimetría y quimioluminiscencia
- Sensores enzimáticos
- Otros

Además, en relación con el sector textil se han establecido procedimientos analíticos estandarizados por EDANA (European Disposable and Nonwovens Association) para el control de formaldehído de la manera más precisa y rigurosa [8]. Por lo tanto, teniendo en cuenta que la síntesis de microcápsulas

de este tipo usa formaldehído y que las cápsulas están destinadas a atraparse en las fibras de prendas, es obligatorio controlar los niveles en el producto final.

3.1.3. Estrategias de control del formaldehído

En la polimerización *in-situ* el formaldehído genera puentes entre las moléculas de melamina (en caso de usar este monómero), por lo que se utiliza un exceso para asegurar la correcta reticulación de toda la resina. Además, en algunas de las condensaciones de la resina, sobre todo a mayores temperaturas (>60°C) algunas de las terminaciones del polímero pueden generar moléculas de formaldehído mediante la reacción que se muestra en la **Figura 3.3**.

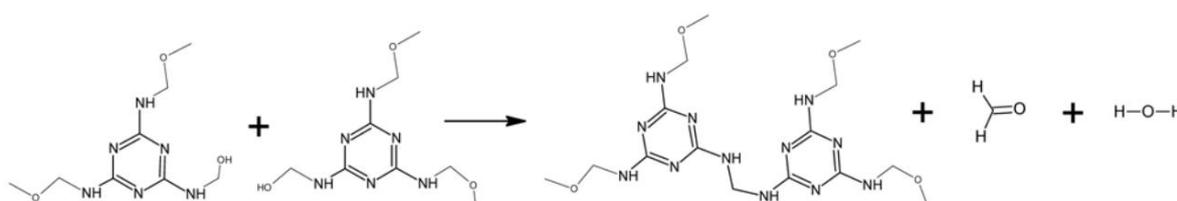


Figura 3.3. Esquema de liberación de formaldehído durante la formación de puentes metilénicos [8].

Por lo tanto, es posible encontrar formaldehído libre en el material final. Esto se aplica también al proceso de generación de la corteza de las microcápsulas, tras el cual el formaldehído puede encontrarse en la fase acuosa. Por ello, se han ido creando estrategias para eliminar la presencia de este compuesto como se describen a continuación.

3.1.3.1. Atrapadores de formaldehído

Los atrapadores (o *scavengers* en inglés) son moléculas con carácter nucleófilo que tienen una tendencia alta a reaccionar con el formaldehído libre dando lugar a nuevas especies menos tóxicas o inocuas.

Los atrapadores más utilizados son:

- Amoníaco/sales de amonio

El amoníaco o las sales de amonio son uno de los compuestos más usados para minimizar los niveles de formaldehído en las suspensiones de microcápsulas. La reacción de estos compuestos con formaldehído da lugar a hexametilentetramina en las siguientes relaciones estequiométricas:



La velocidad de la reacción aumenta con el pH hasta un máximo situado en torno a pH=9-10. Además, la hexametilentriamina es un compuesto con una baja volatilidad y sus correspondientes soluciones son relativamente estables presentando un bajo grado de hidrólisis, es decir, raramente vuelven a generar formaldehído y amoníaco.

➤ Urea /Melamina

La urea y la melamina, además de ser los monómeros de partida junto con el formaldehído en las polimerizaciones, también se pueden usar como atrapadores del formaldehído residual en fases finales de procesos de encapsulación. El resultado en este caso no es el de la formación de polímero de corteza sino de oligómeros que permanecen solubles en agua.

➤ Otros

Además de los atrapadores mencionados anteriormente, se siguen investigando alternativas para minimizar los niveles de formaldehído libre. Se ha demostrado el atrapamiento con diferentes sales inorgánicas como metabisulfito sódico para formar aductos [9], con polimerizaciones con derivados de la madera como los taninos [10], y con suspensiones de partículas de etil celulosa para una liberación prolongada del atrapador [11].

3.1.3.2. Sustitutos del formaldehído

Otra estrategia usada para disminuir o eliminar la cantidad de formaldehído consiste en su sustitución parcial o total por otros compuestos capaces de entrecruzar la melamina durante la polimerización. Por ejemplo, el uso de resinas modificadas con metanol (*Metanol-Melamina-Formaldehído*, MMF) permite reducir la cantidad de formaldehído en la reacción sin perder la eficiencia de polimerización. En este caso, el metanol sustituye el formaldehído en los extremos de los oligómeros generados, provocando extensiones de la resina de la misma manera que lo haría el formaldehído (como se explicará más adelante).

Por otro lado, hay compañías que han continuado innovando en el desarrollo de sistemas más sostenibles y abogan por usar compuestos de alta reactividad que puedan sustituir completamente al formaldehído en el proceso de polimerización *in-situ*. Algunos ejemplos de compuestos alternativos son el glutaraldehído, el glioxal o el 2,2-dimetoxiacetaldehído (**Figura 3.4**).

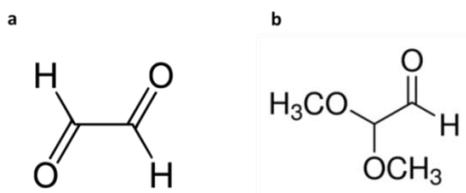


Figura 3.4. Compuestos usados como sustitutos del formaldehído en la síntesis de cápsulas. **(a)** Glioxal; **(b)** 2,2-dimetoxiacetaldehído [12].

Ambos compuestos son más seguros que el formaldehído y en ningún caso la degradación del polímero daría lugar a la liberación de éste.

3.1.4. Polimerización en los procesos de microencapsulación

El proceso de polimerización para la obtención de una aminoresina de tipo MF debe adaptarse a un proceso de encapsulación en una emulsión O/W. Para ello es necesario tener en cuenta los aspectos que se describen a continuación.

3.1.4.1. Preparación del prepolímero

La polimerización *in-situ* con el uso de melamina y formaldehído se produce en la fase acuosa por lo que los monómeros deben encontrarse solubilizados en el agua. Teniendo en cuenta que la melamina es un sólido a temperatura ambiente y muy poco soluble en agua, se requiere una preparación previa para poder usarla en el proceso de encapsulación.

Inicialmente se dispersa la melamina en agua en presencia de un exceso de formaldehído. A alta temperatura ($>60\text{ }^\circ\text{C}$) y a pH básicos (8-9) la reacción de condensación da lugar a lo que se denominan especies metilodadas (o prepolímero MF).

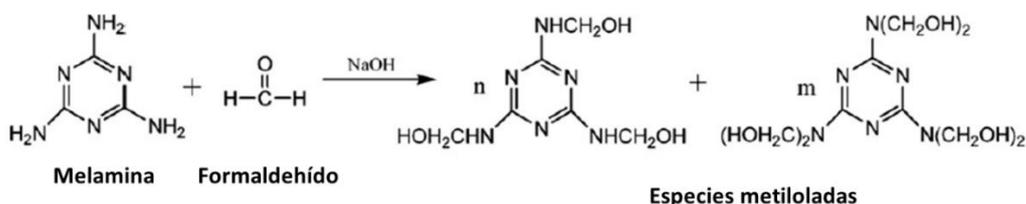


Figura 3.5. Reacción de formación de las especies metilodadas solubles en medio acuoso [13].

Como se puede apreciar en la **Figura 3.5** en las aminas primarias terminales de la melamina pueden condensar una o dos moléculas de formaldehído dando lugar a especies hidrosolubles. Para evitar que estas especies puedan continuar reaccionando en disolución hasta formar el polímero, es necesario estabilizar las soluciones o hacer uso de ellas al poco tiempo de ser preparadas.

3.1.4.2. Polimerización y curado

En esta segunda etapa todas las especies metiloladas condensan entre ellas dando lugar a cadenas de oligómeros y finalmente polímeros. En el proceso de encapsulación las cadenas oligoméricas deberán depositarse en la interfase agua/aceite (de la emulsión previamente preparada) generando la corteza final de la microcápsula.

Para promover esta segunda etapa es necesaria una catálisis ácida y un incremento de la temperatura en la mayoría de los casos. Inicialmente en el proceso de polimerización se generan puentes covalentes con átomos de oxígeno en la parte central de éste y aunque en esta disposición los enlaces son resistentes, son susceptibles a la hidrólisis. Para fortalecer estas estructuras se promueve la generación de enlaces metilénicos mediante una mayor aplicación de calor, que los hace más resistentes a la hidrólisis [14].

En la **Figura 3.6** se resume de manera esquemática todas las transformaciones que sufren los monómeros hasta dar lugar a la resina.

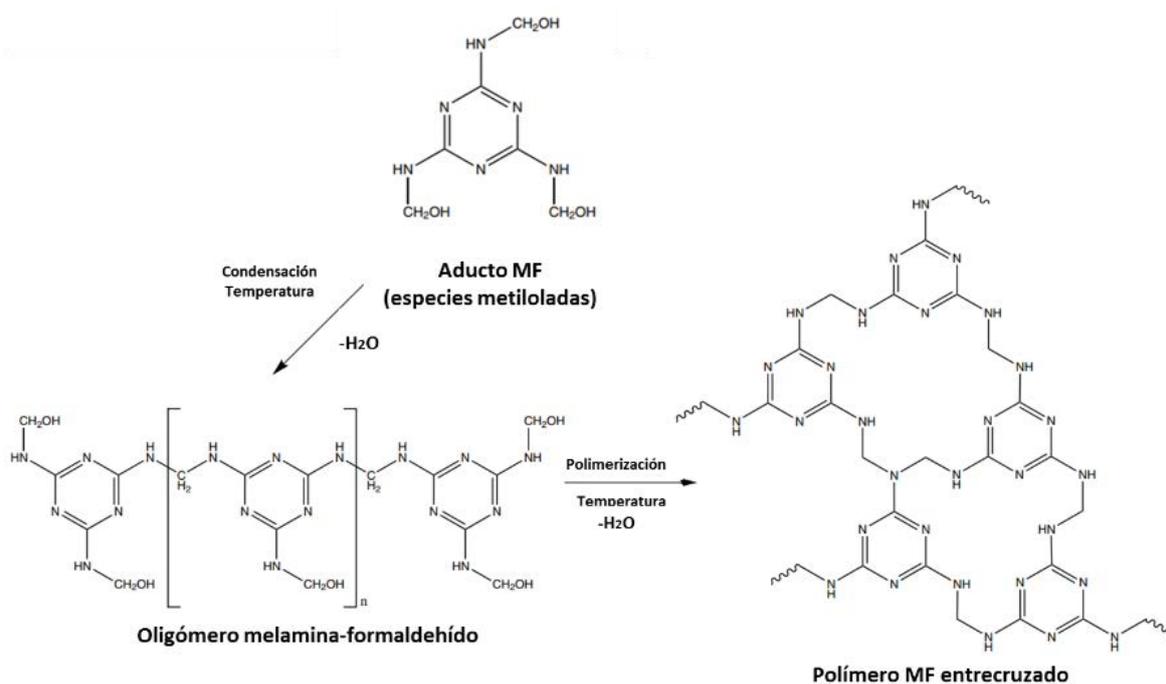


Figura 3.6. Esquema global de la reacción de condensación de resinas MF [15].

3.1.4.3. Otros requerimientos para la encapsulación de núcleos hidrofóbicos

Con el objetivo de adaptar este tipo de polimerización a procesos de encapsulación es necesaria la generación de emulsiones tipo aceite en agua (O/W) que permitan la migración del prepolímero solubilizado en la fase acuosa (especies metiloladas) hacia la interfase con la fase discontinua (aceite

o una fragancia), y la posterior polimerización. El resultado es la generación de una corteza suficientemente gruesa y estable que da lugar a una microcápsula con estructura núcleo-corteza.

Uno de los elementos más importantes en la síntesis de este tipo de cápsulas son los estabilizantes y/o aditivos que favorezcan a la deposición del prepolímero sobre la superficie de las gotas. La reacción de melamina-formaldehído es un proceso lento en el cual la emulsión debe permanecer estable durante un periodo largo de tiempo a diferencia de otros procesos más rápidos. Esto implica el uso de aditivos que estabilicen las gotas durante todo ese periodo y que a su vez también favorezcan el proceso de polimerización.

En el transcurso de este proyecto se han explorado diferentes estabilizantes y emulsionantes y combinaciones de estos como se mostrará más adelante. El uso de unos u otros pueden afectar diferentes aspectos de la encapsulación como puede ser la estructuración del polímero en la interfase, la velocidad de polimerización o la morfología final de las microcápsulas.

Los estabilizantes con mejores prestaciones para este tipo de procesos son:

- Dodecil sulfato de sodio (SDS).
- Dodecil bencensulfonato de sodio (SDBS).
- Derivados y copolímeros de polisulfonatos.
- Polímero de estireno-co-maleico anhídrido (Poly-SMA).
- Goma arábica (GA).

La mayoría de los estabilizantes presentados contienen grupos cargados negativamente o son precursores de moléculas que pueden generarlos. La presencia de estas cargas negativas es muy importante ya que las especies metiloladas se encuentran levemente cargadas de manera positiva en el proceso de microencapsulación. Por lo tanto, un estabilizante con la carga opuesta tenderá a atraer y mantener el prepolímero en la interfase aceite-agua con mayor eficacia. En la **Figura 3.7** se muestra esquemáticamente como un estabilizante negativo (SMA) se sitúa en la interfase aceite/agua atrayendo con sus cargas negativas al prepolímero localizado en la fase acuosa.

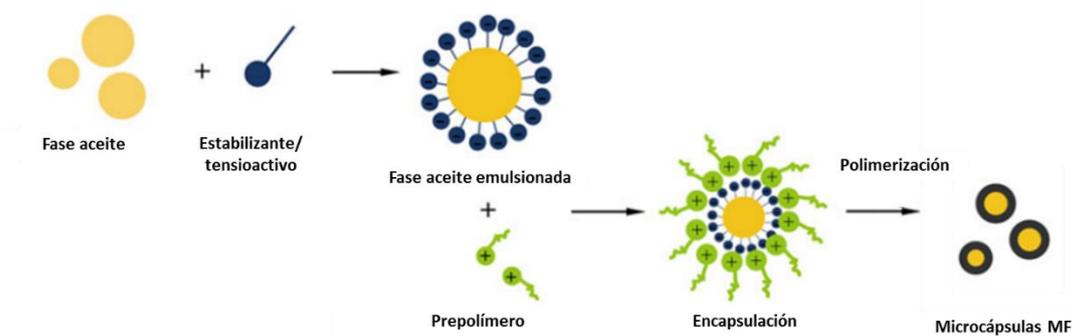


Figura 3.7. Representación gráfica del fenómeno de atracción del prepolímero en la interfase favorecido por la presencia de estabilizantes cargados negativamente [16].

3.1.5. Principales características de las cápsulas MF

Como se ha comentado antes, las cápsulas de MF son del tipo más utilizado para la microencapsulación de fragancias. Esto es debido principalmente a una serie de **ventajas** que tanto el material como el proceso sintético ofrecen respecto a otros sistemas. Estas se definen a continuación:

- Resistencia y impermeabilidad

Los polímeros que se obtienen en estos procesos son resinas resistentes a muchas condiciones ambientales como puede ser la humedad, el calor o pH agresivos. En el caso de las resinas MF, las tres direcciones de polimerización y la rigidez de los enlaces covalentes formados aportan una muy buena impermeabilidad, propiedad útil para retener líquidos (incluso volátiles) en su interior y la fragilidad adecuada para permitir la ruptura mecánica (propiedad deseable en suavizantes).

- Versatilidad de núcleos

La técnica de polimerización *in-situ* es ideal para la encapsulación de una gran variedad de compuestos hidrófobos. A diferencia de otras técnicas, como polimerización interfacial, la presencia de grupos funcionales en el núcleo no afecta de manera tan crítica a la polimerización ya que ésta se produce en la fase acuosa y el polímero no interacciona con compuestos localizados en el núcleo hidrofóbico. Esta resina no sólo se usa para la encapsulación de fragancias, sino que también para aceites esenciales, materiales de cambio de fase, etc. (ver apartado 1.5.3.2).

- Disponibilidad reactivos

Como se ha mencionado anteriormente, los reactivos de partida que generan la corteza tienen una gran disponibilidad comercial y los precios se mantienen constantemente bajos. Desde el punto de vista industrial éste es uno de los aspectos más importantes ya que permite dar un valor añadido a las fragancias sin que el gasto en material sea excesivo.

➤ Alta carga

Uno de los aspectos más importantes a la hora de medir la calidad de las cápsulas es la carga que admite. En las cápsulas de melamina-formaldehído la carga útil o *payload* supera el 80% en la mayoría de los casos. En el caso de fragancias es muy importante tener un valor alto de carga ya que implica una mayor cantidad liberada tras la ruptura.

➤ Síntesis en medio acuoso

Otro beneficio desde el punto de vista industrial es el hecho de ser un proceso que ocurre en agua. Hoy en día cualquier proceso industrial de encapsulación que implique el uso de disolventes orgánicos con sus correspondientes separaciones o destilaciones no es deseado. Además, sabiendo que estos productos tienen que acabar en contacto con la piel es necesario ser cuidadoso con los procesos de síntesis.

➤ Desarrollo avanzado

Esta técnica de encapsulación es de las más usadas y de mayor antigüedad. Este hecho, unido al creciente interés de la encapsulación en los últimos años, ha hecho que sea una técnica muy optimizada y mejorada para la encapsulación de sustancias hidrófobas.

A pesar de todas estas ventajas presentadas, los procesos de encapsulación con este tipo de materiales también presentan inconvenientes importantes que se tienen que solucionar para poder extender su aplicación. Algunos de estos **inconvenientes** se mencionan a continuación:

➤ Formaldehído

Se trata de un compuesto tóxico y el proceso de síntesis requiere una serie de medidas de etapas para reducir al máximo su presencia en el producto final.

➤ Proceso lento

A diferencia de otros procesos de encapsulación, como la polimerización interfacial para obtener cápsulas de poliamida, éste necesita periodos de tiempo más largos (hasta 6 horas) para generar la corteza de las microcápsulas y endurecerla. Además, en caso de preparar el prepolímero previamente también supone un mayor tiempo de síntesis.

➤ Control de temperatura y pH

Los parámetros a los cuales el sistema es más sensible son la temperatura y el pH. Hay que tener en cuenta que la reacción de polimerización se produce a pH ácidos y la polimerización final viene

favorecida por un incremento de temperatura. Los dos parámetros deben ser muy bien ajustados ya que un pH demasiado ácido o una temperatura demasiado alta pueden dar lugar a polimerización descontrolada antes de que la resina se deposite sobre las gotas. En el caso contrario, pH altos y temperaturas bajas, el proceso podría alargarse demasiado y la polimerización podría ser incompleta. Una consecuencia de mala optimización de estos factores puede ser la formación de partículas de polímero generadas antes de que se deposite en la interfase (**Figura 3.8**). Además, las altas temperaturas aplicadas y los largos tiempos de reacción favorecen la volatilización de fragancias, por lo que el ajuste de estos parámetros es fundamental para que el proceso de microencapsulación sea óptimo y se encapsule la mayor cantidad de fragancia posible.

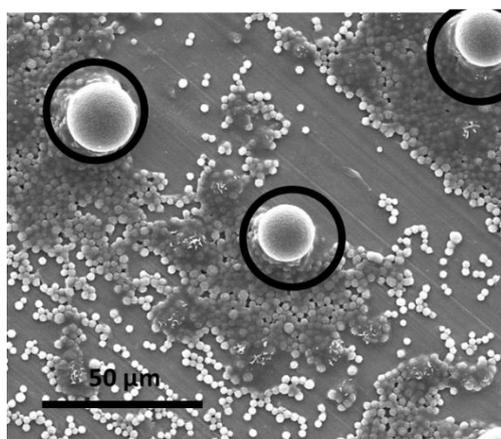


Figura 3.8. Imagen SEM donde se muestra la generación de resina MF estructurada en partículas (1-3 μ m) en lugar de formar parte de las cápsulas (marcadas con un círculo).

Además, las altas temperaturas y los largos tiempos de reacción favorecen la volatilización de fragancias, por lo que

- Poca variedad de monómeros

La corteza consta generalmente de dos monómeros: melamina y formaldehído. Las resinas se podrían obtener a partir de otras alternativas como puede ser la urea, el resorcinol o mezclas, pero a diferencia de otros procesos de encapsulación, donde existe más variedad y tipos de monómeros, en éste sistema la selección es más limitada

En resumen, este tipo de cápsulas están muy bien aceptadas en el mercado por sus excelentes prestaciones, bajo coste y por los avances de las compañías en realizar suspensiones acuosas con bajo contenido de formaldehído. De todas maneras, hay inconvenientes intrínsecos del proceso de síntesis (condiciones experimentales y reactivos de partida) que promueven la búsqueda y el desarrollo de cápsulas con otros materiales como los que se han investigado en el transcurso de este proyecto.

3.2. Encapsulación de un aceite monocomponente

Tras la selección de los monómeros de partida para la encapsulación por polimerización *in-situ* (melamina y formaldehído), se iniciaron los experimentos para la encapsulación de un aceite monocomponente. Como bien se explicó en el apartado 1.6, el primer propósito fue el de obtener de manera satisfactoria cápsulas MF con un núcleo hidrofóbico más simple que la fragancia objetivo final.

3.2.1. Preparación de prepolímero para la encapsulación

En todos los experimentos realizados a escala laboratorio (encapsulación de aceite monocomponente, fragancia simple y fragancia compleja) se sintetizó el prepolímero *in-situ* antes de proceder con el proceso de encapsulación, tal y como se describe en el **Protocolo MF.1** (ver **Anexo I**). En el caso de que en el futuro se hicieran experimentos a escalas mayores la alternativa sería la de comprar prepolímeros preparados comerciales ya que en el mercado se venden soluciones altamente concentradas, estabilizadas y con cantidades mínimas de formaldehído libre. La otra alternativa sería sintetizarlos en grandes cantidades y estabilizarlos para su almacenamiento.

De manera esquemática el proceso de formación de prepolímero se muestra en la **Figura 3.9**.

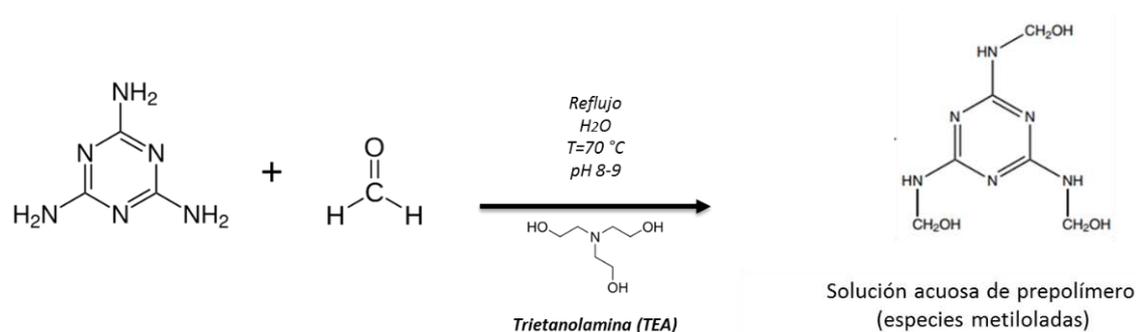


Figura 3.9. Esquema de la reacción de formación del prepolímero MF.

La adición de la trietanolamina (TEA) tiene una función doble en este caso. La primera es la de tamponar la solución en un pH básico (8-9) para catalizar el proceso y la segunda es la de crear enlaces de entrecruzamiento en las terminaciones de las especies metiloladas. La adición de agua por su parte es necesaria para poder disponer de una disolución no demasiado viscosa y manipulable del prepolímero. El aspecto obtenido de este proceso debe ser una solución transparente.

3.2.2. Selección de aceite, síntesis y optimización

El tipo de núcleo a encapsular en los primeros experimentos fue un aceite, que debido a su carácter hidrofóbico, es un compuesto altamente compatible con la técnica de polimerización *in-situ* con MF

como material encapsulante. Además, los aceites pueden ser usados como disolventes para la encapsulación fragancia, aumentando así la retención de éstas últimas en la microcápsulas.

El aceite seleccionado para este proyecto fue el Miglyol®812 (en adelante Miglyol), un triglicérido de los ácidos grasos cáprico y caprílico, de baja toxicidad y usado ampliamente en la industria cosmética (**Figura 3.10**). Además, el hecho de no poseer grupos funcionales reactivos permite su uso tanto en la síntesis de cápsulas por polimerización *in-situ* como en otros métodos de preparación de cápsulas que involucran reacciones químicas, como por ejemplo, la polimerización interfacial.

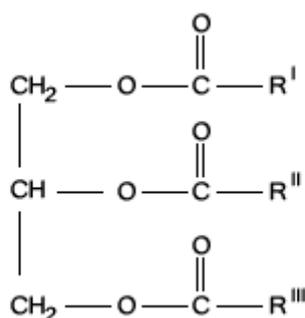


Figura 3.10. Estructura química del Miglyol®812 donde R', R'' y R''' son ácidos grasos saturados C8 y C10.

La encapsulación del aceite no sólo sirvió para familiarizarse con la técnica de síntesis y la optimización de los parámetros experimentales (concentración, agitación, etc.) sino que ha permitido establecer los procesos de limpieza y aislamiento de las microcápsulas tanto para la técnica de polimerización *in-situ* como para el resto de técnicas expuestas en esta tesis. Para la caracterización cualitativa de las primeras síntesis, se realizaron primero análisis por microscopía óptica (OM) y posteriormente por microscopía de barrido electrónico (*scanning Electron microscopy* o SEM). Más detalles en los **Protocolos OM.1 y SEM.1**.

En las primeras pruebas con aceites se usaron las cantidades especificadas en la bibliografía [17] siendo el PVA (alcohol polivinílico) y el SDBS los estabilizantes seleccionados por su efectividad contrastada para una correcta deposición de la resina.

El desarrollo y optimización del proceso de encapsulación resultó presentar más complicaciones de lo esperado desde un principio. La sensibilidad a los cambios de temperatura o pH para la polimerización son algunas de las principales dificultades que se observaron. Algunos de estos problemas detectados fueron por ejemplo una baja estabilización de la emulsión en el momento de la polimerización, o un exceso de reactividad provocando polimerizaciones descontroladas. En la **Figura 3.11** se muestra el aspecto final de una síntesis donde la encapsulación no fué efectiva, pudiéndose observar la presencia

de aceite libre en un portamuestras de SEM junto con lo que parecen ser algunas cápsulas esféricas formadas.

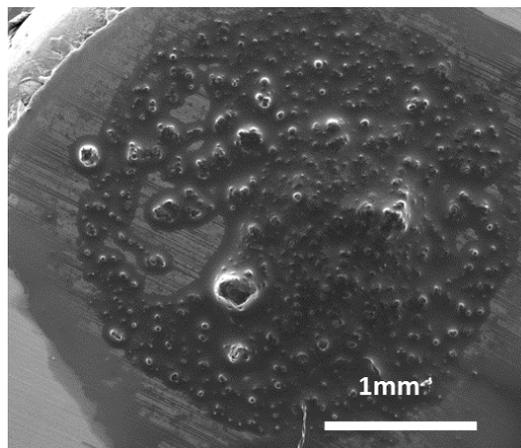


Figura 3.11. Imagen SEM de una síntesis fallida de cápsulas MF con Miglyol como núcleo.

Tras los primeros resultados negativos, se realizó una batería de experimentos donde se variaron diferentes parámetros de la reacción. En la **Tabla 3.2** se muestran todos los factores modificados y los rangos de valores que se usaron en los experimentos.

| Condiciones | Rango de valores |
|--|--------------------------|
| Cantidad prepolímero | 2.4 g - 4.8 g |
| Cantidad de aceite a encapsular | 15 g - 30 g |
| Tipos de estabilizantes | SDBS, PVA, SDS, Tween®80 |
| Concentración total de estabilizante | 1%p/p |
| Proporción (en peso) aceite:polímero | 1:1 - 6:1 |
| Proporción (en peso) aceite:fase acuosa | 1:10 - 1:4 |
| Velocidad de emulsificación (Ultra-Turrax®) | 500 - 5000 rpm |
| Velocidad de agitación (magnética) | 300 - 900 rpm |
| Velocidad de acidificación (Acético 10% p/p) | 1 mL/h - 3 mL/h |
| pH de polimerización | 5.7 - 4.0 |
| Temperatura | Constante/Gradiente |

Tabla 3.2. Lista de variables y rangos de valores usados para la optimización de la síntesis de cápsulas MF con Miglyol.

Finalmente, tras realizar ajustes principalmente en la velocidad de acidificación y la cantidad de prepolímero, se consiguieron cápsulas de Miglyol correctamente formadas, estables incluso tras el secado y dentro del rango de tamaño deseado (<50 μm) (**Figura 3.12, Tabla 3.3**).

| Condiciones | Valores |
|--|---|
| Cantidad prepolímero | 4.8 g (20 g solución 24%p/p de prepolímero) |
| Cantidad de aceite a encapsular | 30 g |
| Tipo de estabilizantes | SDBS y PVA |
| Concentración total de estabilizante | 1% p/p (0.9%p/p SDBS + 0.1% p/p PVA) |
| Proporción (en peso) aceite:polímero | 1:6.25 |
| Proporción (en peso) aceite:fase acuosa | 1:4 |
| Velocidad de emulsión (Ultra-Turrax) | 5000 rpm |
| Velocidad de agitación (magnética) | 900 rpm |
| Velocidad de acidificación (Acético 10%) | 1 mL/h |
| pH de polimerización | 5.5 |
| Temperatura | Gradiente de 30 a 60 °C |

Tabla 3.3. Condiciones optimizadas para la encapsulación de Miglyol.

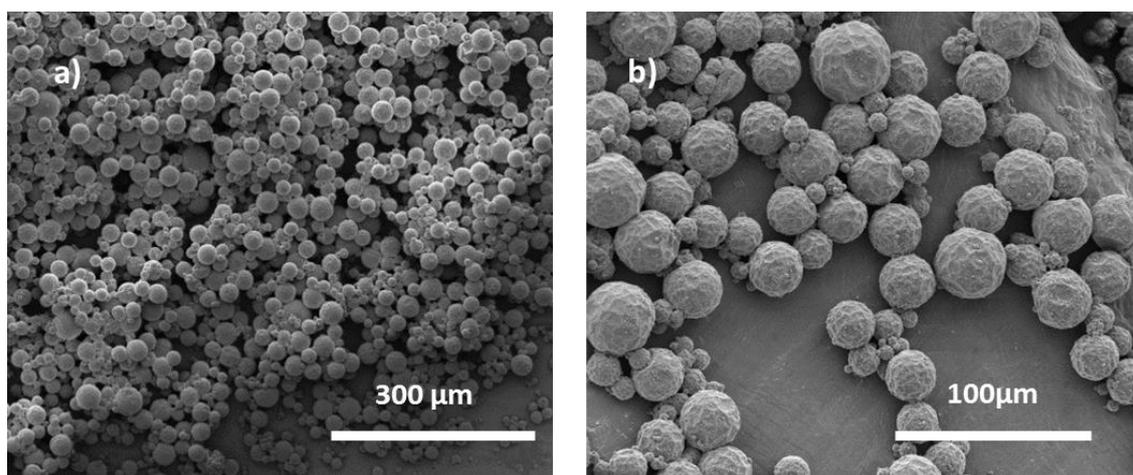


Figura 3.12. a) Imagen SEM de cápsulas MF de Miglyol; b) imagen SEM de las cápsulas MF de Miglyol donde se puede apreciar la corteza rugosa.

Como puede apreciarse en las imágenes de SEM, la corteza es algo rugosa pero no se observaron grietas y a nivel macroscópico la suspensión apareció bastante homogénea indicando una baja agregación entre las cápsulas.

➤ *Determinación del contenido en aceite mediante ¹H-RMN*

Tras confirmar la formación de las microcápsulas, se quiso determinar la cantidad de aceite encapsulado. Para su determinación fue necesario romper las cápsulas y posteriormente extraer su contenido.

Para evitar la interferencia del agua en el análisis, ésta se eliminó mediante la liofilización. Para ello, se extrajo una muestra representativa de cápsulas, se congelaron con nitrógeno líquido y se liofilizaron durante un periodo de 48 h mediante el procedimiento descrito en el **Protocolo LIOF.1**. La liofilización es un proceso de deshidratación que se usa principalmente en la industria de la alimentación para conservar alimentos durante largos periodos de tiempo. En este procedimiento el material se congela y a continuación se le aplica un proceso de sublimación del agua a muy bajas presiones (< 1 mBar). Con esto se consigue eliminar prácticamente la totalidad del agua preservando la estructuración del material. El resultado de la liofilización de las microcápsulas fue la obtención de un polvo muy fino y altamente redispersable en agua. Para la caracterización del interior y la determinación de la carga se indujo la ruptura de las cápsulas con disolvente y agitación magnética. Los disolventes que mostraron facilidad para la ruptura fueron principalmente acetona y cloroformo.

Para estas cápsulas se usó la forma deuterada del cloroformo (por una mayor disponibilidad y un precio más bajo que la acetona deuterada) para así poder analizar directamente el contenido por resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN). El resultado de la ruptura con cloroformo por agitación fue el adecuado (se verificó por SEM, **Figura 3.13**), fragmentando todas las microcápsulas y extrayendo el contenido. Este procedimiento se explica en detalle en el **Protocolo RUPTRMN.1**.

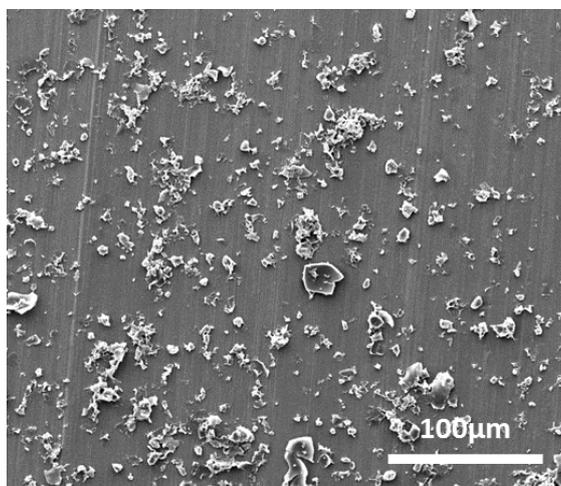


Figura 3.13. Imagen SEM de cápsulas rotas tras el tratamiento con cloroformo y agitación magnética.

Para realizar una cuantificación del Miglyol encapsulado se usó el método de patrón interno, método que consiste en añadir una cantidad conocida de un compuesto y relacionar sus correspondientes señales de protones ya conocidas con las señales de la muestra a cuantificar. Como compuesto de referencia se usó la dimetilformamida (DMF) al tratarse de un disolvente no volátil, miscible con el cloroformo, y que además sus señales se encuentran en una región donde no se solapan con los del aceite (8.1, 3 y 2.7 ppm). Como se puede apreciar en la comparativa de espectros (**Figura 3.14**), los picos observados para las cápsulas liofilizadas coinciden con los del Miglyol libre por lo que se pudo

confirmar la presencia de éste en el núcleo. Para la obtención de estos espectros se siguió las condiciones especificadas en el **Protocolo RMN.1**.

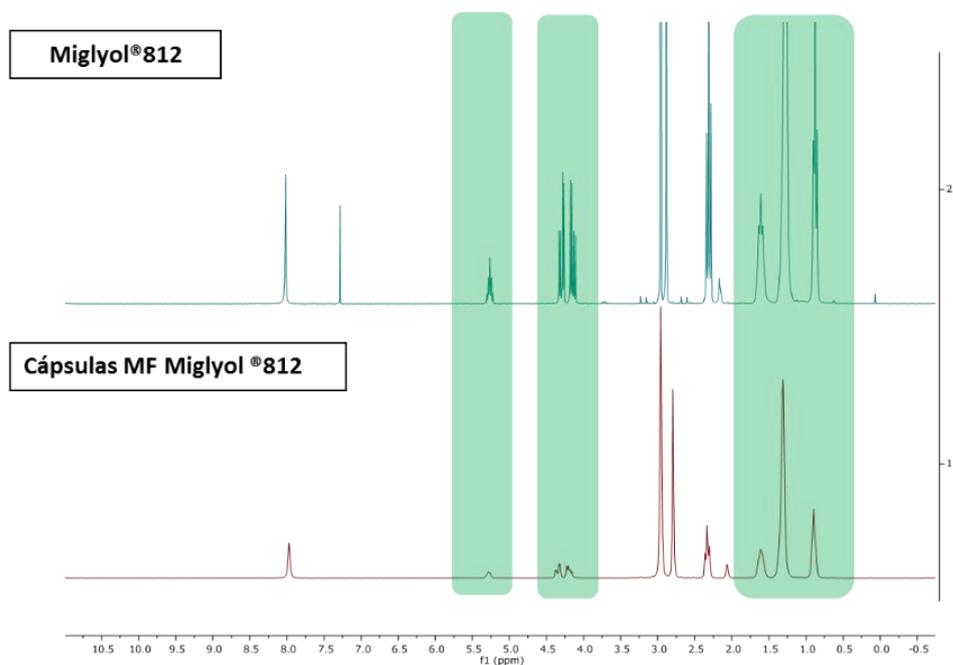


Figura 3.14. Espectros ^1H -RMN de las cápsulas MF de Miglyol rotas en comparación con el aceite libre. En verde se indican las señales correspondientes al aceite.

Mediante el uso de DMF como patrón interno y con el uso del **Protocolo CALC.1** se determinó una **carga útil del 93%** en peso. Esta cantidad de aceite encapsulado, sumado a las características observadas con microscopía (tamaño, estabilidad y buena dispersión) se consideraron adecuadas para poder proceder con la encapsulación de una fragancia.

Éste método de análisis fue usado para todos los estudios en que se encapsularon moléculas discretas o un máximo de mezclas de dos componentes. Cuando se analiza una mezcla más compleja, como es el caso de la mayoría de fragancias, la técnica de ^1H -RMN no puede dar un valor tan preciso. En caso de realizarse, pueden apreciarse cambios en la aparición o desaparición de picos, en cambios de intensidad o superposiciones de varias señales que hace prácticamente imposible cuantificar cada uno de los componentes. Como se mostrará más adelante, la técnica más adecuada para determinar los componentes de mezclas de fragancia fue la cromatografía de gases en combinación con un espectrofotómetro de masas (GC-MS).

3.3. Encapsulación de fragancias simples

3.3.1. Síntesis iniciales

Tras obtener satisfactoriamente cápsulas de aceite se comenzaron a encapsular fragancias simples (4-20 componentes) utilizando las condiciones optimizadas para Miglyol (**Tabla 3.3**). La fragancia seleccionada para este caso concreto fue Apple Top FCAPP952505 (denominada APPLE durante el proyecto). La selección de esta fragancia fue por los buenos resultados obtenidos con la técnica de polimerización interfacial durante el proyecto MICROFRAG (más detalles en el **Capítulo 4**).

La fragancia APPLE está compuesta solamente de cuatro componentes (más detalles en **Anexo II**), los cuales tienen una volatilidad muy alta y, por lo tanto, la correcta encapsulación de estos compuestos validaría la gran capacidad de retención de las cápsulas de MF.

Pese a usar las mismas condiciones optimizadas para la encapsulación de aceites (**Tabla 3.3**), no fue posible la correcta encapsulación de este nuevo núcleo. En la mayoría de los intentos realizados se observaron fenómenos de agregación de las cápsulas en la parte final del proceso y en algunos casos la incompleta formación de las cápsulas (**Figura 3.15**).

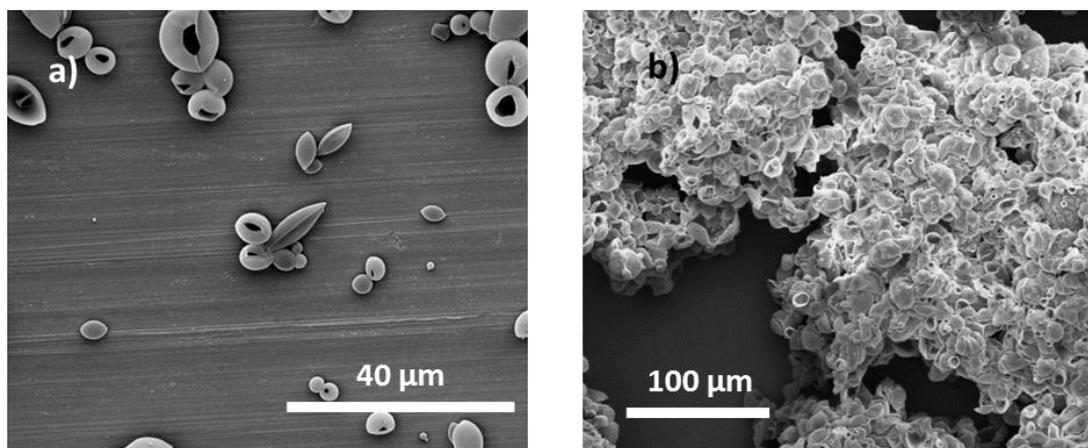


Figura 3.15. Imagen SEM de: a) Una síntesis donde se observan cápsulas MF de APPLE incompletas; b) Una síntesis de cápsulas MF de APPLE donde se formaron agregados.

En la **Figura 3.15.a.** se puede observar claramente como el polímero no llegó a sellar completamente las gotas de fragancia. Este efecto sólo se pudo observar tras el secado ya que en suspensión mantenían la morfología esférica. La hipótesis más probable fue que al estar trabajando con una mezcla excesivamente volátil, ésta tiende a evaporarse y escaparse si las cápsulas no se encuentran totalmente selladas. Este hecho demostró que la encapsulación de compuestos volátiles como son las fragancias, incluso con este tipo de materiales de corteza, necesita de modificaciones y mejoras para lograr una buena estanqueidad.

3.3.2. Optimización de parámetros para la encapsulación de la fragancia APPLE

De igual manera que en la encapsulación del Miglyol, se iniciaron una serie de modificaciones en los parámetros para superar los inconvenientes de la agregación y falta de estanqueidad. Los cambios principales se enfocaron en los siguientes puntos (**Tabla 3.4**).

| Condiciones | Rangos de valores |
|--|--------------------------------------|
| Velocidad de agitación | 450-1200 rpm |
| Tipos de estabilizantes | SDBS, PVA, SDS |
| Concentración total de estabilizante | 1-3%p/p en fase acuosa |
| Aceite mezclado con la fragancia | 5-25% respecto al total de la mezcla |
| Velocidad de emulsión (Ultra-Turrax) | 500 - 5000 rpm |
| Velocidad de agitación (magnética) | 300 - 900 rpm |
| Velocidad de acidificación (Acético 10%) | 1 mL/h - 3 mL/h |
| pH de polimerización | 4.0 - 5.5 |

Tabla 3.4. Lista de variables y rangos de valores usados para la optimización de la síntesis de cápsulas MF con APPLE.

Tras la realización de varios experimentos sin éxito donde se modificaron los parámetros descritos, se encontró una solución, tras revisar la bibliografía, que consistió en modificar el parámetro de la temperatura [18]. En este artículo, inicialmente la mezcla de reacción se calienta a 45 °C y transcurrida 1 h se aumenta hasta 85 °C acelerando así la formación de puentes metilénicos que dan una mayor rigidez y estanqueidad a la resina y en consecuencia, a la corteza de la microcápsula. Estas temperaturas podrían considerarse excesivas teniendo en cuenta que el núcleo presenta alta volatilidad. No obstante, el grado de dureza, rigidez y estanqueidad que adquieren finalmente las cápsulas a esta temperatura debería evitar el escape del contenido. Además, la temperatura mantenida durante la primera hora a 45 °C favorece la formación de una primera capa polimérica que disminuye la volatilización de la fragancias.

Teniendo en cuenta esto, se aplicaron estas condiciones específicas para el proceso de encapsulación de la fragancia APPLE. El resultado final fue la formación de microcápsulas con una corteza lisa y estable tras el secado (**Figura 3.16**).

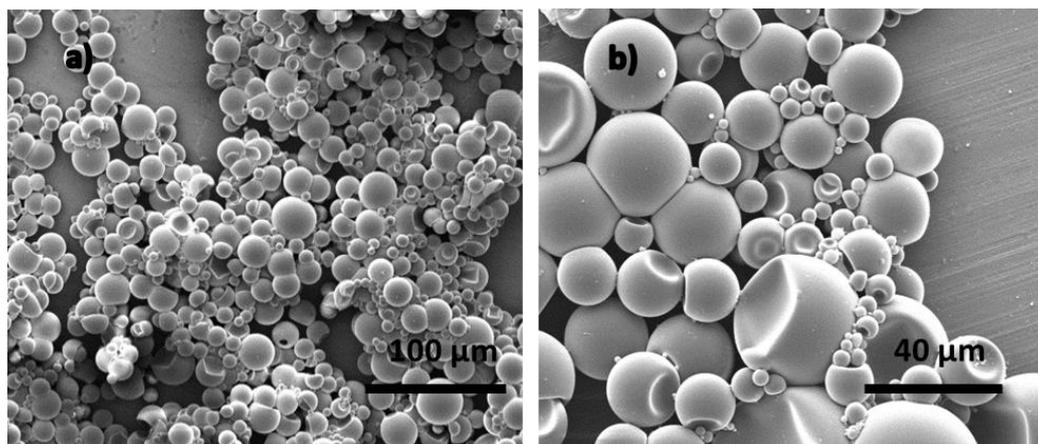


Figura 3.16. Imagen SEM de: a) cápsulas MF con la fragancia APPLE tras la variación de la temperatura; b) corteza lisa de las cápsulas obtenidas.

Las condiciones optimizadas para la encapsulación de esta fragancia se resumen en la **Tabla 3.5**.

| Condiciones | Valores |
|--|---|
| Cantidad prepolímero | 4.8 g (20 g solución 24%p/p de prepolímero) |
| Cantidad de fragancia APPLE | 30 g |
| Estabilizantes | SDBS y PVA |
| Concentración total de estabilizante | 1%p/p (0.9% p/pSDBS + 0.1% p/p PVA) |
| Proporción (en peso) fragancia:polímero | 1:6.25 |
| Proporción (en peso) fragancia:fase acuosa | 1:3 |
| Velocidad de emulsión (Ultra-Turrax) | 5000 rpm |
| Velocidad de agitación (magnética) | 750 rpm |
| Velocidad de acidificación (Acético 10%) | 1 mL/h |
| pH de polimerización | 5.5 |
| Temperatura | Gradiente de 30 hasta 85 °C |

Tabla 3.5. Condiciones optimizadas para la encapsulación de APPLE.

En este caso específico, la carga útil no se determinó, por la complejidad del núcleo y debido a que el objetivo inmediato era la encapsulación de la fragancia TROPICAL, que se muestra a continuación.

3.4. Encapsulación de fragancia compleja

Tras lograr con éxito la encapsulación de una fragancia simple, el siguiente paso consistió en encapsular la fragancia compleja Tropical Fruit P780765 (de ahora en adelante TROPICAL) con las condiciones optimizadas para la fragancia APPLE (**Tabla 3.5**).

Desafortunadamente, la encapsulación con estas condiciones no resultó ser efectiva para esta fragancia de mayor complejidad. Tras realizar algunos replicados se corroboró que las condiciones establecidas anteriormente no eran aplicables a este tipo de formulación. En este caso el recubrimiento de las gotas no se realizaba completamente, dando lugar a cápsulas rígidas pero incompletas y por lo tanto, no cumpliendo las características esperadas (**Figura 3.17**).

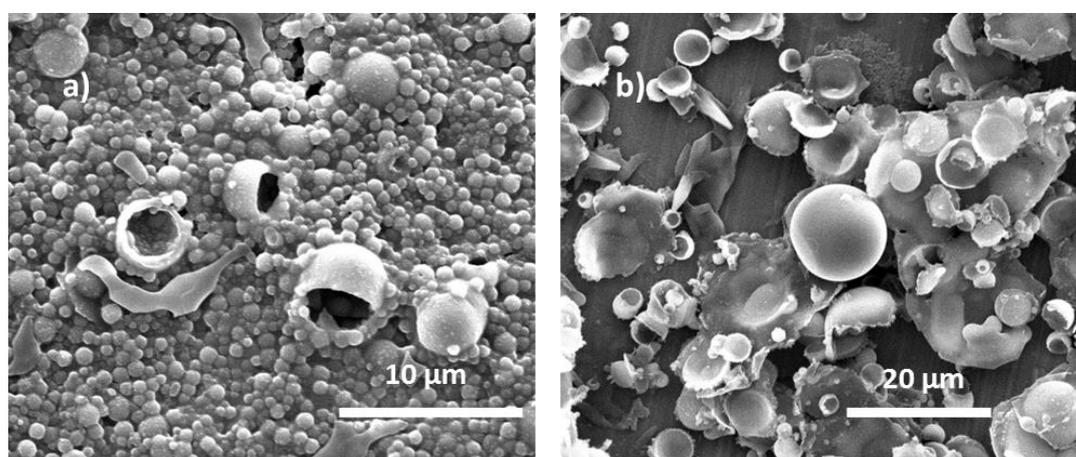


Figura 3.17. Imágenes SEM que muestran cápsulas incompletas de TROPICAL; a) Imagen de la generación de partículas de resina MF; b) fragmentos de cápsulas incompletas.

La formulación de fragancia se revisó para descartar que ningún componente hubiera afectado a la estabilidad de la emulsión por posibles procesos de difusión pero no se encontraron compuestos que afectaran negativamente. Esto suponía realizar una nueva optimización del proceso para conseguir la encapsulación de fragancias más complejas.

3.4.1. Optimización de síntesis con fragancias complejas mediante mezcla con aceites

Uno de los cambios efectuados fue añadir Miglyol a la mezcla de la fragancia. El aceite, además de ser perfectamente miscible con la mezcla, retiene los componentes de la fragancia durante la emulsificación, mejorando la estabilidad de la emulsión O/W. Esta modificación ya se había efectuado con éxito en la encapsulación de fragancias complejas con poliamida en MICROFRAG® y por ello se creyó oportuno adaptarla a esta metodología. La proporción usada de aceite para este caso fue del 50% en peso y el resultado fue la correcta formación de las cápsulas (**Figura 3.18**).

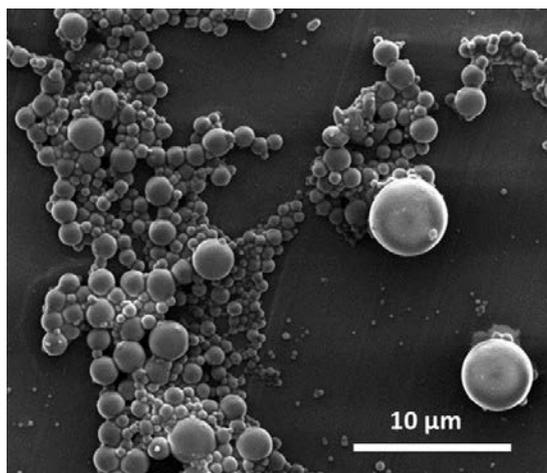


Figura 3.18. Imagen SEM de cápsulas MF con un núcleo 50%p/p TROPICAL y 50%p/p de Miglyol.

La alternativa de usar aceite en la formulación se barajó como una solución ante la posibilidad de no encontrar un resultado mejor a corto-medio plazo para la encapsulación de un núcleo formado completamente por fragancia. No obstante, la investigación no barajaba quedarse estancado en este producto y se buscaron otras alternativas.

3.4.2. Optimización de síntesis con fragancias complejas mediante el uso de polielectrolitos y/o estabilizantes

Para lograr el objetivo de sintetizar cápsulas con un núcleo constituido completamente por la fragancia TROPICAL, se usaron de una serie de estabilizantes candidatos para favorecer la encapsulación. Los seleccionados para este propósito se muestran en la **Tabla 3.6**. Como se explicó anteriormente, la función de estos polieléctrolitos es estabilizar la emulsión y la vez atraer el prepolímero hacia la interfase para contribuir a la polimerización alrededor de las gotas. Como se puede comprobar, algunos de estos compuestos tienen grupos funcionales que pueden aportar cargas negativas como son los grupos sulfonatos o carboxilatos. En el caso concreto del poly-SMA, tiene un anillo anhídrido que puede ser hidrolizado para dar lugar a carboxilatos.

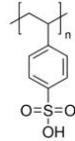
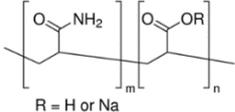
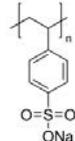
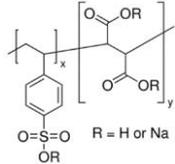
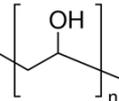
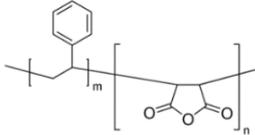
| Polielectrolito | Fórmula |
|--|--|
| <p>Poly(4-styrene sulfonic acid) (PolySSA)</p> |  |
| <p>Poly (acrylamide-co-acrylic acid) partial sodium salt (Poly-AcAcNa)</p> |  <p>R = H or Na</p> |
| <p>Poly(4-styrenesulfonate) partial sodium salt (Poly-SSAcNa)</p> |  |
| <p>Poly (4-styrenesulfonic acid-co-maleic acid) sodium salt (Poly-SSAcMAcNa)</p> |  <p>R = H or Na</p> |
| <p>Polyvinyl alcohol 20-98 (PVA)</p> |  |
| <p>Poly (styrene-co-maleic anhydride) (poly-SMA)</p> |  |

Tabla 3.6. Lista de polielectrolitos y estabilizantes usados para la encapsulación de la fragancia TROPICAL.

Hasta este momento se había hecho uso de tensioactivos de carácter aniónico (SDBS o SDS) que tienen la capacidad para atraer el prepolímero, pero tal vez por la complejidad del núcleo a encapsular, no fueron capaces de estabilizar completamente las gotas durante todo el proceso de polimerización. El resultado de esto explicaría la formación de las cápsulas incompletas o de material estructurado en forma de partículas y no de cápsulas.

Con el uso de polielectrolitos, al tener pesos moleculares más altos y al estar en su conjunto en la fase acuosa, se busca una mejor estabilización mediante una conformación distinta a la que ofrece un tensioactivo (**Figura 3.19**). Estos estabilizantes, además, pueden proporcionar un incremento en la viscosidad a las suspensiones para impedir su posible agregación durante la fase de polimerización.

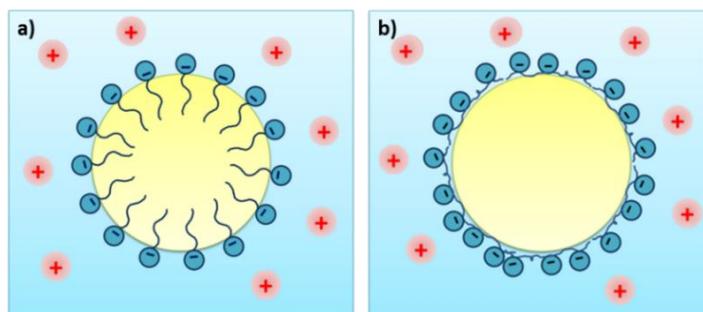


Figura 3.19. a) Representación gráfica de una emulsión o/w estabilizada con un tensioactivo aniónico; b) emulsión o/w estabilizada con un polielectrolito aniónico.

A excepción del PVA, dotado de grupos hidroxilo, el resto de estabilizantes proporcionan cargas negativas orientadas hacia la fase acuosa. Estas cargas negativas provocan la atracción de las especies oligoméricas de MF de carga positiva que acaban polimerizando lentamente en la interfase dando lugar a la formación de la corteza (**Figura 3.20**).

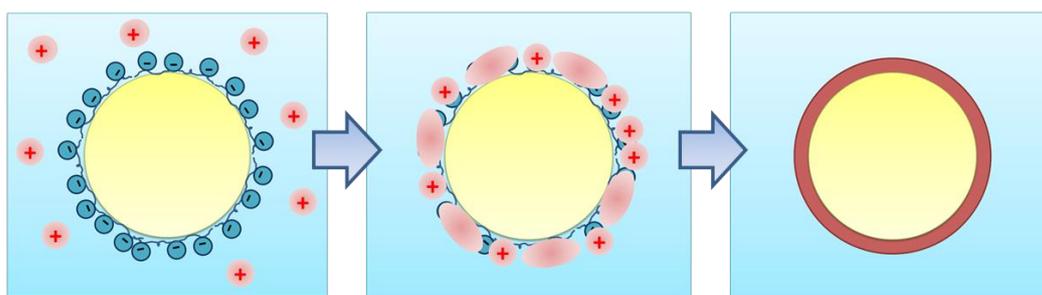


Figura 3.20. Representación gráfica de la formación de la corteza en el sistema de estabilización con polianiones.

Tras varios experimentos realizados usando este tipo de compuestos, únicamente se consiguieron cápsulas bien estructuradas con PVA y con poly-SMA. Algunos de los polielectrolitos generaron una viscosidad excesiva en el sistema incluso trabajando a concentraciones bajas, por lo que fueron descartados.

Las síntesis de cápsulas llevadas a cabo con PVA como estabilizante, reveló que la agitación fue el parámetro clave para un buen resultado. Con el PVA, la emulsión no es demasiado estable y menos cuando el prepolímero empieza a polimerizar en la interfase o/w. Para contrarrestar esto, es necesario durante todo el proceso aplicar una fuerte agitación mecánica para mantener la emulsión hasta la estabilización de las cápsulas por la formación de la primera capa de polímero. El proceso por lo tanto viene condicionado por las revoluciones (rpm) alcanzadas y por el tipo de mecanismo de agitación. En el mejor de los casos se obtuvieron cápsulas con una corteza rugosa bien formada pero con alta polidispersión de tamaños (**Figura 3.21**). Lamentablemente este procedimiento presenta poca

reproducibilidad que se acentúa cuando se producen cambios de escala o cambios en la agitación. Las cápsulas acaban variando en el tamaño, en el grado de agregación y en la morfología en algunos casos.

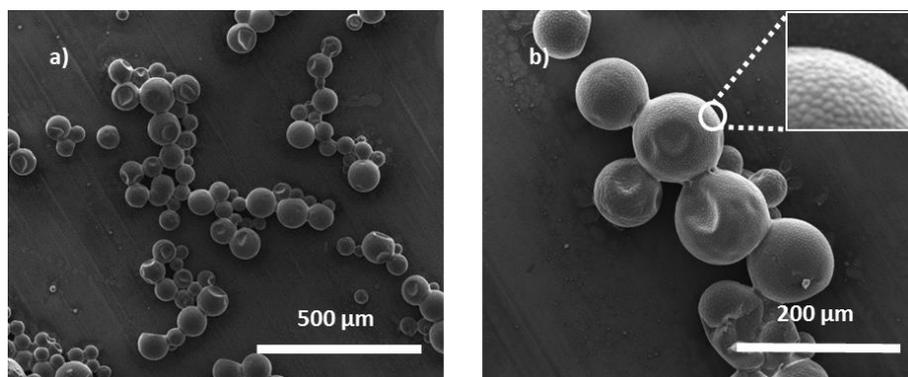


Figura 3.21. Imagen de SEM de: a) Cápsulas de fragancia TROPICAL 100% usando PVA como estabilizante; b) superficie rugosa de las cortezas las microcápsulas.

El último polielectrolito adquirido para la encapsulación fue el copolímero de estireno y ácido maleico anhidro (poly-SMA). Este copolímero se presenta como un sólido amarillento al que se le debe aplicar previamente un proceso de hidrólisis para así abrir el anillo de anhidro maleico y generar las cargas negativas como se ha explicado anteriormente. La estructura molecular del poly-SMA permite una buena estabilización de las emulsiones por la orientación de los anillos aromáticos hacia la fase orgánica y los grupos carboxilato hacia la fase acuosa (**Figura 3.22**).

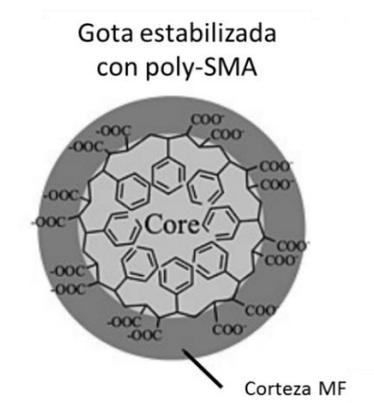


Figura 3.22. Representación gráfica de estabilización de las gotas con poly-SMA hidrolizado en la formación de la microcápsulas MF [19].

En un reactor encamisado dotado de sistema de calentamiento y de agitación se prepararon disoluciones stock de poly-SMA con la adición de NaOH como base y la aplicación de altas temperaturas durante varias horas (ver **Protocolo MF.2**).

La primera síntesis realizada con este polielectrolito reveló su alta reactividad con el prepolímero en comparación con otros polielectrolitos, generándose rápidamente precipitados del polímero MF en

los primeros compases de la reacción. Además, éste presentó buenas propiedades emulsionantes y estabilizantes, lográndose tamaños de gota reducidos ($\approx 20 \mu\text{m}$) y estables aplicando poca energía (5.000 rpm con Ultra-Turrax®T25) en periodos cortos de tiempo.

Debido a esta alta reactividad los primeros experimentos dieron lugar a cápsulas agregadas a pesar de que el recubrimiento de las gotas fuera completo (**Figura 3.23.a**). Mediante la ruptura mecánica de estos agregados se percibieron las notas representativas de la fragancia con una intensidad alta lo que hizo indicar que la fragancia se encontraba aparentemente bien recubierta. No obstante, como se definió en los requisitos, se buscaba obtener cápsulas desagregadas y con baja polidispersión

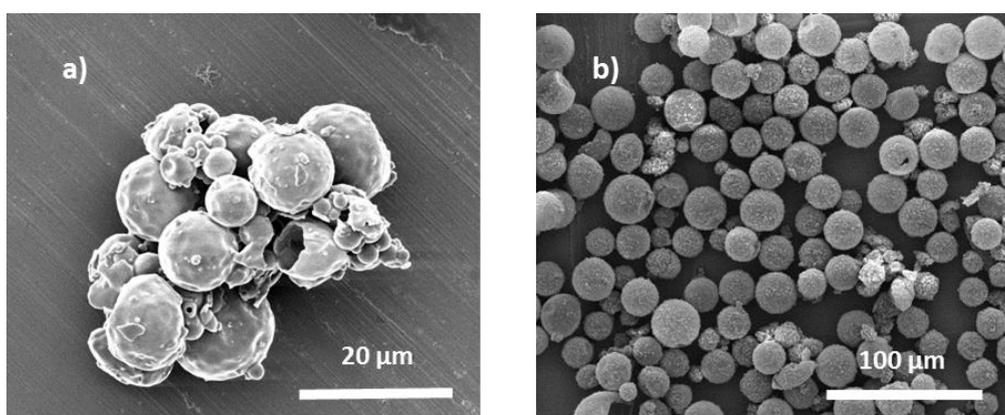


Figura 3.23. a) Imagen SEM mostrando agregación de cápsulas TROPICAL 100% producidas con SMA sin optimizar; b) imagen SEM de cápsulas TROPICAL 100% con SMA tras la optimización.

Debido a esta alta reactividad se tuvieron que reajustar algunos parámetros como la temperatura inicial, el pH y la velocidad de adición del prepolímero y ácido. El resultado de esta optimización fue la obtención de cápsulas con baja polidispersión, esféricas y desagregadas (**Figura 3.23.b**). Las condiciones óptimas establecidas para la síntesis de cápsulas de TROPICAL con la resina MF se muestran en la **Tabla 3.7** y la descripción del proceso en el **Protocolo MF.4**. El factor limitante en este caso fue la velocidad de acidificación del medio. Trabajando a una temperatura baja, el poly-SMA con el prepolímero no reacciona tan rápido, pero si el pH desciende demasiado deprisa la polimerización procede muy rápidamente y se generan agregados de manera irreversible. Esta síntesis también se validó para la encapsulación de Miglyol, cuyo procedimiento se describe en el **Protocolo MF.3**.

| Condiciones | Valor |
|---------------------------------------|---|
| Cantidad de prepolímero | 4.8 g (20 g solución 24%p/p de prepolímero) |
| Cantidad de fragancia TROPICAL | 30g |
| Cantidad fase acuosa | 70g |
| Cantidad de poly-SMA | 2.1 g (3% p/p en fase acuosa) |
| pH de polimerización | 5.5 |
| Temperatura | 30°C hasta 85°C (20 °C/h) |
| Velocidad acidificación (Acético 10%) | 2 mL/10 min |
| Emulsión (Ultra-Turrax®T25) | 5.000 rpm |
| Agitación (magnética) | 750 rpm |

Tabla 3.7. Condiciones óptimas establecidas para la encapsulación de fragancia TROPICAL con resina MF y poly-SMA como estabilizante.

Tras la obtención satisfactoria de las cápsulas de fragancia se llevó a cabo las correspondientes caracterizaciones.

➤ *Determinación de la distribución de tamaño por difracción laser*

La distribución de tamaños de las partículas sintetizadas se determinó para el crudo de reacción mediante la técnica de difracción por láser con Mastersizer®2000 (MZ). Este equipo permite la medición de suspensiones de partículas entre 100 nanómetros y varios milímetros por lo que se consideró el más adecuado para la medida de este tamaño de partículas. Una cantidad determinada de suspensión del crudo se analizó siguiendo el **Protocolo MZ.1** y el resultado fue la distribución de tamaño que se muestra en la **Figura 3.24**.

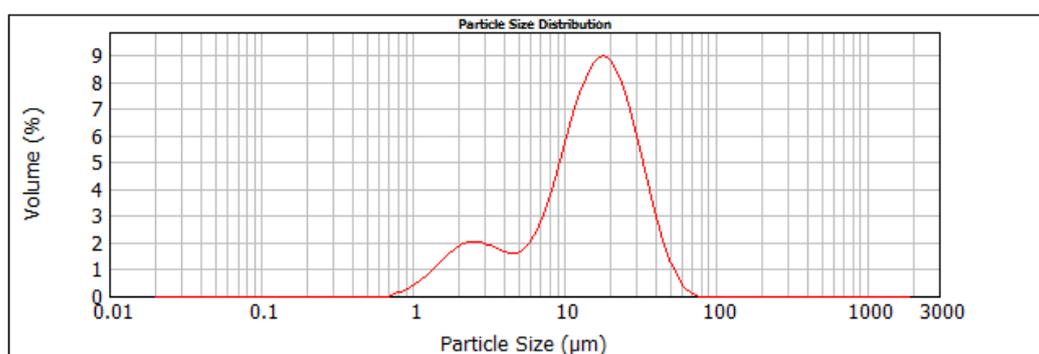


Figura 3.24. Gráfico mostrando la distribución de tamaño de las cápsulas con 100% núcleo de fragancia TROPICAL.

Como se puede apreciar en el gráfico resultante, las cápsulas presentaron dos grupos de tamaños diferenciados. El grupo de mayor tamaño, en el rango de 10-20 μm , corresponde a las cápsulas con estructura núcleo/corteza bien definidas. Por otro lado, la población del rango 1-3 μm corresponde a

micropartículas de resina MF que no forman parte de la corteza y son fruto de la polimerización en la fase acuosa y no en la interfase.

➤ *Cuantificación del núcleo mediante ^1H -RMN*

Siguiendo el procedimiento utilizado para las cápsulas con aceite, se liofilizó una fracción de la muestra para su análisis mediante la técnica de ^1H -RMN y se comparó con la fragancia original usando DMF como patrón interno. Mediante la comparación de los espectros de las cápsulas rotas y de la formulación inicial de fragancia, se pudo apreciar un alto grado de similitud entre ambos. Este resultado fue indicación que la mayoría de los compuestos fueron encapsulados y retenidos con éxito (**Figura 3.25**)

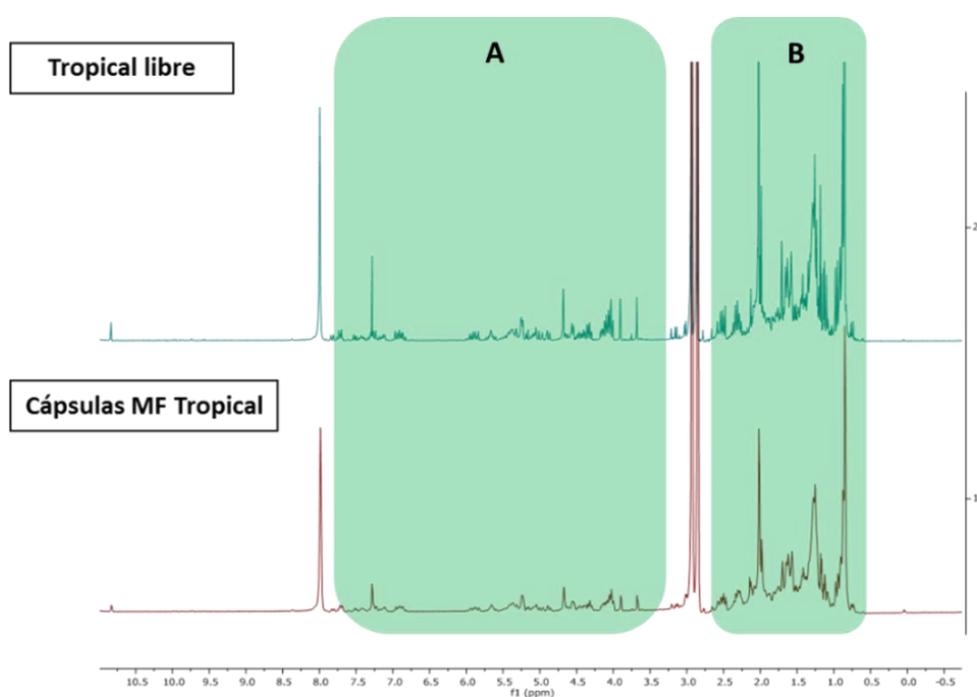


Figura 3.25. Espectro ^1H -RMN de cápsulas MF de la fragancia TROPICAL vs la fragancia TROPICAL sin encapsular. En verde se muestran las señales de la fragancia a comparar.

Por otro lado, a través del uso de la técnica de ^1H -RMN sólo se pudo realizar una estimación global de la carga y bastante semicuantitativa ya que el solapamiento de las señales de los múltiples componentes no permite determinar la carga para cada componente. Por ese motivo, se integraron algunas regiones completas del espectro y los valores se compararon con las integrales del espectro de fragancia libre (de cantidad fija) teniendo como referencia el patrón interno (**Tabla 3.8**).

| Muestra | Patrón añadido | Cantidad de muestra analizada | Rango de integrales de fragancia |
|--------------------------|----------------|-------------------------------|----------------------------------|
| Fragancia libre TROPICAL | 15 µl DMF | 30 µl fragancia | A=3.14 / B=14.77 |
| Cápsulas TROPICAL | 15 µl DMF | 30 mg cápsulas secas | A=2.61 / B= 10.03 |

Tabla 3.8. Resultados de los valores extraídos de los espectro de RMN.

La relación de las integrales situó la **carga útil** en un valor alrededor de **70-80%**, muy al límite del resultado deseado. Este valor fue algo menor que el obtenido con cápsulas de aceite, cercano al 93%, aunque hubo una explicación en la disminución de este valor. La suspensión de cápsulas obtenidas por la vía de poly-SMA, a pesar de haber sido optimizadas, presentaban una proporción importante de partículas de resina MF. Cuando se dejó reposar el crudo, la presencia de estas partículas se podía apreciar a simple vista en el fondo del crudo de reacción (**Figura 3.26**).

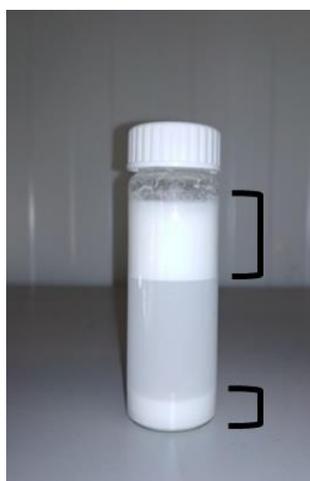


Figura 3.26. Fotografía mostrando las dos fases presentes en las suspensiones de cápsulas MF de TROPICAL. La superior corresponde a las cápsulas y la inferior a partículas sólidas de menor tamaño pero mayor densidad.

La muestra liofilizada utilizada para la determinación del contenido por ¹H-RMN fue representativa de todo el crudo por lo que en el polvo había presencia también de estas partículas cuyo contenido en fragancia es muy bajo o nulo. La presencia de estas partículas sin fragancia provocó una disminución de la carga útil global.

➤ *Determinación del contenido mediante cromatografía de gases (GC-MS)*

Para comprobar y cuantificar cada compuesto específico en el interior de las cápsulas, fue necesario el uso de la técnica de cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS).

CARINSA posee experiencia en el uso de GC-MS y dispone de una amplia lista de compuestos ya descritos y almacenados en una biblioteca propia mediante la cual se puede asignar de manera muy precisa las señales obtenidas de muestras complejas. Para el análisis mediante esta técnica se usaron

tanto cápsulas liofilizadas como suspensiones de las mismas. Para ambos casos se usó acetona en vez de cloroformo para la ruptura de las cápsulas y la extracción de la fragancia. La capacidad de extracción de la acetona era muy similar a la del cloroformo y además era más apto para la inyección en la columna de GC-MS. Los detalles de la caracterización con esta técnica se detallan en el **Protocolo GC.1**.

En la **Figura 3.27** se recoge en forma de gráfica la proporción de los compuestos en ambas muestras (liofilizado y suspensión) y de la fragancia sin encapsular. Es importante recalcar que los resultados están basados en la proporción y no en valores absolutos de cada compuesto. Los compuestos se encuentran ordenados según su tiempo de retención, siendo el acetato de etilo el más volátil y el que tiene el tiempo de retención menor.

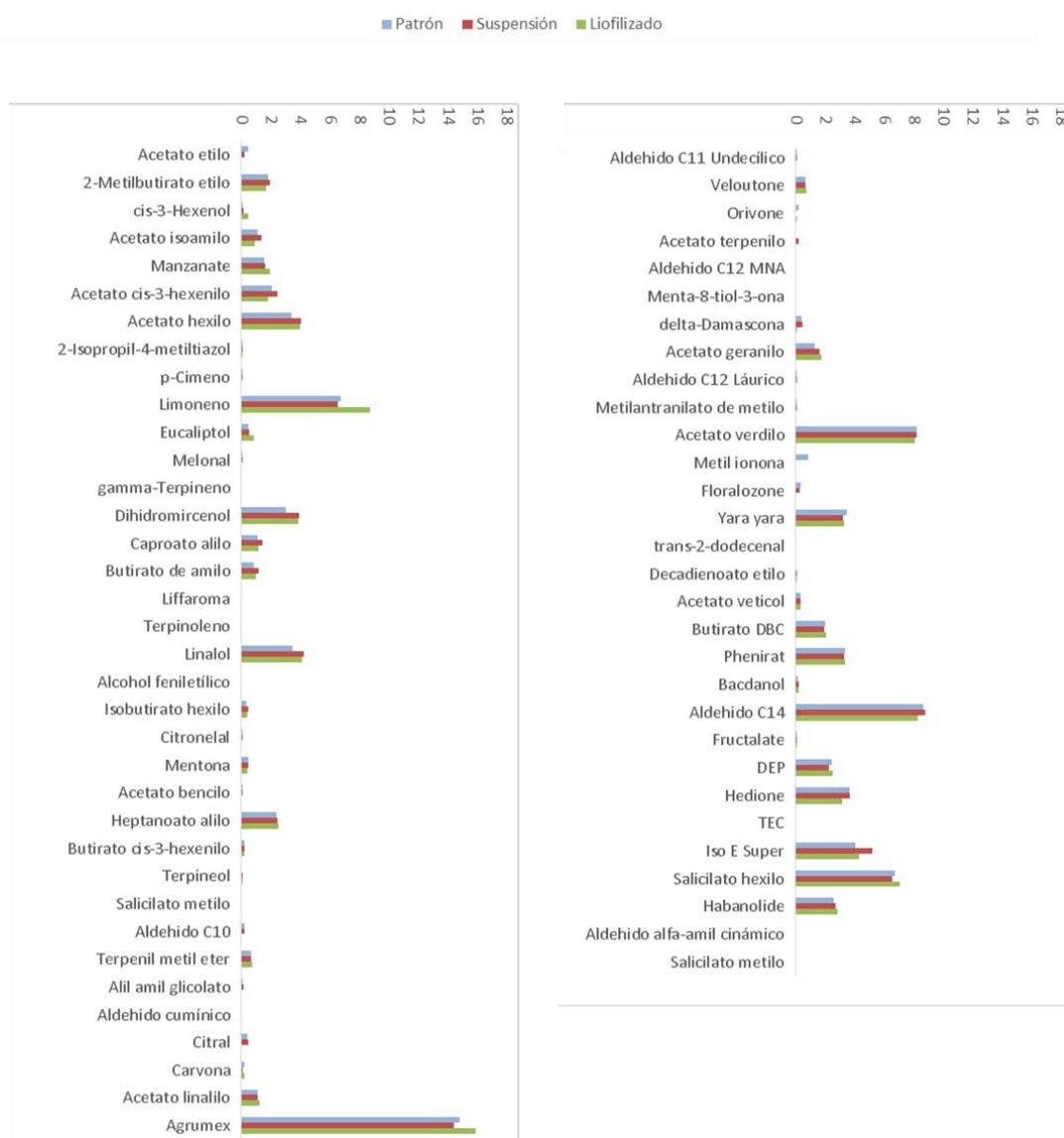


Figura 3.27. Resultados GC-MS de las cápsulas MF de fragancia TROPICAL (suspensión y liofilizado) en comparación con la formulación de la fragancia libre. Los compuestos se ordenan por tiempo de retención siendo el más corto el del acetato de etilo.

En líneas generales se evidencia la presencia de la mayoría de los compuestos esperados de la fragancia TROPICAL en las microcápsulas. Los compuestos más volátiles (tiempos de retención menores) aparecen en ambos tipos de microencapsulados, y en algunos casos la señal obtenida en las cápsulas es mayor que en la fragancia pura, lo que nos informa de que las cápsulas parecen ser lo suficientemente estancas como para retenerlos incluso tras la aplicación de temperatura en el proceso de síntesis y tras procesos como la liofilización.

3.5. Conclusiones y futuro trabajo

Tras los resultados obtenidos en la encapsulación de fragancias por polimerización *in-situ* se pueden extraer una serie de conclusiones que se describen a continuación:

- Se han desarrollado cápsulas poliméricas de melamina formaldehído (MF) mediante la técnica de polimerización *in-situ*, partiendo de la síntesis previa del prepolímero.
- Los nucleos encapsulados de manera satisfactoria han sido el Miglyol®812, la fragancia Apple Top FCAPP952505 y la fragancia objetivo Tropical Fruit P780765. También se han realizado en el transcurso de la investigación cápsulas con núcleos 50% en peso de Miglyol y fragancia.
- Se han realizado continuamente optimizaciones en los parámetros de reacción, siendo la temperatura, la agitación, los estabilizantes y la velocidad de acidificación los más relevantes para el éxito de la síntesis.
- El estabilizante que finalmente ofreció mejores resultados y fiabilidad fue el polielectrolito Poly-SMA, el cual fue hidrolizado previamente para la generación de grupos carboxilatos y así favorecer la deposición del prepolímero MF.
- El máximo valor de carga útil de fragancia TROPICAL obtenido se situó en el rango 70-80% en peso del total de la cápsula (para el Miglyol se alcanzó el 93%), lográndose así las características deseadas. El tamaño medio de las cápsulas obtenidas se situó en el rango 10-20 μm .
- Se han realizado las correspondientes caracterizaciones de las microcápsulas con técnicas de microscopía (SEM y OM) y técnicas analíticas (^1H -RMN, GC-MS y MZ), creándose de esta forma protocolos de trabajo para los productos obtenidos por las otras técnicas de encapsulación.

Para el futuro se buscará trabajar en los siguientes puntos:

- Optimización de la síntesis para obtener más resina MF estructurada en forma de cápsulas.
- Obtención de cápsulas de menor tamaño (<10 μm).

- Obtención de cápsulas con diferentes núcleos de fragancias complejas.
- Ajuste de las cantidades de reactivos de partida.
- Disminuir la toxicidad de los productos obtenidos mediante el uso de metanol o atrapadores de formaldehído.
- Realizar la síntesis con resinas comerciales y así acortar los tiempos para las síntesis.

3.6. Referencias

- [1] Milton, M. Synthesis of Melamin. US3386999A, June 4, 1968.
- [2] Wang, J. China melamine export prices surge 20% over three weeks, to extend gains. ICIS News. <https://www.icis.com/resources/news/2017/09/15/10142987/china-melamine-export-prices-surge-20-over-three-weeks-to-extend-gains/> (última visita 24 de enero de 2019).
- [3] Reuss, G.; Disteldorf, W.; Gamer, A. O.; Hilt, A. Formaldehide. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. June 15, 2000.
- [4] Global Chemical Price. Formaldehyde Weekly Report 15 July 2017. <http://www.globalchemicalprice.com/chemical-market-reports/formaldehyde-weekly-report-15-july-2017>. (Última visita 24 de enero de 2019).
- [5] Merchant Research & Consultind ltd. World Formaldehyde Production to Exceed 52 Mln Tonnes in 2017. <https://mcgroup.co.uk/news/20140627/formaldehyde-production-exceed-52-mln-tonnes.html>. (Última visita 24 Enero 2019).
- [6] European Chemicals Agency. Formaldehyde Infocard. <https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.000.002>. (Última visita 24 enero de 2019).
- [7] US Environmental Protection Agency. Formaldehyde. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/formaldehyde.pdf> (Última visita 24 Enero 2019).
- [8] Šumiga, B.; Knez, E.; Vrtačnik, M.; Savec, V. F.; Starešinič, M.; Boh, B. Production of Melamine-Formaldehyde PCM Microcapsules with Ammonia Scavenger Used for Residual Formaldehyde Reduction. *Acta Chim. Slov.* **2011**, *58* (1), 14–25.
- [9] Costa, N. A.; Pereira, J.; Ferra, J.; Cruz, P.; Martins, J.; Magalhães, F. D.; Mendes, A.; Carvalho, L. H. Scavengers for Achieving Zero Formaldehyde Emission of Wood-Based Panels. *Wood Sci. Technol.* **2013**, *47* (6), 1261–1272.

- [10] Boran, S.; Usta, M.; Ondaral, S.; Gümüşkaya, E. The Efficiency of Tannin as a Formaldehyde Scavenger Chemical in Medium Density Fiberboard. *Compos. Part B- Eng.* **2012**, *43*, 2487–2491.
- [11] Duan, H.; Qiu, T.; Guo, L.; Ye, J.; Li, X. The Microcapsule-Type Formaldehyde Scavenger: The Preparation and the Application in Urea-Formaldehyde Adhesives. *J. Hazard. Mater.* **2015**, *293*, 46–53.
- [12] Firmenich, S.A. Stable Formaldehyde-Free Microcapsules. US 2014/0342963 B2, June 5, 2016.
- [13] Zhang, H.; Wang, X. Fabrication and Performances of Microencapsulated Phase Change Materials Based on N-Octadecane Core and Resorcinol-Modified Melamine–formaldehyde Shell. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2009**, *332* (2), 129–138.
- [14] Gao, G. B.; Qian, C. X.; Gao, M. J. Preparation and Characterization of Hexadecane Microcapsule with Polyurea–melamine Formaldehyde Resin Shell Materials. *Chinese Chem. Lett.* **2010**, *21* (5), 533–537.
- [15] Bône, S.; Vautrin, C.; Barbesant, V.; Truchon, S.; Harrison, I.; Geffroy, C. Microencapsulated Fragrances in Melamine Formaldehyde Resins. *CHIMIA International Journal for Chemistry*. pp 177–181.
- [16] Su, J.-F.; Wang, S.-B.; Zhang, Y.-Y.; Huang, Z. Physicochemical Properties and Mechanical Characters of Methanol-Modified Melamine-Formaldehyde (MMF) Shell microPCMs Containing Paraffin. *Colloid Polym. Sci.* **2011**, *289* (2), 111–119.
- [17] Wang, H.; Hu, S.; Cai, S.; Yu, F. Preparation and Properties of Bisphenol A Epoxy Resin Microcapsules Coated with Melamine–formaldehyde Resin. *Polym. Bull.* **2014**, *71* (9), 2407–2419.
- [18] Magdalena, S. M.; Ángeles, P. M.; Francisca, A.; César, O. Scent Properties by Natural Fragrance Microencapsulation for Footwear Applications. *Polym. Int.* **2015**, *64* (10), 1458–1464.
- [19] Dezhong, Y.; Li, M.; Wangchang, G.; Baoliang, Z.; Qiuyu, Z. Microencapsulation of N-hexadecanol by in Situ Polymerization of Melamine–formaldehyde Resin in Emulsion Stabilized by Styrene–maleic Anhydride Copolymer. *Int. J. Energy Res.* **2014**, *39* (5), 661–667.

Capítulo 4.

Encapsulación por Polimerización Interfacial

4.1. Introducción

Este capítulo está dedicado a la optimización y caracterización de cápsulas de poliamida obtenidas mediante la técnica polimerización interfacial. En esta primera parte se presentan los antecedentes, las reacciones implicadas en la generación del polímero y su adaptación a un proceso de encapsulación y los objetivos específicos a conseguir.

4.1.1. Estado del arte

Los experimentos mostrados en este capítulo y muchas de las modificaciones realizadas en la síntesis de cápsulas de poliamida con fragancias son la continuación del trabajo desarrollado durante el proyecto MICROFRAG: “*Microencapsulación Funcionalizada de Fragancias para Formulación de Suavizantes*” (Retos Colaboración 2012-2014) realizado entre CARINSA y NANOSFUN. Los objetivos específicos de ese proyecto fueron:

- Síntesis de microcápsulas poliméricas de fragancias libres de formaldehído
- Funcionalización de la corteza de las microcápsulas mediante polielectrolitos o polímeros para mejorar su adhesión sobre tejido

Además, se propusieron una serie de requisitos a cumplir en las síntesis desarrolladas:

- Microcápsulas estables tras la síntesis y tras su introducción en suavizantes
- Recubrimiento que no comprometiera la estabilidad de las cápsulas
- Buena dispersabilidad/ homogeneidad de tamaños
- Liberación de la fragancia encapsulada mediante el roce
- Escalabilidad del proceso de síntesis

La investigación consistió en la adaptación y optimización del proceso de síntesis de cápsulas de poliamida, ya desarrolladas inicialmente para la encapsulación de núcleos hidrofóbicos como tolueno o hexano, para adaptarlo a la encapsulación de fragancias de CARINSA de diferente complejidad. El trabajo realizado por el Dr. Claudio Roscini y la técnica de I+D Beatriz García, finalizó con el desarrollo de un proceso de encapsulación con alta reproducibilidad y alta eficiencia de encapsulación.

Posteriormente estas cápsulas se lograron recubrir con grupos funcionales para mejorar la fijación en tejidos y su dispersabilidad en medios acuosos. Por último se establecieron las primeras condiciones para realizar procesos de escalado (hasta 5L). El resultado de esta investigación supuso la obtención de un sistema de encapsulación de fragancias libre de compuestos nocivos como el formaldehído, de alta eficiencia energética (tiempos de reacción cortos y síntesis a temperatura ambiente) y alta carga

útil de fragancia (80-90%). Estas características hicieron de estas cápsulas una alternativa muy atractiva ante los estándares del mercado.

No obstante, las deficiencias observadas en este tipo de cápsulas, las cuales se buscaron solucionar en el actual proyecto, son una insuficiente impermeabilidad y la dificultad para reducir el tamaño. Esto se explica en más detalle en el **Apartado 4.1.4**.

4.1.2. Reaccion de policondensación

Desde el punto de vista químico, las cápsulas de poliamida se sintetizan a partir de una reacción de policondensación entre un policloruro de ácido y una poliamina. Este tipo de reacción presenta una ventaja respecto a otras reacciones de policondensación dado que gracias la elevada reactividad de sus monómeros de partida, la polimerización se puede realizar a temperatura ambiente. En la **Tabla 4.1** se puede apreciar como la reacción de formación de poliamida es la que presenta las mayores velocidades de reacción a temperatura ambiente frente a las reacciones de condensación para la obtención de poliureas, poliuretanos o poliésteres.

| Reacción | Tipo de polímero | Constante cinética de reacción a temperatura ambiente ($\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) | Temperatura usual de reacción |
|------------------------------|------------------|--|-------------------------------|
| Diamina + cloruro de diácido | Poliamida | 10^4 - 10^5 | 20-25°C |
| Diol + diisocianato | Poliuretano | 10^3 - 10^4 | 25°C-150°C |
| Diamina + diisocianato | Poliurea | 10^2 - 10^4 | 10°C-150°C |
| Diol + cloruro de diácido | Poliéster | 10^{-2} | 20-25 °C |

Tabla 4.1. Tabla de constantes cinéticas de las diferentes reacciones de policondensación y temperaturas a las que se llevan a cabo [1].

La investigación alrededor del uso de la poliamida para la microencapsulación empezó en la década de los 60 y 70, cuando aparecen las primeras publicaciones y patentes [2-4]. Esta información deja de manifiesto que el uso de este material en polimerización interfacial es conocido desde hace años, aunque no ha tenido el impulso ni la repercusión como otros materiales y técnicas.

Las técnica de polimerización interfacial permite la encapsulación de núcleos líquidos hidrofóbicos (aceites, fragancias, etc.) y para ello existen varios tipos de monómeros utilizados como pueden ser el cloruro de trimesoilo (TM) [5], cloruro de sebacoilo (SC) etilendiamina (EDA), hexametilendiamina

(HMDA) u otras aminas ramificadas. En el caso del presente estudio, los monómeros usados para la mayoría de reacciones fueron la dietilentriamina (DETA) y cloruro de tereftaloilo (TR).

La DETA posee dos aminas primarias en los extremos y una amina secundaria situada en el centro de la molécula. Ambas aminas terminales son altamente reactivas y reaccionan con facilidad con grupos electrófilos. La amina central también es nucleófila aunque su reactividad es inferior a la de las aminas terminales por su impedimento estérico. El cloruro de tereftaloilo (TR) es el dicloruro del ácido tereftálico, el cual es usado masivamente en la producción del plástico polietilentereftalato (PET). Los grupos cloruros de ácido, de gran carácter electrófilo, se sitúan en una posición *para* en el anillo aromático, haciéndolos altamente reactivos. Además esta posición evita impedimento estérico en el caso de un posible ataque de un nucleófilo de gran volumen.

El hecho de que estos monómeros contengan dos o más grupos reactivos en sus terminaciones les permite formar cadenas poliméricas de tipo poliamida como se muestra en la **Figura 4.1**. El producto de esta reacción es una poliamida direccionada en 2 dimensiones por la capacidad de ramificación gracias a la amina secundaria de la DETA.

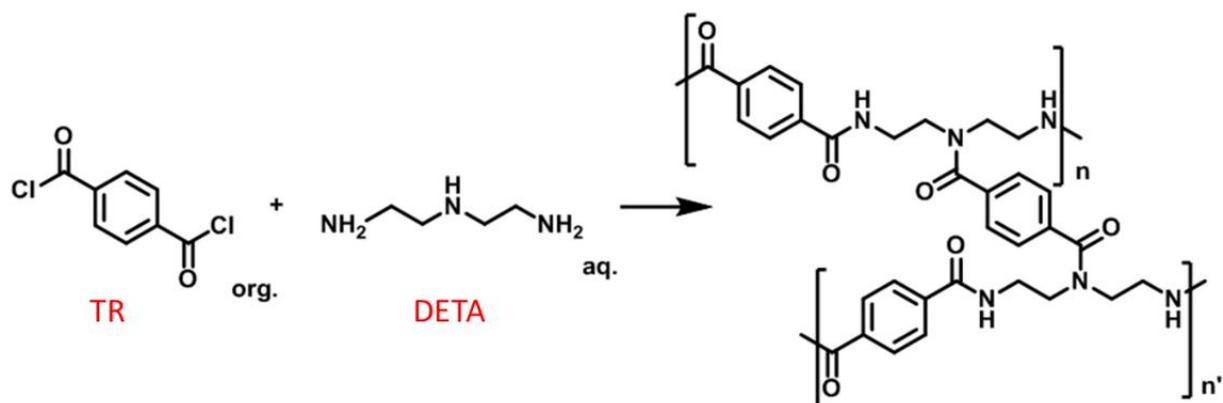


Figura 4.1. Esquema de la reacción de policondensación entre cloruro de tereftaloilo (TR) y la dietilentriamina (DETA) dando como producto un polímero de tipo poliamida, en concreto poli (dietilentriamina tereftalimida).

4.1.3. Encapsulación mediante la polimerización interfacial

En la encapsulación de sustancias hidrófobas, las reacciones de policondensación son de las más utilizadas por los siguientes motivos:

- La reacción genera polímeros altamente entrecruzados que pueden garantizar cortezas estancas y con una buena resistencia mecánica
- Se obtiene a partir de monómeros de alta disponibilidad comercial a precios relativamente bajos
- La alta variedad de monómeros permite modificar/optimizar las propiedades físico-químicas de las cortezas
- Son procesos fácilmente escalables

Para la encapsulación de sustancias hidrófobas se requiere que inicialmente se disuelva un monómero en la fase hidrófoba (fase dispersa) mientras que el otro monómero reactivo se disuelva en la fase acuosa (fase discontinua). Por ejemplo, los monómeros hidrofóbicos de tipo cloruro o isocianato se disuelven en la fase hidrófoba mientras que las aminas y los alcoholes en la fase acuosa.

Para la generación de cápsulas de poliamida, se preparan las correspondientes soluciones de monómeros por separado y posteriormente se genera una emulsión aceite en agua (O/W) en ausencia de la amina. Cuando la emulsión es estable se añade la solución del monómero hidrófilo, en este caso la amina, y enseguida se forma una capa polimérica de poliamida en la interfase. Las moléculas de amina siguen difundiendo a través de la capa reaccionando con el cloruro hasta que este último se agote o la corteza se vuelva tan gruesa que no permita más difusión [6].

En la **Figura 4.2** se muestra un esquema resumiendo las principales etapas para la encapsulación de núcleos hidrófobos mediante polimerización interfacial con poliaminas y policloruros.

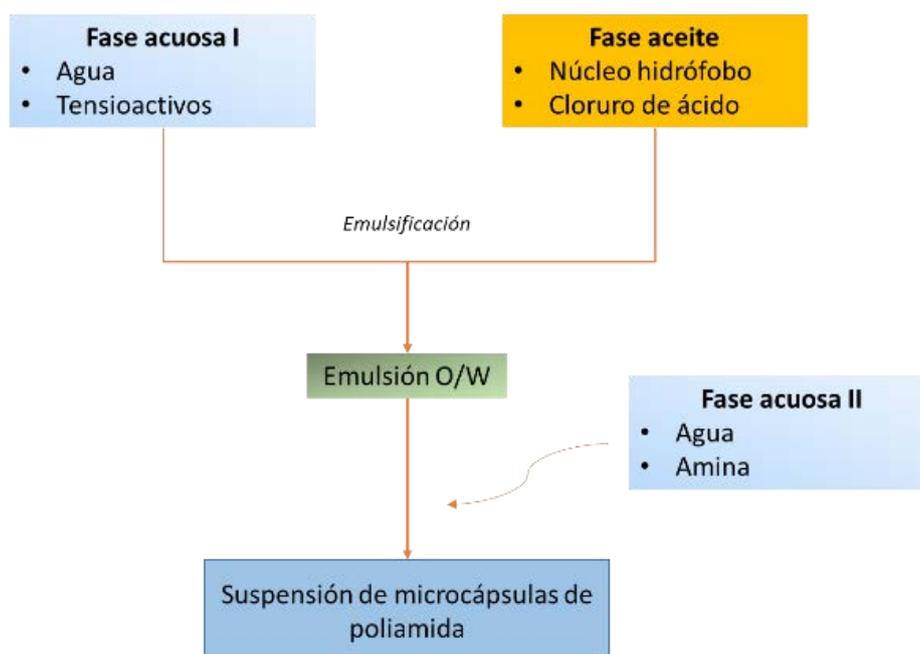


Figura 4.2. Esquema general del procedimiento de encapsulación con poliamida.

Trabajar a bajas temperaturas permite disminuir costes energéticos y permite encapsular compuestos volátiles disminuyendo pérdidas por evaporación. No obstante, este tipo de procedimiento presenta algunos inconvenientes a tener en cuenta. La alta reactividad del cloruro implica posibles reacciones con otro tipo de nucleófilos reduciendo la cantidad de monómero disponible para la polimerización y aumentando el riesgo de degradación del material activo. En la **Figura 4.3** se muestran los grupos con los que el cloruro de ácido podría reaccionar, dando lugar a otros compuestos con funcionalidades distintas a la amida.

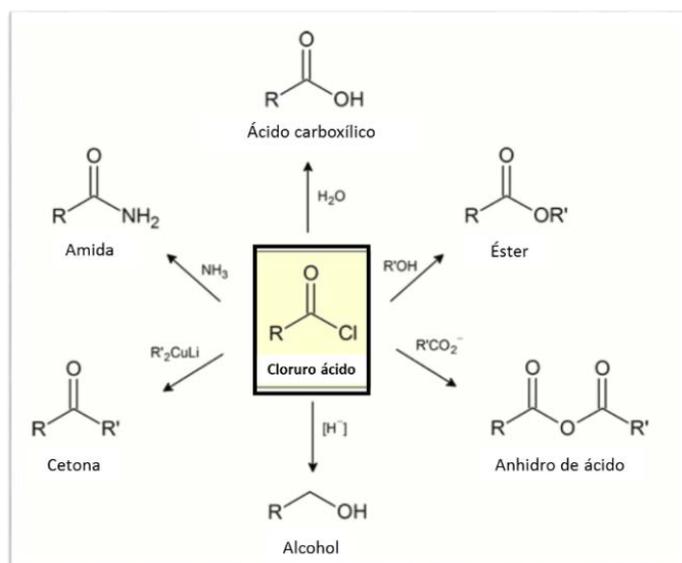


Figura 4.3. Ejemplos de reacciones del cloruro de ácido y los productos que obtenidos [7].

Las fragancias son formulaciones complejas de numerosos compuestos los cuales pueden poseer grupos nucleófilos en sus correspondientes moléculas. Los grupos más comunes son aminas, alcoholes o tioles. Todos estos componentes se encontrarán en el núcleo hidrofóbico junto con el dicloruro por lo que existe una alta probabilidad de reacción. Además, la reacción de un compuesto de la formulación con el cloruro puede dar lugar a varios productos que pueden alterar el olor, el color, o las propiedades físico-químicas de las fragancias. En la **Figura 4.4** se muestran algunos compuestos usados en fragancias con grupos nucleófilos susceptibles de reaccionar con el cloruro.

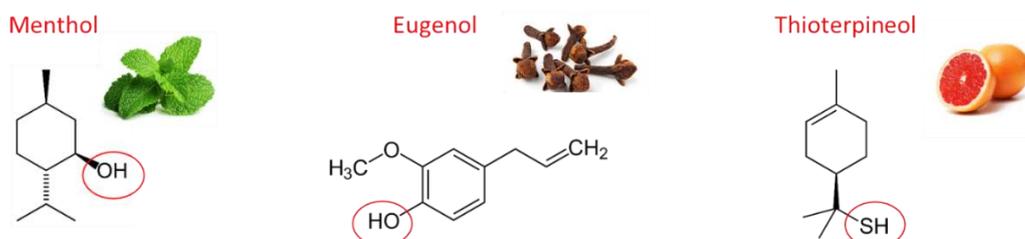


Figura 4.4. Ejemplos de componentes de las fragancias con grupos nucleófilos que pueden reaccionar con el cloruro de tereftatoilo.

Por este motivo es recomendable el desarrollo de formulaciones de fragancias con ausencia o con la mínima proporción de productos susceptibles de interferir en la reacción [8]. Esto también incluye algunos disolventes usados en formulaciones como puede ser propilenglicol, que además de reaccionar con el cloruro, puede afectar a la correcta emulsión de la fragancia por su alta hidrofiliidad.

Durante la sustitución nucleófila entre el cloruro y la amina se genera ácido clorhídrico (HCl) y debido a la presencia de agua en la mezcla de reacción, se genera también ácido tereftálico por el proceso de hidrólisis del TR. A pesar de que el cloruro se encuentra disuelto en la fase orgánica, en el proceso de emulsión (fragancia en agua) la energía aplicada puede favorecer a este proceso de hidrólisis ya que se generan un mayor número de gotas de menor tamaño incrementando el contacto entre el cloruro y el agua. Este proceso se puede contrarrestar de distintas maneras. Una de ellas es la de intentar reducir el tiempo de emulsión ya sea aplicando más energía o añadiendo estabilizantes/tensioactivos que ayuden a conseguir el tamaño de gota deseado rápidamente. La otra opción sería la de utilizar un cloruro de ácido que presente una hidrólisis lenta. Esta característica viene dada por dos factores: su coeficiente de partición y su estructura molecular.

Por otro lado, la generación de HCl también provoca un descenso del pH del medio de reacción que supone la protonación de las aminas y una disminución por la tanto de monómero apto para la encapsulación. Para contrarrestar esto se añade un exceso de amina que impida el descenso del pH y que a la vez aporte suficiente material para el recubrimiento.

4.1.4. Objetivos específicos en microcápsulas de poliamida

Tomando como punto de partida los resultados positivos del trabajo previo, los objetivos van encaminados a una mejora de las microcápsulas de poliamida en dos aspectos específicos. Además de cumplir los requerimientos definidos para las microcápsulas desarrolladas, se quiere enfatizar en dos mejoras específicas:

- **Disminución de tamaño**

Las cápsulas obtenidas hasta el momento de empezar esta tesis doctoral cubrían un rango de tamaño entre 20 y 50 μm . Los estudios de fijación en tejidos mostraron que las cápsulas de menor tamaño (2-5 μm) eran las más retenidas por lo que en este trabajo se planteó como un reto el poder reducir el tamaño de las cápsulas hasta un orden de magnitud para facilitar esta inclusión en tejidos. Las condiciones establecidas en el proyecto MICROFRAG no fueron aptas para lograr tamaños más pequeños por lo que esta etapa debía ser optimizada.

- **Mejora de la estanqueidad**

La permeabilidad presente en las cápsulas de poliamida debe ser reducida para así retener con mayor eficacia los compuestos volátiles en su interior y por lo tanto obtener una liberación más efectiva tras su ruptura. Variaciones en el pH o de cargas en las matrices donde se pueden incorporar estas microcápsulas, pueden alterar la permeabilidad de la corteza por lo que se busca realizar modificaciones para mejorar este aspecto.

4.2. Encapsulación de un aceite monocomponente

Siguiendo la metodología establecida para las cápsulas de melamina-formaldehído, antes de realizar la encapsulación de fragancias se encapsularon aceites mediante la técnica de polimerización interfacial. Existen varios ejemplos en la literatura donde se encapsulan materiales de esta naturaleza con funcionalidades específicas [9] lo que confirma la idoneidad de la técnica para estos núcleos.

4.2.1. Síntesis

En este caso, como punto de partida, se creyó conveniente replicar las condiciones establecidas en el proyecto MICROFRAG, usando también Miglyol®812 (Miglyol) como aceite modelo. Las condiciones experimentales como punto de partida vienen especificadas en el **Protocolo PA.1** y a continuación en la **Tabla 4.2**.

| Factor | Valores escala laboratorio (50 g) |
|-------------------------|--------------------------------------|
| Cantidad fase acuosa I | 30 g (Tween®80 1%p/p) |
| Cantidad fase aceite | 9.5 g Miglyol®812 + 0.5 g TR (5%p/p) |
| Cantidad fase acuosa II | 10 g (NaOH 0.19 M + DETA 5.3%p/p) |
| Emulsificación | 5.000 rpm (Ultra-Turrax®T25) |
| Tiempo de emulsión | 15 min |

Tabla 4.2. Condiciones establecidas para la encapsulación de cápsulas de Miglyol por polimerización interfacial con poliamida.

Como se puede comprobar, la relación aceite/agua establecida fue de 1:3 en el proceso de emulsión y 1:4 tras acabar la reacción, por lo que la concentración de aceite encapsulado es alrededor de el 20% en el crudo de la síntesis. La cantidad de monómero hidrófilo (DETA) se optimizó hasta la mínima cantidad posible para formar la corteza, aunque en ligero exceso respecto al cloruro. Además, la DETA se solubiliza en una solución de NaOH (pH>12) para mantener las aminas desprotonadas y promover una máxima reactividad de ésta. El resultado final de la reacción se muestra a nivel macroscópico

como una suspensión de aspecto lechoso y poco viscosa mientras que a nivel microscópico las partículas presentan unos tamaños comprendidos entre 25 y 50 μm .

4.2.2. Lavados

Debido al exceso de amina utilizado en la síntesis, se creyó conveniente desarrollar un procedimiento para arrastrar todo ese exceso de monómero sin reaccionar que a su vez eleva demasiado el pH de la suspensión ($\text{pH}\approx 8-9$). El método más eficiente para eliminar esta amina y neutralizar el pH fue mediante decantación, no obstante, este proceso puede llegar a ser muy lento cuando la densidad de las cápsulas es cercana a la del agua ($d=1 \text{ g/mL}$), alargándose hasta varias horas en algunos casos, considerando que se puede necesitar más de un lavado.

Para acelerar este proceso se propuso el uso de sales que modificaran tanto la densidad del agua como la fuerza iónica. Con una solución concentrada de sales, las cargas de los electrolitos contrarrestan las cargas superficiales propias de las cápsulas (ligeramente positivas) para inducir un proceso de floculación de estas, acelerando la flotabilidad o deposición (**Figura 4.5**). La sal seleccionada en este caso fue el sulfato sódico anhidro ($\text{Na}_2\text{SO}_4_{\text{anh}}$) por la gran densidad de carga que aporta (doble carga de los aniones). En el caso de las cápsulas sintetizadas con Miglyol ($d=0.912 \text{ g/mL}$), el hecho de añadir una solución altamente saturada en esta sal provoca que cápsulas floculen y floten con mucha más rapidez (pocos segundos) que si no se añadiera.

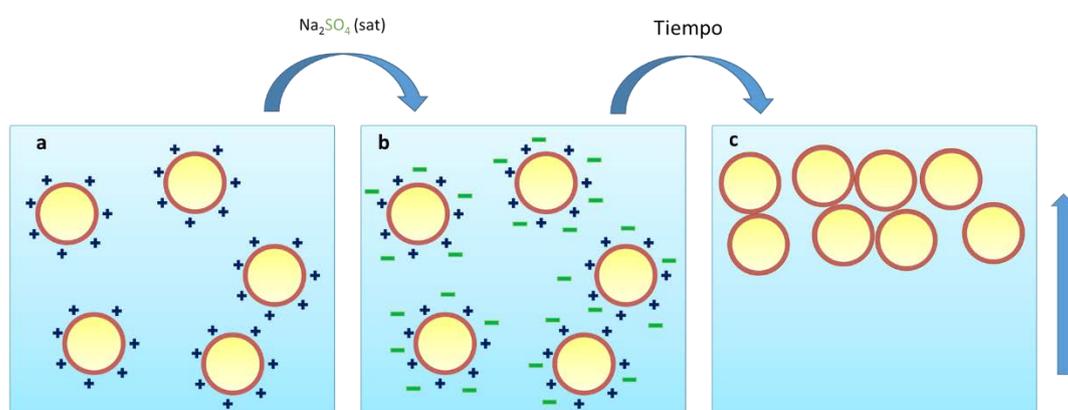


Figura 4.5. Tratamiento de las cápsulas con solución saturada de sal para promover la floculación. a) Suspensión de cápsulas ligeramente cargadas positivamente, b) adición de una solución Na_2SO_4 anhidro saturada; c) neutralización de las cargas, floculación y flotación.

Esta floculación, no obstante, es contraproducente para periodos largos de tiempo ya que puede provocar la ruptura de las cápsulas por la fuerte agregación generada y dejaría cantidades significativas de sales en la suspensión. Para solucionar esto se procedió a eliminar el exceso de sales

de la suspensión mediante una dilución de la suspensión. Las mejores condiciones para este propósito fue el uso de las siguientes disoluciones en el orden presentado a continuación:

1. Solución 1M de Na_2SO_4 anhidro (floculación rápida, flotación rápida)
2. Solución 0.5M de Na_2SO_4 anhidro (floculación intermedia)
3. Agua destilada (poca floculación, flotación lenta)

La aplicación de estas tres disoluciones resultó suficiente para neutralizar el pH hasta dejarlo neutro y eliminar la amina y la sal de una manera controlada. Este lavado además ayuda a eliminar una parte importante del tensioactivo utilizado para la generación de la emulsión (Tween[®]80 en este caso).

4.2.3. Caracterización de cápsulas con aceite

➤ *Caracterización morfológica*

La microscopía óptica fue la principal técnica de caracterización morfológica utilizada para las síntesis de cápsulas de poliamida. Al finalizar las síntesis, las muestras se tomaron directamente del crudo (sin realizar lavados) y se diluyeron para distinguirlas mejor. El aspecto típico de cápsulas de poliamida con aceite se muestra en la **Figura 4.6**.

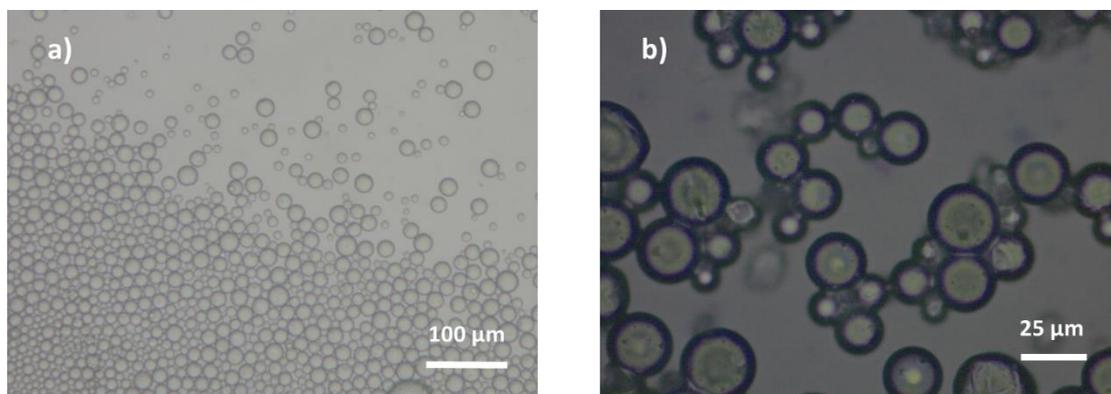


Figura 4.6. a) Imagen de microscopio óptico de la suspensión de cápsulas PA de Miglyol; b) imagen de microscopio óptico de la suspensión tras el secado al aire.

El aspecto de este tipo de cápsulas a través del microscopio se muestra parecido al obtenido con resina MF, pero si se observan las cápsulas a mayores magnitudes, se aprecia una corteza aparentemente más fina (**Figura 4.6.a**).

Para verificar la correcta formación de la corteza y su impermeabilidad se dejaron secar las muestras. En suspensión, la salida de la fase aceite de la cápsula puede verse inhibida por la hidrofobicidad del núcleo, en cambio, al secar las cápsulas se observaría la salida del aceite si la corteza no fuera del todo

impermeable. En la **Figura 4.6.b** se muestra el aspecto de una suspensión de cápsulas con Miglyol secadas al aire, las cuales mantienen su forma esférica y retienen el aceite en su interior.

Las cápsulas desarrolladas también se pudieron apreciar con detalle a través de microscopía electrónica (SEM). En general, el aspecto obtenido fue el de cápsulas con una corteza lisa y con forma esférica (**Figura 4.6.c**). Otra de las características que se aprecian es un ligero elongamiento de las cápsulas al estar en contacto las unas con las otras, sobre todo las de mayores dimensiones (**Figura 4.7.a**). Este efecto se atribuye a la flexibilidad de las cortezas al secarse. En el caso de las cápsulas más pequeñas este efecto se minimiza (**Figura 4.7.b**) y la hipótesis es que existe una mayor rigidez de la corteza que impide este estiramiento.

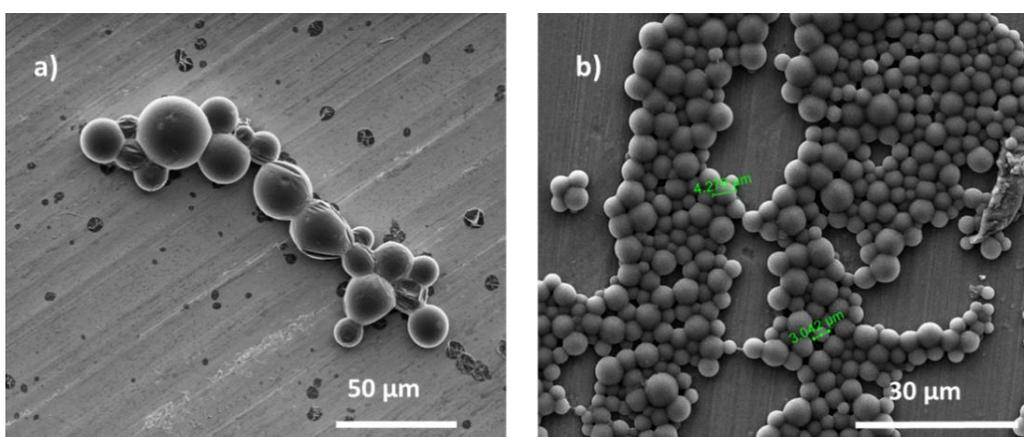


Figura 4.7. a) Imagen SEM donde se aprecia el estiramiento de las cortezas de cápsulas de poliamida de Miglyol de mayor tamaño (>25 μm); b) imagen SEM donde no se aprecia el fenómeno de estiramiento en las cortezas de las cápsulas de menor tamaño ($\approx 5 \mu\text{m}$).

➤ *Determinación de la distribución de tamaño por difracción laser*

Para el estudio de distribución de tamaño también se utilizó la técnica de difracción laser con Mastersizer®2000. En la **Figura 4.8** se muestra la distribución de las cápsulas de poliamida sintetizadas con las condiciones especificadas para la encapsulación de Miglyol.

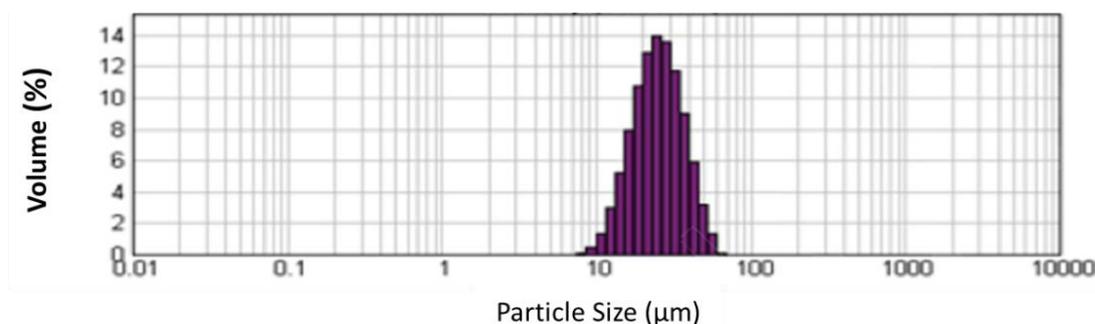


Figura 4.8. Distribución de tamaño de cápsulas PA de Miglyol obtenidas.

Como se puede comprobar, la polidispersión de las cápsulas obtenidas no es muy elevada, estando la media de diámetros alrededor de 25 μm . En este caso se considera una sola población de partículas, no observándose otros picos como en el caso de las cápsulas de MF.

➤ *Parámetros cuantitativos*

Durante el proyecto MICROFRAG se investigaron diferentes solventes capaces de romper las cápsulas y liberar su contenido. Los disolventes más eficientes para la apertura de microcápsulas de poliamida fueron de nuevo la acetona y el cloroformo por lo que se realizó un estudio por $^1\text{H-RMN}$ con éste último de igual manera que con las cápsulas de MF. Los datos referentes a la carga útil y la eficiencia de encapsulación de este tipo de microcápsulas se recogen en la **Tabla 4.3**

| Cápsulas | Tamaño | Morfología | Carga útil o <i>payload</i> | Eficiencia de encapsulación |
|-----------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Poliamida | $\approx 25 \mu\text{m}$ | Esféricas, mononucleares | $>80\%$ | 75-80% |

Tabla 4.3. Datos extraídos de la caracterización de cápsulas de Miglyol[®]812 con poliamida.

4.3. Encapsulación de fragancias simples

La encapsulación de fragancias con varios componentes, de igual manera que pasó en la encapsulación por MF, no se plantea tan sencilla como la encapsulación de un aceite mono-componente. Las formulaciones, a pesar de ser aptas para el proceso por su hidrofobicidad, no dejan de ser mezclas muy complejas de compuestos con diferentes grados en polaridad y volatilidad que pueden afectar los procesos de emulsión y polimerización.

4.3.1. Síntesis de cápsulas con fragancias simples adaptadas al proceso de polimerización interfacial

En el desarrollo del proyecto MICROFRAG se lograron encapsular con éxito algunas de las fragancias formuladas por CARINSA mediante polimerización interfacial con poliamida. El abanico de fragancias testeadas abarcó desde un solo compuesto, como el acetato de isoamilo (olor a plátano) hasta formulaciones complejas como el Frescor Azul (de la familia olfativa ‘marino’), compuesta por decenas de fragancias. En la **Tabla 4.4** se muestra, sin entrar en detalles en los procesos, las diferentes fragancias encapsuladas en dicho proyecto.

| Nombre | Encapsulación | Composición |
|---------------------|---------------------|--|
| Acetato de isoamilo | Si (100% fragancia) | 1 compuesto, no reactivo |
| Apple Top | Si (100% fragancia) | Simple, no reactiva |
| Pure | Si (30% Miglyol) | Compleja, 1 componente reactivo |
| Frescor Azul | Si (30% Miglyol) | Compleja, varios componentes reactivos |
| Bali | Si (20% Miglyol) | Compleja, varios componentes reactivos |
| Aloe Vera | Si (20% Miglyol) | Compleja |

Tabla 4.4. Listado de fragancias CARINSA encapsuladas durante el proyecto MICROFRAG.

Para los casos de fragancias más simples y desprovistas de compuestos susceptibles de reaccionar con el cloruro, se logró la encapsulación de cápsulas con núcleos formados completamente por fragancia. Por ejemplo, la formulación Apple Top (APPLE), pese a ser muy volátil, se pudo encapsular eficientemente.

Por otro lado, en los casos con fragancias más complejas, como puede ser el Frescor Azul, fue necesaria alguna modificación. Una de las soluciones más efectivas consistió en el hecho de añadir un aceite que actúa como portador (o *carrier* en inglés), que se mezcla de manera homogénea con la fragancia, la retiene, y no afecta a la estabilidad de la emulsión. El hecho de que algunos de los compuestos presentes en las formulaciones más complejas fueran reactivos era un inconveniente y para evitar al máximo posible esta interacción con el TR, se realizó la disolución del cloruro previamente en el aceite para posteriormente añadir la fragancia. En la **Tabla 4.5** y en el **Protocolo PA.2** se muestran las condiciones para la encapsulación de fragancias mediante esta estrategia.

| Factor | Valores escala laboratorio (50 g) |
|-------------------------|---|
| Cantidad fase acuosa I | 30 g (Tween®80 1%p/p) |
| Cantidad fase aceite | 30 g (3 g Miglyol®812 + 6.5 g Fragancia +0.5 g TR, 5%p/p) |
| Cantidad fase acuosa II | 10 g (NaOH 0.19 M + DETA 5.3%p/p) |
| Emulsificación | 5.000 rpm (Ultra-Turrax®T25) |
| Tiempo de emulsión | 10 min |

Tabla 4.5. Condiciones establecidas durante MICROFRAG para la encapsulación de fragancias complejas y reactivas con el cloruro de ácido.

Con esta modificación y reduciendo el tiempo de emulsificación en 5 minutos, se redujo el tiempo de contacto del cloruro con los componentes reactivos de las fragancias y se pudo evitar en un alto grado la alteración de la composición. El resultado de esta modificación supuso la obtención de cápsulas esféricas de aspecto similar a las que están hechas completamente de fragancias. En la **Figura 4.9** se

muestran imágenes del resultado obtenido en cápsulas de fragancias tanto en aquellas con núcleos 100% fragancia, como en núcleos con la incorporación de un aceite. Como se mostró en el **Capítulo 3** esta estrategia fue también usada de manera temporal en la síntesis de cápsulas MF de la fragancia TROPICAL con resultados positivos.

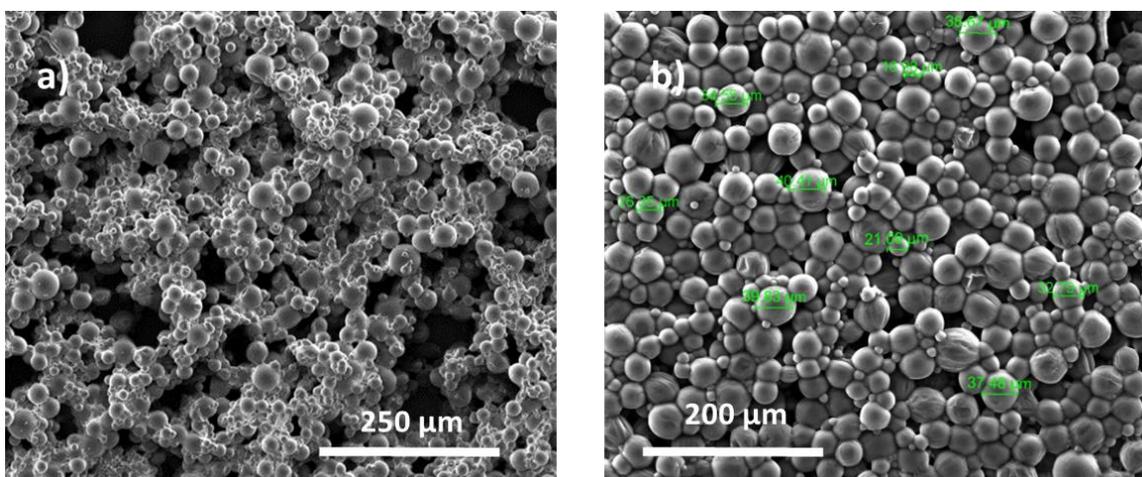
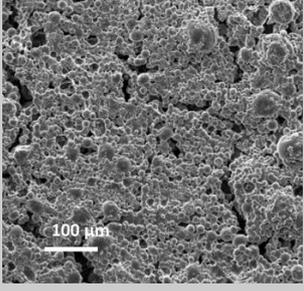
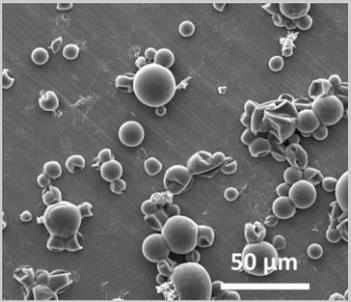
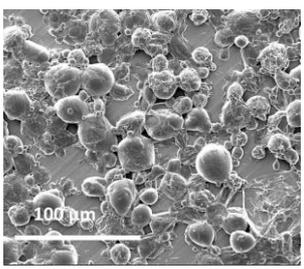
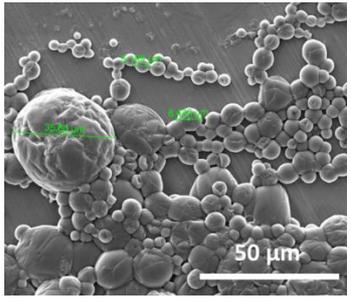
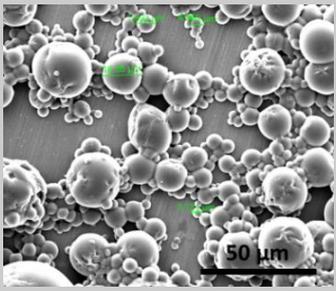
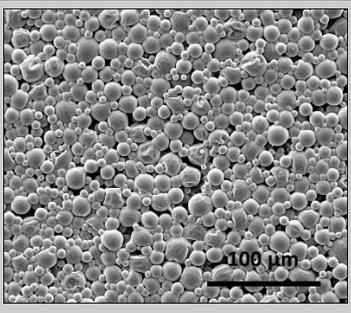


Figura 4.9. Imágenes SEM de a) cápsulas obtenidas de las fragancias Apple (100% fragancia en núcleo); b) Frescor Azul (70% fragancia en núcleo).

Con la experiencia adquirida en la encapsulación de formulaciones de fragancias, se determinó que la mejor estrategia sería la de encapsular mezclas más sencillas y carentes de compuestos reactivos para así lograr una mayor carga útil de fragancia al no añadir aceites.

En el marco del actual proyecto, además de encapsular algunas de las formulaciones correspondientes al proyecto MICROFRAG, se realizaron encapsulaciones de otras formulaciones preparadas por CARINSA que abarcaron diferentes familias olfativas (frutal, aromática, marino...) y con menor número de componentes (4-20 componentes). Vistos los problemas que se observaron en el anterior proyecto, las formulaciones se intentaron adecuar a los requerimientos necesarios para lograr microcápsulas sin la necesidad de añadir aceites, por lo tanto, núcleos formados por 100% fragancia con la menor proporción de compuestos nucleófilos, sin disolventes añadidos y que tuvieran una baja tendencia a difundir hacia la fase acuosa. Las condiciones utilizadas en este caso fueron las optimizadas para la encapsulación de Miglyol (**Tabla 4.2**). El listado de fragancias encapsuladas y los resultados se muestran en la **Tabla 4.6**.

| Formulación | Aspecto | Formulación | Aspecto |
|------------------------------|--|-------------------------|--|
| Frutas del bosque P105887 |  | Piña P105885 |  |
| Frescor Azul* P105841 |  | Amapola P105843 |  |
| Marino P105845 |  | Apple TOP FCAP952505 |  |

*Nueva reformulación adaptada para los procesos de encapsulación del proyecto y completamente distinta a la utilizada inicialmente en MICROFRAG

Tabla 4.6. Imágenes SEM de las diferentes formulaciones de fragancias encapsuladas.

La encapsulación resultó funcionar aparentemente en todos los casos y sin la necesidad de añadir aceites en las formulaciones. No obstante, las cápsulas de mayor tamaño presentaron más problemas para mantener la estabilidad, y a través de microscopía electrónica se pudo corroborar este problema (excesiva elongación, pérdida de forma esférica o deformaciones en corteza).

Además, la detección de las fragancias encapsuladas se evaluó mediante la colaboración de los expertos perfumistas de CARINSA, los cuales realizaron los correspondientes análisis sensoriales de cápsulas extendidas en un portamuestras, secadas y posteriormente rascadas para así liberar el contenido encapsulado. El resultado en todos los casos fue un ligero cambio en la percepción, habiéndose perdido o detectado en menor medida según qué componentes de las formulaciones. Además, a nivel microscópico, la mayoría de las cápsulas sintetizadas parecían presentar poca

estanqueidad, apreciándose un hinchamiento (o *swelling* en inglés) cuando las cápsulas se dispersaban en un medio altamente diluido y ligeramente ácido. Tras observar esto, quedó patente que el sistema debía modificarse para hacerlo más robusto, con cápsulas más impermeables, más pequeñas y aptas para distintas formulaciones.

4.3.2. Reducción de tamaño

4.3.2.1. Primeras pruebas

Una de las modificaciones donde se puso especial énfasis fue la reducción del tamaño de las cápsulas de fragancia. Tras comprobar que las de menor tamaño presentaron mayor estabilidad, se buscó conseguir homogeneidad de cápsulas con estas características ($< 15 \mu\text{m}$). Por otro lado, en algunas aplicaciones de cápsulas como la impregnación de tejidos, ya evaluada en el proyecto MICROFRAG, quedó patente que las de menor tamaño se atrapaban con mayor frecuencia que el resto, llegando incluso a depositarse en recovecos de las fibras donde las otras cápsulas no eran capaces de penetrar (**Figura 4.10**).

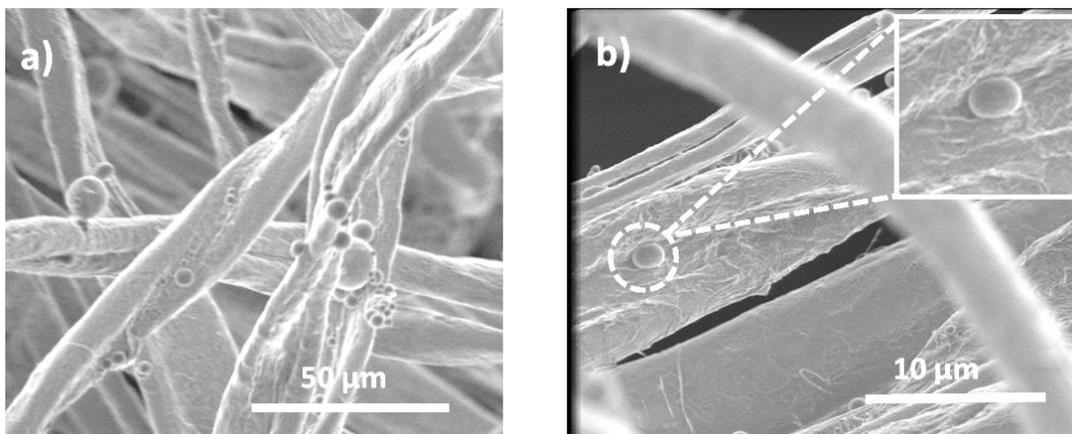


Figura 4.10. Imágenes SEM mostrando cápsulas de menor tamaño depositadas en recovecos de fibras de algodón.

La mayor dificultad para el rediseño de estas cápsulas fue que las condiciones definidas para la encapsulación de fragancias simples no eran aplicables para cápsulas con un tamaño más reducido. Las cantidades de amina, la cantidad de cloruro de ácido y el emulsionante usados en las cápsulas de tamaño mayor ($>25 \mu\text{m}$) no dieron buenos resultados para la obtención de cápsulas por debajo de $15 \mu\text{m}$.

La fragancia de partida escogida para esta optimización fue Apple TOP FCAP952505 (APPLE) por su buen comportamiento para la emulsión, disolución del cloruro, y la simplicidad de su fórmula donde hay ausencia de componentes nucleófilos. Los primeros cambios para mejorar el resultado en estos

tamaños fueron en las cantidades de los monómeros. El cloruro, en concentraciones alrededor de 5%p/p respecto la fase aceite, no se incrementó, en cambio la cantidad de amina se aumentó (+500% la cantidad usada) para favorecer la mayor difusión hacia la interfase fragancia/agua al haber más superficie disponible. Esta modificación también fue fruto de la investigación llevada a cabo en el proyecto MICROFRAG, no obstante, otro elemento importante que no se acabó de resolver en aquel momento fue la selección del emulsionante o estabilizante más adecuado y sus correspondientes concentraciones para la síntesis de cápsulas con tamaños reducidos.

Por ello, uno de los primeros experimentos al inicio de la optimización consistió en realizar síntesis con el emulsionante Tween®80 (en adelante Tween) a mayores concentraciones (3%p/p) para así estabilizar el mayor número de gotas generadas. Desafortunadamente, esta solución no resultó aportar una mejora del resultado. El aspecto de las cápsulas observado por SEM en todos los casos fue el de cápsulas con formas cóncavas, morfología que no indicaba estabilidad de las cápsulas tras el secado (**Figura 4.11**). Tras varios cambios realizados respecto a las concentraciones, el Tween, junto con otros emulsionantes fueron descartados para este propósito.

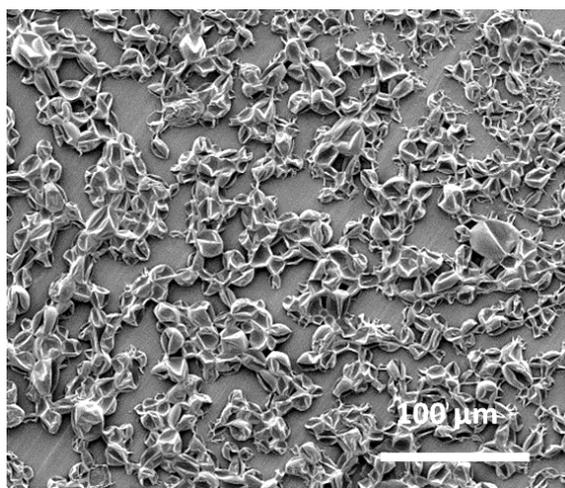


Figura 4.11. Imagen SEM de una síntesis fallida para la obtención de cápsulas de menor tamaño usando Tween al 3%p/p como emulsionante.

En algunos artículos científicos y diferentes patentes recopiladas, se corroboró el extendido uso de alcohol polivinílico (PVA) para la síntesis de cápsulas de poliamida. Las cadenas de alcohol polivinílico orientan sus grupos hidroxilo hacia la fase acuosa por lo que se sitúa de manera muy eficiente en la interfase aceite/agua. El PVA a pesar de no tener un gran poder emulsionante, estabiliza de manera muy eficiente las gotas de fragancia durante su emulsión, incluso las más pequeñas. Esta falta de poder emulsionante se traduce en una mayor polidispersión de las gotas, pero que puede ser contrarrestado con tiempos de emulsificación más altos, y una mayor energía aplicada. Además de todo esto, el PVA es un polímero altamente disponible en el mercado bajo el nombre de POVAL® o

MOWIOL®. Tras conocer estas características y compatibilidades del sistema con el PVA, se decidió elaborar baterías de experimentos para adaptarlo a la encapsulación de la fragancia APPLE.

4.3.2.2. Selección del tipo de PVA y su concentración óptima en la fase acuosa

El primer paso fue elegir qué tipo de PVA se adaptaba mejor al sistema de encapsulación. Para ello se optó por realizar experimentos con unos cuatro tipos de PVA de diferentes grados de hidrólisis y pesos moleculares que se resumen en la **Tabla 4.7**.

| Tipo de Peso molecular | Grado de hidrólisis 98% | Grado de hidrólisis 88% |
|------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Bajo | P.M. = 27.000 (Mowiol®4-98) | P.M. = 31.000 (Mowiol®4-88) |
| Medio | P.M. = 125.000 (Mowiol®20-98) | P.M. = 130.000 (Mowiol®18-88) |

Tabla 4.7. Valores de peso molecular (P.M.) y grados de hidrólisis de los diferentes PVA usados y sus correspondientes nombres comerciales.

Las condiciones de partida, a excepción del PVA, se mantuvieron constantes para no afectar en exceso al sistema. Éstas vienen reflejadas en la **Tabla 4.8** que se muestra a continuación:

| Factor | Valores escala laboratorio (50 g) |
|-------------------------|------------------------------------|
| Cantidad fase acuosa I | 30 gr solución PVA (4 tipos) |
| Cantidad fase aceite | 10 g (9.5 APPLE +0.5 g TR, 5%p/p) |
| Cantidad fase acuosa II | 10 g (NaOH 0.19 M + DETA 26.5%p/p) |
| Emulsificación | 8.000 rpm (Ultra-Turrax®T25) |
| Tiempo de emulsión | 10 min |

Tabla 4.8. Condiciones de partida para la reducción de tamaño de las cápsulas de poliamida.

Tras la realización de los experimentos con todas las variedades de PVA al 1%p/p, se tomó la decisión de usar el de peso molecular medio y con un 98% de hidrólisis (Mowiol®20-98). Los PVA con grado de hidrólisis 88% fueron descartados porque generaron gran cantidad de espuma a las velocidades de emulsión necesarias para la disminución de tamaño (≥ 8.000 rpm). Esto dio lugar a una menor eficiencia de encapsulación al producirse difusión de parte de los monómeros hacia las burbujas de aire generadas en la emulsificación. Particularmente con el Mowiol®18-88, los resultados fueron satisfactorios, por lo que si se encontrara solución para la reducción de la espuma, sería un buen candidato a ser utilizado en síntesis posteriores.

Por el otro lado, los PVA con alto grado de hidrólisis no generaron prácticamente espuma presentando no obstante un menor poder emulsionante y por consiguiente una emulsión con mayor polidispersión

de tamaños. El resultado de las encapsulaciones fue muy satisfactorio, formándose cápsulas esféricas y estables de un tamaño reducido (15 μm , **Figura 4.12.a**).

Posteriormente, y manteniendo el resto de condiciones como en la **Tabla 4.8**, se quiso comprobar la posibilidad de encapsulaciones con combinaciones de PVA y el emulsionante Tween para mejorar la distribución de tamaño. Para ello se realizaron baterías una serie de 9 experimentos combinando cantidades de ambos estabilizantes (**Tabla 4.9**). El resultado fue negativo en todos los casos en que se introdujo Tween incluso en pequeñas proporciones.

| Combinaciones de estabilizantes | Tween 0% | Tween 0.5% | Tween 2% |
|---------------------------------|----------|------------|----------|
| PVA 1% | ✓ | X | X |
| PVA 1.5 % | ✓ | X | X |
| PVA 2% | ✓ | X | X |

Tabla 4.9. Experimentos realizados combinando diferentes cantidades de tensioactivo Tween 80 y estabilizante PVA 20-98.

Como puede apreciarse en la **Figura 4.12.b**, en el proceso de encapsulación con el uso de Tween se alteró la correcta formación de la corteza y la morfología final. A pesar de que algunas cápsulas parecieron formarse correctamente, éstas se encontraban muy deformadas y el porcentaje de esta proporción fue muy pequeña. Como conclusión se definió que la combinación de ambos estabilizantes no pareció ser adecuada para la estabilización de la emulsión y posterior polimerización.

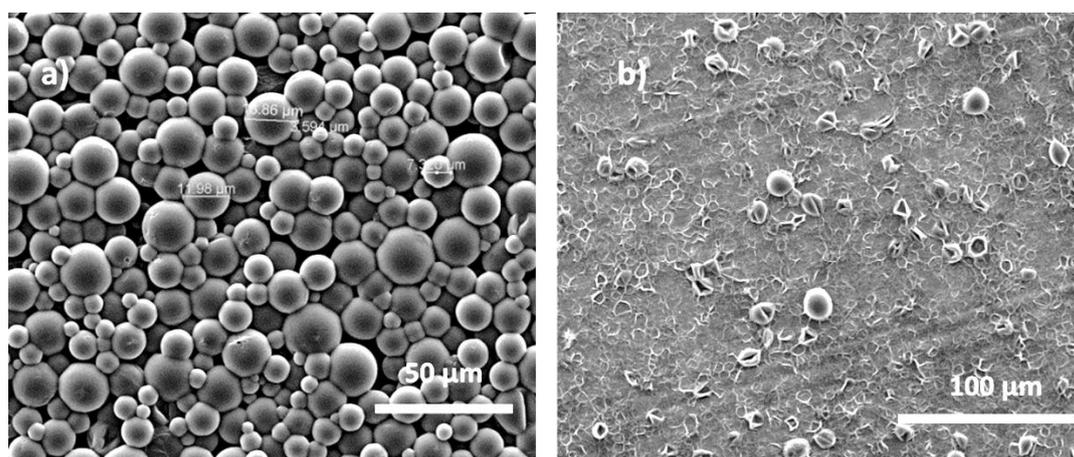


Figura 4.12. Imágenes SEM de: a) cápsulas de poliamida correctamente formadas (1% PVA 20-98, 8.000 rpm (EXP 7); b) cápsulas de poliamida (2% PVA 20-98 + 0.5% Tween, 8.000 rpm (EXP 8).

El resultado de los diferentes experimentos con sólo PVA como estabilizante dio lugar a microcápsulas correctamente formadas en el rango de concentraciones de PVA entre 1% y 5% (**Figura 4.13**). No obstante, concentraciones de PVA demasiado altas (>3%) generaron mezclas muy viscosas que con el

paso del tiempo generaban una capa densa y concentrada de cápsulas en la parte superior tras la flotación. Por otro lado, concentraciones menores de 2% generaban cápsulas con cortezas algo endeble y deformables. Por este motivo, la concentración de PVA óptima se fijó en concentraciones entre 2-3%.

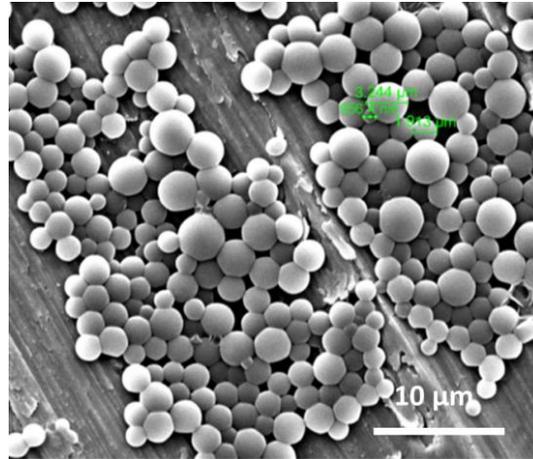


Figura 4.13. Imagen SEM de cápsulas de poliamida con núcleo APPLE usando 3%p/p de PVA como estabilizante.

4.3.2.3. Relación entre velocidad de emulsificación y tamaño obtenido

Tras los resultados obtenidos se realizó una batería de experimentos para conocer el alcance del sistema en la disminución de tamaño de partícula. Para ello, desde las condiciones de partida (**Tabla 4.8** con estabilizante PVA 20-98 al 2.5%) se fue variando la velocidad de emulsificación con el homogenizador Ultra-Turrax®T25. En paralelo, se fueron analizando todas las suspensiones obtenidas por difracción laser para seguir la variación en la distribución de tamaño de las partículas obtenidas en los experimentos realizados (**Figura 4.14**).

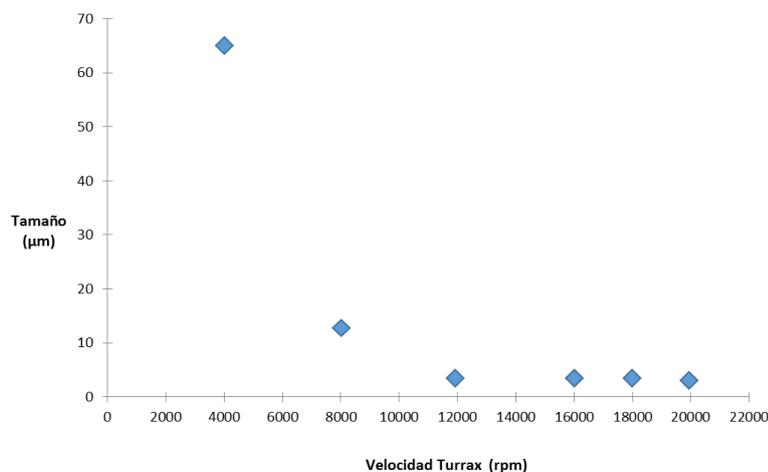


Figura 4.14. Gráfico que relaciona la variación del tamaño de cápsulas con la velocidad de emulsificación aplicada con Ultra-Turrax®T25 (t=15 min).

En este gráfico se muestra la variación del tamaño medio de partícula respecto a la velocidad de homogenización aplicada en el proceso de emulsificación. Según lo observado, no es necesario aplicar una velocidad mayor de 12000 rpm ya que se llega un estado estacionario o *plateau* donde es difícil reducir más el tamaño de las gotas generadas. Una mayor velocidad implicaría un gasto mayor de energía y propiciaría una mayor degradación del cloruro por hidrólisis. El tamaño medio más pequeño alcanzado para el núcleo APPLE fue $\approx 3 \mu\text{m}$ (**Figura 4.15**) lográndose algunas cápsulas cercanas al micrómetro.

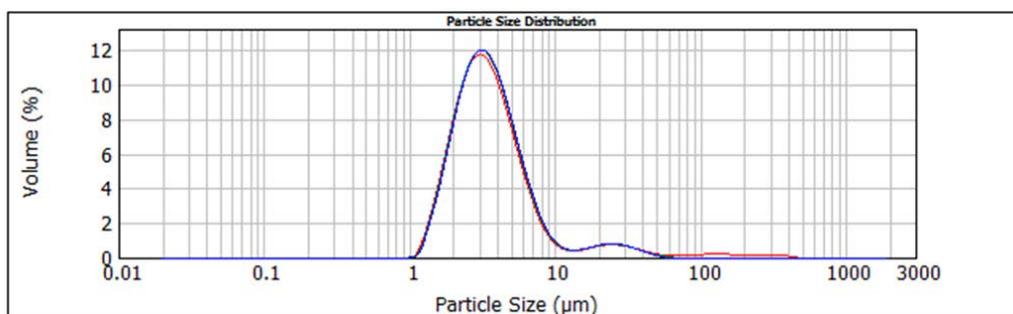


Figura 4.15. Distribución de tamaño de las partículas obtenidas a 20.000 rpm.

Mediante este estudio se demostró un efecto de la velocidad de emulsificación en el tamaño final. No obstante, un aspecto importante a tener en cuenta es que el tamaño de gota obtenido depende del tipo de líquido a emulsionar y sus propiedades físico-químicas (viscosidad, polaridad, volatilidad...) por lo que estos valores pueden no ser extrapolables a otros compuestos.

4.3.3. Modificación de la corteza para la mejora de la estanqueidad

Existen estudios previos donde se han modificado membranas basadas en poliamida para dotarlas de mayor hidrofobicidad [10,11]. En el proyecto MICROFRAG, por ejemplo, se realizaron cambios en la corteza para modificar la carga de las cápsulas en un amplio rango de pH y así conseguir mejores adhesiones a los tejidos. Para ello se investigaron diferentes estrategias de funcionalización, como una *capa-a-capo* con polielectrolitos o mediante adiciones nucleófilas entre las aminas libres de la corteza y grupos reactivos electrófilos.

No obstante, aún con este tipo de modificaciones se aprecia una insuficiente estanqueidad de las cápsulas cuando se alcanzan pH ácidos en el medio de dispersión. Esto es un problema muy importante en el caso de que las cápsulas deban ser usadas en formulaciones de suavizante, ya que éstas están en torno un pH 3-4, suficiente para alterar la estructura de la corteza. Este suceso se atribuyó de manera tentativa a un problema en la corteza, concretamente a las cargas positivas aportadas por las aminas protonadas a pH ácidos, que aumentan la repulsión entre cadenas y

Inicialmente se fijó la cantidad de amina a añadir usando los mismos equivalentes que en las síntesis con DETA (2 eq.). Sucesivamente se realizaron experimentos multiplicando por 4 los equivalentes para conocer el efecto de un exceso de cada amina. Se analizaron por microscopía las cápsulas de las suspensiones antes y tras la aplicación de un pH ácido. Los mejores resultados obtenidos de estas modificaciones se muestran en las imágenes SEM de la **Figura 4.17**.

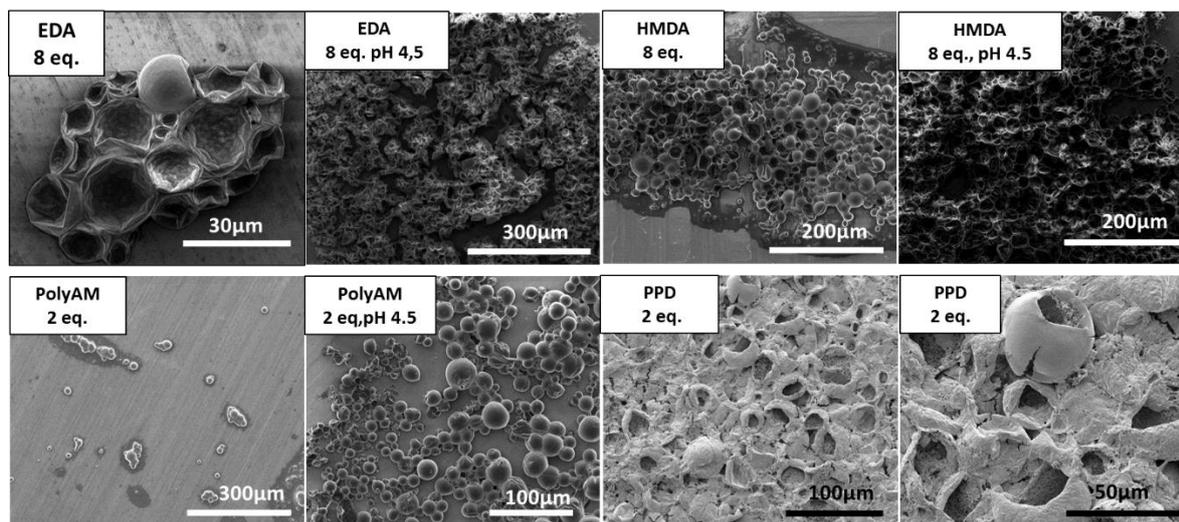


Figura 4.17. Imágenes SEM de los resultados preliminares en la encapsulación de la fragancia APPLE con las diferentes aminas y su estabilidad en pH ácidos.

Las diaminas lineales **EDA** y **HMDA** mostraron un comportamiento esperado para el proceso de polimerización interfacial (sin agregaciones ni cambios de viscosidad) y la posterior visualización por microscopía mostró unas cápsulas aparentemente estables y con superficie lisa. No obstante, en el secado, y sobre todo a pH ácidos, las cápsulas no parecieron resistir. En ambos casos fue necesario usar cantidades mayores de equivalentes (8 eq.) para poder lograr suficiente material de corteza alrededor de las gotas.

En el caso de la amina más ramificada, la **poliamina (PolyAM)**, la encapsulación se produjo de manera satisfactoria con la misma cantidad inicial de 2 equivalentes. La estructura molecular de la poliamina está constituida por ramificaciones de DETA y tal vez esto favoreciera un resultado similar. Además, tras diluir las muestras a pH ácidos las cápsulas parecieron mantener estabilidad, aunque se observó un poco de deshinchamiento, hecho que confirmó que la estanqueidad no fue del todo mejorada.

Por último, en el caso de la **p-fenilendiamina (PPD)**, a nivel macroscópico ya se observó que la reacción no pareció funcionar del todo bien, y a través del microscopio óptico se observaron cápsulas con una rugosidad muy alta y con forma no del todo esférica. Esto se verificó por SEM donde se apreció la encapsulación incompleta de las gotas, formándose estructuras de ‘cuenco’ de aspecto rígido y

quebradizo. Otro de los detalles observados fue la superficie lisa del exterior, muy diferente de la estructura rugosa del interior. Esta diferencia entre los dos lados de la corteza es muy común en la síntesis de microcápsulas de poliamida producido por la difusión de la amina y crecimiento del polímero hacia el interior de la fase lipofílica [12-14]. Tras el resultado observado y tras comprobar la baja solubilidad de este monómero en la fragancia, se descartó realizar una reacción aumentando la cantidad de PPD.

El polímero generado entre el PPD y el cloruro de tereftaolilo, es ampliamente conocido con el nombre de Kevlar® (Figura 4.18)

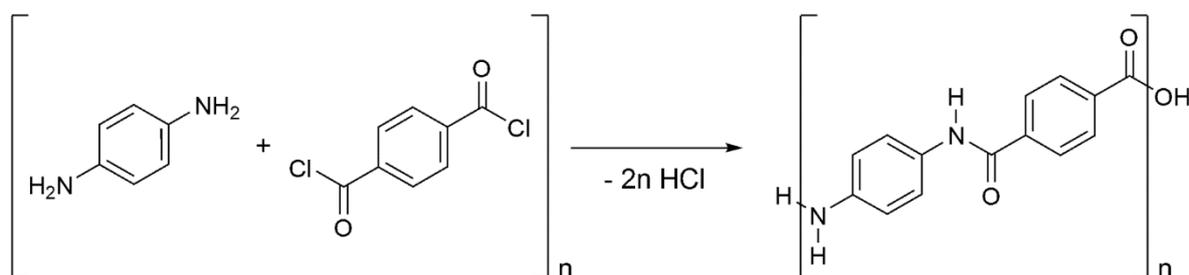


Figura 4.18. Esquema de la reacción de policondensación para dar lugar al Kevlar® [15].

El Kevlar® es un polímero usado sobretodo en la fabricación de chalecos antibalas, neumáticos o velas náuticas por su alta resistencia y buenas propiedades mecánicas. Además de los fuertes enlaces covalentes tipo amida generados, las cadenas poliméricas quedan unidas entre sí por fuerzas de tipo puentes de hidrógeno o interacciones π - π .

Por estas propiedades se creyó conveniente el uso del PPD para dotar de mayor estanqueidad las cápsulas con fragancia pero como la reacción con el PPD mostró no ser efectiva con una cantidad de 2 equivalentes se optó por añadirlo como co-monómero a la DETA. Según lo publicado en la referencia [16], se pueden obtener cápsulas estancas con un buen grosor de corteza con el uso de DETA, PPD y cloruro de sebacoilo (SC). No obstante, los mejores resultados fueron con la inclusión de un porcentaje de ácido oleico en el núcleo que permite una mayor difusión de amina al interior de la cápsula y actuar como plastificante, lográndose cápsulas no tan quebradizas.

Para adaptar ese sistema al desarrollado, se realizaron varios experimentos con la adición de en menor medida de PPD (5-10%p/p) y en algunos casos, en combinación con otro co-monómero en la fase aceite (cloruro de trimesoilo, TM) para mejorar el grado de entrecruzamiento.

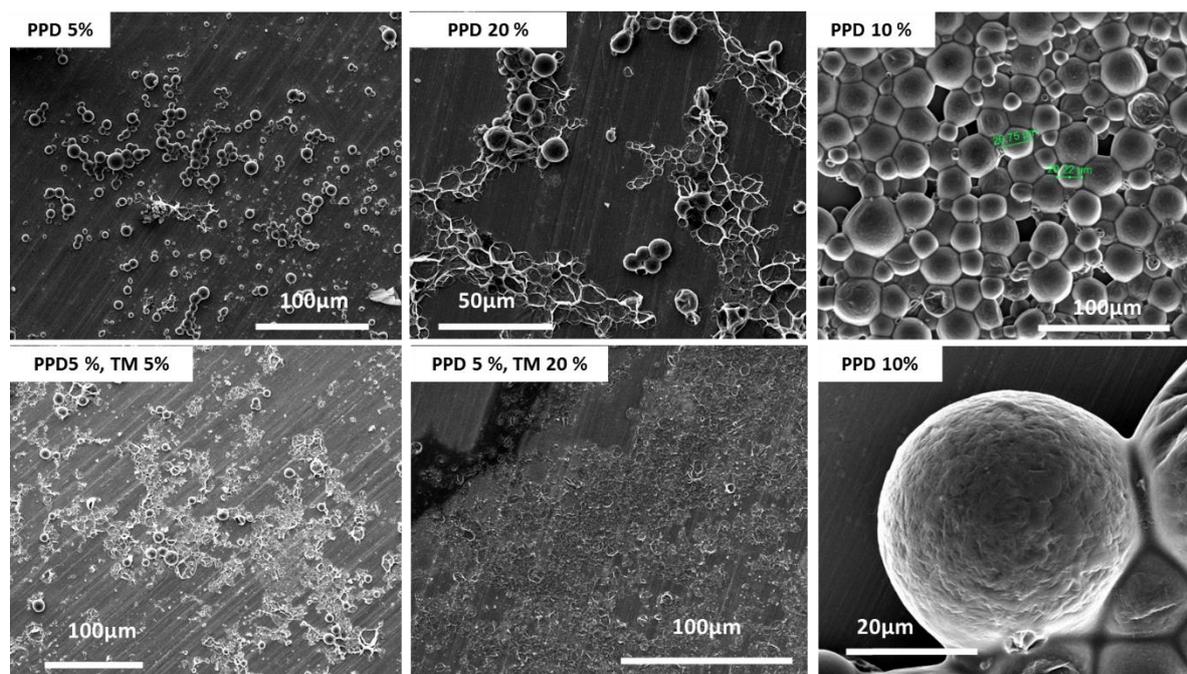


Figura 4.19. Primeros resultados del uso de co-monómeros en la encapsulación del Tropical.

Como se puede comprobar en la **Figura 4.19** el uso de pequeñas cantidades de PPD (y sin TM) permitió la encapsulación, dando lugar a cápsulas de fragancia estables. No obstante, tras observar las suspensiones pasados unos días, estas empiezan a colorearse de una tonalidad marrón por la oxidación del PPD.

Estos resultados fueron los últimos obtenidos en el proyecto en relación a la optimización de la estanqueidad. El PPD se planteó como una opción real para mejorar la estanqueidad de las cápsulas aunque el sistema debe ser optimizado con tal de ajustar las cantidades adecuadas o combinarlo con otras aminas, no solamente con DETA.

4.4. Encapsulación de fragancia compleja

Tras haber logrado la encapsulación de las fragancias simples previamente mostradas y lograr el objetivo de reducir el tamaño de las correspondientes cápsulas, se procedió con la encapsulación de la fragancia compleja Tropical Fruit P780765 (TROPICAL). Las modificaciones relacionadas con la mejora de la estanqueidad no se creyó conveniente aplicarlas en este punto hasta que no se consiguiera un sistema robusto y que se confirmara una mejora en este sentido.

La formulación TROPICAL contiene una gran cantidad de compuestos, algunos de los cuales con presencia de grupos funcionales reactivos (ver **Anexo II**). Estos compuestos potencialmente reactivos se muestran en la **Tabla 4.11**. Pese a que la cantidad de estos compuestos no parece muy elevada, es suficiente para poder reaccionar con el cloruro de ácido. De hecho, se pudo apreciar una alteración

de color en la mezcla cloruro/fragancia en el proceso de preparación de las fases. Lo más probable es que el cambio de color fuera indicativo de que algún compuesto reaccionó con el cloruro.

| Compuesto | Tipo | Proporción (p/p%) |
|----------------------------------|---------|-------------------|
| Cis-3-hexenol | Alcohol | 0.2% |
| 2-Isopropil-4-metiltiazol | Tiazol | 0.01% |
| Dihidromircenol | Alcohol | 3.5% |
| Linalol | Alcohol | 3.66% |
| Alcohol feniletílico | Alcohol | 0.001% |
| Terpineol | Alcohol | 0.02% |
| Bacdanol | Alcohol | 0.2% |
| TOTAL | - | 7.6% |

Tabla 4.11. Compuestos de carácter nucleofílico presentes en la fragancia Tropical Fruit P780765.

La encapsulación de TROPICAL se intentó con las últimas condiciones optimizadas para la obtención de cápsulas APPLE de menor tamaño (**Tabla 4.12** y **Protocolo PA.3**).

| Factor | Valores escala laboratorio (50 g) |
|-------------------------|--------------------------------------|
| Cantidad fase acuosa I | 30 gr solución PVA 20-98 al 2.5% |
| Cantidad fase aceite | 10 g (9.5 TROPICAL +0.5 g TR, 5%p/p) |
| Cantidad fase acuosa II | 10 g (NaOH 0.19 M + DETA 26.5%p/p) |
| Emulsificación | 16.000 rpm (Ultra-Turrax®T25) |
| Tiempo de emulsión | 10 min |

Tabla 4.12. Condiciones de partida para la encapsulación de la fragancia TROPICAL para la obtención de cápsulas de poliamida de un tamaño comprendido en el rango (3-10 μm).

El resultado de la síntesis a nivel macroscópico fue una correcta formación de las cápsulas, no observándose agregados, y con una ligera coloración.

➤ *Determinación morfológica por microscopía*

Tras la obtención de las microcápsulas, se llevó a cabo la correspondiente caracterización por microscopía de cápsulas procedentes de la suspensión del crudo de reacción y del liofilizado. Como se puede apreciar en las **Figura 4.20.a, b** la encapsulación de la fragancia aparentaba ser efectiva, obteniéndose cápsulas esféricas y estables a alto vacío de un tamaño aproximado de 3-5 μm . El aspecto macroscópico de las cápsulas liofilizadas fue un sólido muy compacto por la presencia del PVA que se usó como estabilizante. No obstante, al analizar por SEM el sólido se apreció la presencia de

las cápsulas estables, manteniendo su estructura esférica como se puede observar en la **Figura 4.20.c**, **d**.

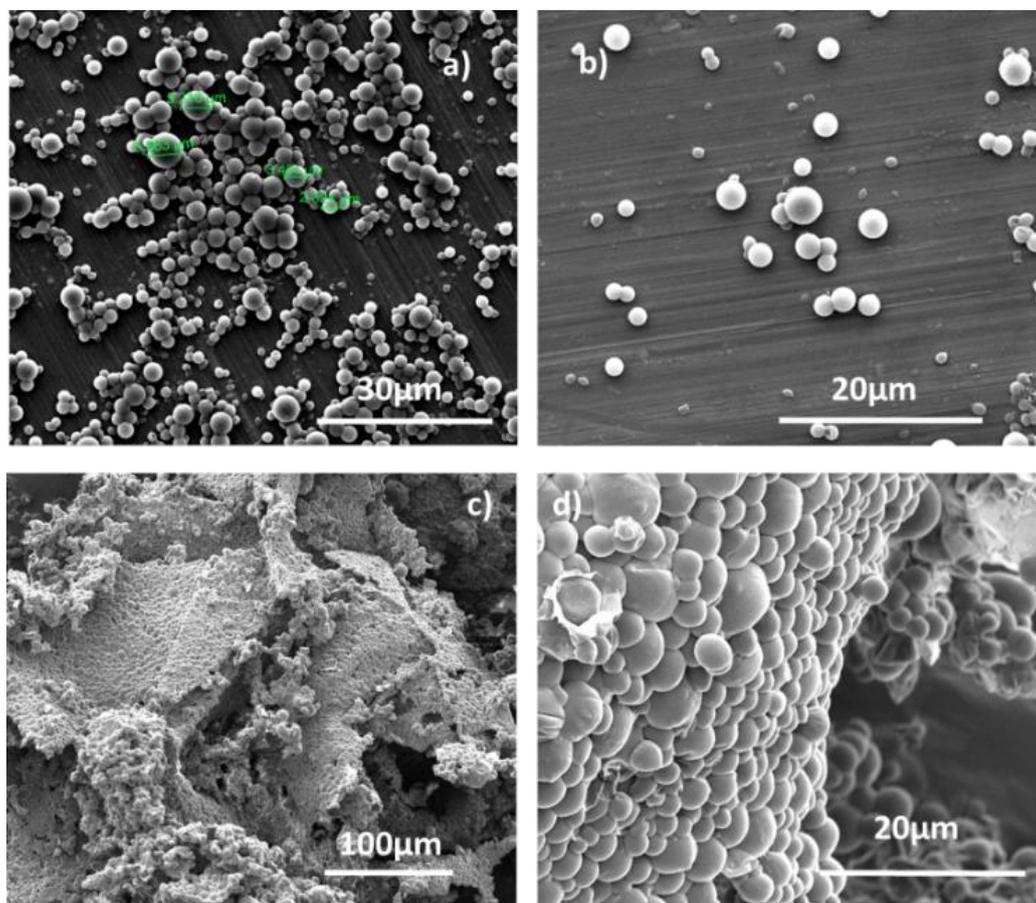


Figura 4.20. a, b) Imágenes SEM de las cápsulas TROPICAL (2% PVA, 8.000 rpm) secadas al aire; c,d) imágenes SEM cápsulas TROPICAL tras la liofilización.

➤ *Determinación del contenido por ^1H -RMN*

Tras la visualización por SEM se analizó la muestra mediante la extracción con cloroformo del sólido liofilizado. De igual manera que se realizó en las cápsulas de MF, se compararon todas las regiones del espectro donde aparecían los picos correspondientes a la formulación con los de la fragancia libre. El análisis por ^1H -RMN confirmó la presencia de fragancia en el interior de las cápsulas incluso tras el proceso de liofilización como se puede ver en la **Figura 4.21**.

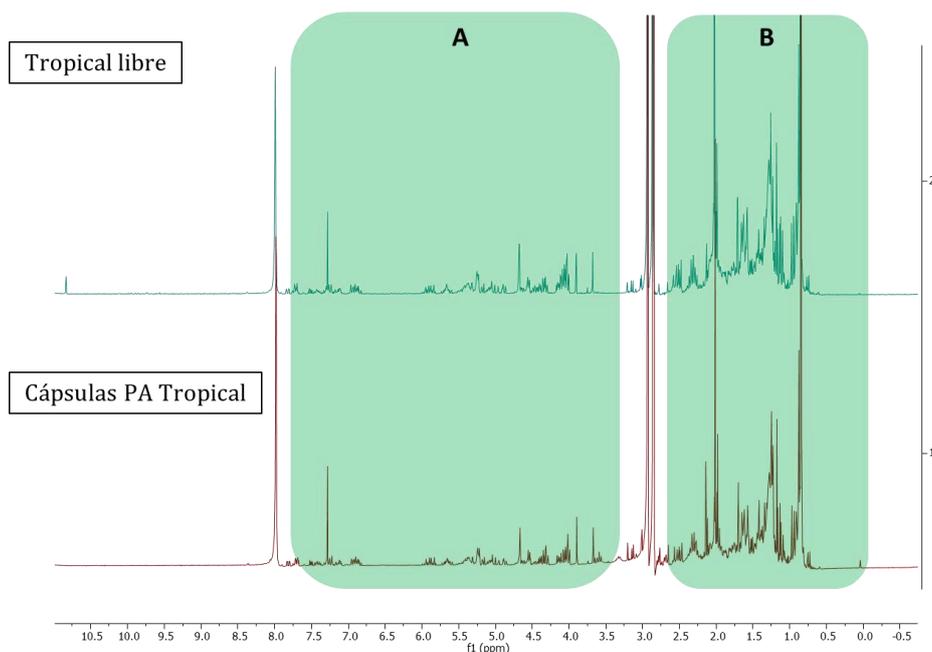


Figura 4.21. Comparativa de espectros ^1H -RMN de la fragancia libre frente a la fragancia encapsulada. Las zonas coloreadas corresponden a las regiones de las señales pertenecientes a la fragancia TROPICAL.

A pesar de apreciarse prácticamente los mismos picos, la relación de compuestos se vio alterada si se comparan las integrales de todos los picos no pertenecientes a la DMF. De la comparación con los datos extraídos (**Tabla 4.13**), se determina una cantidad aproximada de **60% de carga útil**. Este dato es algo más bajo de lo esperado en este tipo de cápsulas ($\approx 80\text{-}90\%$) pero teniendo en cuenta la agregación generada por el PVA y la dificultad que eso supone al intentar romperlas con cloroformo, es posible que no todas las cápsulas se hubieran roto completamente y no toda la fragancia se hubiera extraído. También esto podría deberse a que se perdieron algunos componentes durante la síntesis de las cápsulas (debido a la reacción con el TR o difusión al agua) o durante la liofilización como se muestra en la variación de algunos picos en el espectro ^1H -RMN.

| Muestra | Patrón interno añadido (DMF) | Cantidad de muestra añadida | Integrales de fragancia |
|-----------------|------------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| Fragancia libre | 15 μl | 30 μl | A=3.14 / B=14.77 |
| Cápsulas | 15 μl | 30 mg | A=2.54/ B=8.05 |

Tabla 4.13. Resultados cuantitativos extraídos del análisis por ^1H -RMN.

Para el futuro se considerará la posibilidad de realizar varios lavados para eliminar el PVA u optar por otra estrategia que confirme una carga útil mayor que 80%.

➤ Cromatografía GC-MS

Tras la confirmación de la encapsulación de la fragancia en el interior, se procedió al análisis de los componentes por cromatografía de gases. Los datos recogidos en el cromatograma se recogen en el

gráfico de la **Figura 4.22**. Como puede comprobarse en los datos extraídos, la mayoría de los compuestos se encuentran encapsulados y se detectan tras la ruptura de las cápsulas. Los componentes más volátiles presentan valores muy parecidos a los observados en la fragancia libre, lo que nos informa de que las cápsulas parecen ser lo suficientemente estancas como para retenerlos. En líneas generales, los resultados obtenidos son muy parecidos a los obtenidos por la encapsulación con melamina-formaldehído, lo que confirmaría que las cápsulas con poliamida parecen tener una capacidad de retención de los volátiles similar a este tipo de encapsulación. Además, hay que tener en cuenta que las cápsulas de poliamida obtenidas se sintetizaron mediante un proceso muy rápido y a temperatura ambiente, lo cual da un valor añadido a esta técnica.

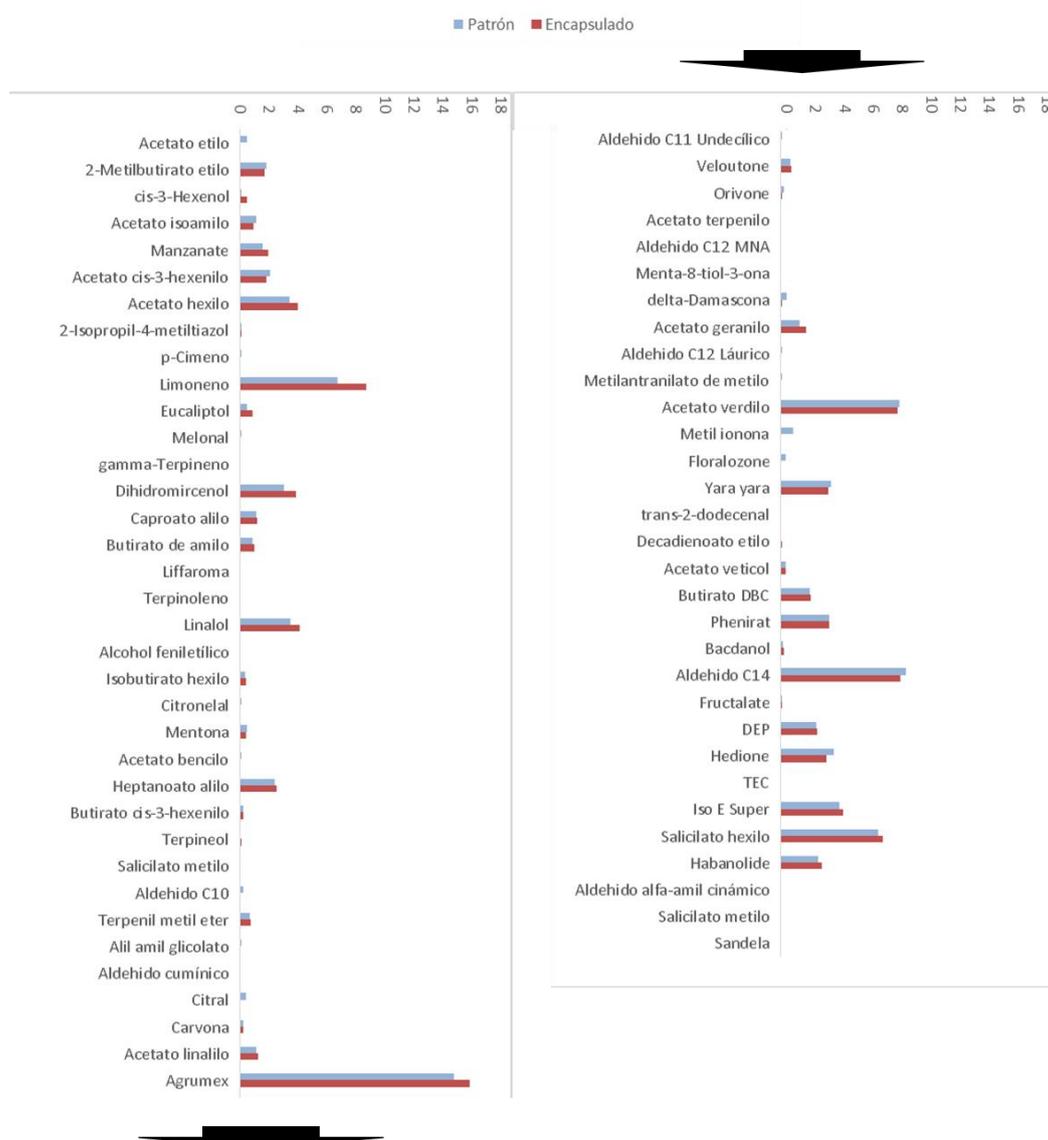


Figura 4.22. Resultados GC-MS de las cápsulas PA de fragancia TROPICAL en comparación con la formulación de la fragancia libre.

4.5. Conclusiones y futuro trabajo

El trabajo realizado en relación a la técnica de polimerización interfacial ha supuesto un mayor conocimiento de la técnica y se han logrado una serie de hitos que se mencionan a continuación:

- Se han sintetizado cápsulas poliméricas de poliamida mediante la técnica de polimerización interfacial con distintos núcleos hidrofóbicos: aceites y fragancia.
- Se han desarrollado cápsulas con núcleos formados completamente por fragancia para distintas formulaciones creadas por CARINSA, entre ellas la fragancia objetivo Tropical Fruit P780765.
- Se ha logrado una reducción del tamaño en un orden de magnitud de cápsulas de poliamida con el uso de PVA como estabilizante y la correspondiente optimización.
- El máximo valor de carga útil obtenido en las cápsulas se situó en el rango 80-90% (con aceite), lográndose así las características deseadas. En el caso de cápsulas con la fragancia objetivo está por determinar de manera más precisa, aunque los datos preliminares indican un 60%.
- Se iniciaron las primeras modificaciones químicas de la corteza para la mejora de la estanqueidad mediante el uso de otras variedades de aminas.
- Se ha realizado las correspondientes caracterizaciones de las microcápsulas con técnicas de microscopía (SEM y OM) y técnicas analíticas (^1H -RMN, GC-MS y MZ), creándose de esta forma protocolos de trabajo para los productos obtenidos por las otras técnicas de encapsulación.

No obstante, el proceso podría ser mejorado en muchos aspectos por lo que para el futuro se plantean nuevos retos:

- Aumentar el grosor de la corteza para dotarla de mayor estanqueidad mediante el uso de nuevas aminas o combinaciones de éstas.
- Modificación de superficie en las cápsulas de menor tamaño para mejorar adhesión en superficies de interés.
- Optimización de la cantidad de monómeros de partida.
- Optimización de otros factores de la reacción (temperatura, pH, tiempo de curado).
- Crear mejores protocolos con la técnica de GC-MS, para realizar una comparativa más precisa entre los núcleos encapsulados.

4.6. Referencias

- [1] Perignon, C.; Ongmayeb, G.; Neufeld, R.; Frere, Y.; Poncelet, D. Microencapsulation by Interfacial Polymerisation: Membrane Formation and Structure. *J. Microencapsul.* **2015**, *32* (1), 1–15.
- [2] Chang, T. M. S. Semipermeable Microcapsules. *Science (80-.)*. **1964**, *146* (3643), 524-525.
- [3] Shiba, M.; Tomioka, C.; Koishi, M.; Kondo, T. Studies on Microcapsules. V. Preparation of Polyamide Microcapsules Containing Aqueous Protein Solution. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **1970**, *18* (4), 803–809.
- [4] Ruus, H. Method of encapsulation. US 3,429,827, 23 November, 1969
- [5] Chen, L.; Prud'Homme, R. K. Microencapsulation of Aqueous Compounds Using Hexamethylenediamine and Trimesoyl Chloride: Monodisperse Capsule Formation and Reaction Conditions on Membrane Properties. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2014**, *53* (20), 8484–8492.
- [6] Danicher, L.; Gramain, P.; Frère, Y.; Le Calvé, A. Model Capsules: I. Synthesis, Characteristics and Properties of Millimetric Polyamide Capsules. *React. Funct. Polym.* **1999**, *42* (1), 111–125.
- [7] McMurry, J. *Organic chemistry. Ch.21.4 Chemistry of Acid Halides*. CENGAGE Learning US, 2015, 1–6.
- [8] Smets, J; Fernandez, S; Daryl, S; Laurence, T; August, J; Edgar, W; A.Frederick, A; Gamberini, M; Tylkowski, B. Encapsulates. US20130039962 A1, 14 February, 2012
- [9] Persico, P.; Carfagna, C.; Danicher, L.; Frere, Y. Polyamide Microcapsules Containing Jojoba Oil Prepared by Inter-Facial Polymerization. *J. Microencapsul.* **2005**, *22* (5), 471–486.
- [10] Zhang, Y.; Wang, R.; Yi, S.; Setiawan, L.; Hu, X.; Fane, A. G. Novel Chemical Surface Modification to Enhance Hydrophobicity of Polyamide-Imide (PAI) Hollow Fiber Membranes. *J. Memb. Sci.* **2011**, *380* (1–2), 241–250.
- [11] Dutczak, S. M.; Cuperus, F. P.; Wessling, M.; Stamatialis, D. F. New Crosslinking Method of Polyamide-Imide Membranes for Potential Application in Harsh Polar Aprotic Solvents. *Sep. Purif. Technol.* **2013**, *102*, 142–146.

- [12] Zhang, Y.; Rochefort, D. Characterisation and Applications of Microcapsules Obtained by Interfacial Polycondensation. *J. Microencapsul.* **2012**, *29* (7), 636–649.
- [13] Louis, D.; Yves, F.; Anne, L. C. Synthesis by Interfacial Polycondensation of Polyamide Capsules with Various Sizes. Characteristics and Properties. *Macromol. Symp.* **2000**, *151* (1), 387–392.
- [14] Janssen, L. J. J. M.; te Nijenhuis, K. Encapsulation by Interfacial Polycondensation. I. The Capsule Production and a Model for Wall Growth. *J. Memb. Sci.* **1992**, *65* (1–2), 59–68.
- [15] García, J. M.; García, F. C.; Serna, F.; de la Peña, J. L. High-Performance Aromatic Polyamides. *Prog. Polym. Sci.* **2010**, *35* (5), 623–686.
- [16] Rosa, N.; Martins, G. V.; Bastos, M. M. S. M.; Gois, J. R.; Coelho, J. F. J.; Marques, J.; Tavares, C. J.; Magalhães, F. D. Preparation of Robust Polyamide Microcapsules by Interfacial Polycondensation of P-Phenylenediamine and Sebacoyl Chloride and Plasticization with Oleic Acid. *J. Microencapsul.* **2015**, *32* (4), 349–357.

Capítulo 5.

Encapsulación por Coacervación Compleja

5.1. Introducción

Tras la encapsulación de fragancias mediante dos procesos químicos, a continuación se detalla el trabajo realizado mediante una técnica que no implicara sin reacciones químicas. Como bien se explicó en la introducción, se trabajó en el desarrollo de una técnica libre de formaldehído y que a su vez usara polímeros biocompatibles de alta disponibilidad comercial. La técnica escogida fue la coacervación compleja. La selección de esta técnica para la encapsulación de las formulaciones desarrolladas por CARINSA fue por los siguientes motivos:

- Técnica apta para encapsulación de núcleos hidrofóbicos, como por ejemplo fragancias.
- No implica reacciones químicas y por lo tanto no alteraría las formulaciones.
- Las condiciones de trabajo son suaves en cuanto a pH y temperatura.
- Los materiales con los que se trabaja son seguros para su manipulación y aplicación final.
- Las suspensiones obtenidas no requieren necesariamente una purificación.
- Alta biodegradabilidad y biocompatibilidad de los materiales.
- Precios competitivos de los materiales.

A continuación se detallan los aspectos más importantes referentes a los materiales encapsulantes y la interacción necesaria para permitir la coacervación que luego será adaptada a un proceso de encapsulación.

5.1.1. Biopolímeros seleccionados para la encapsulación

Existen muchos sistemas de coacervación compleja con diferentes polímeros que ya han sido investigados a día de hoy [1], pero por disponibilidad de las materias primas y por el precio de éstas, el sistema escogido para el desarrollo de este tipo de cápsulas fue el de gelatina y góma arábica.

➤ *Gelatina*

La gelatina (GEL) es un biopolímero formado en mayor parte por cadenas proteicas (85-92%) fruto de la hidrólisis del colágeno. Inicialmente las cadenas proteicas del colágeno se encuentran estructuradas en forma de triple hélice y estas se pueden fragmentar con distintos tratamientos en cadenas de un menor tamaño molecular como la gelatina o el hidrosilato de colágeno (**Figura 5.1**).

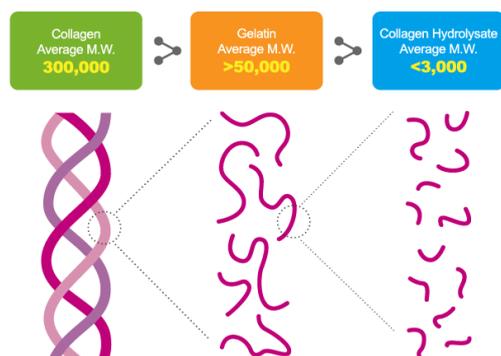


Figura 5.1. Esquema de los diferentes productos obtenidos de la hidrólisis del colágeno según el peso molecular [2].

La mayoría de la gelatina se extrae de la piel del cerdo (46%), de la piel de vacuno (29.4%) o de las carcasas de éstos (23.1%) mediante tratamientos ácidos o alcalinos. Otra gelatina importante a mencionar es la gelatina de pez, por su bajo precio y sus parecidas prestaciones a las otras variedades. El principal uso de la gelatina, además de la alimentación, es en la industria farmacéutica como recubrimiento de los medicamentos en las cápsulas para ingesta oral.

Los aminoácidos constituyentes de las cadenas proteicas pueden ser negativos, positivos, zwitteriónicos o neutros dependiendo de los grupos funcionales que contengan y de su valor de pK_a ($pK_a = -\log K_a$, $K_a =$ constante de disociación ácida). Así pues, dependiendo del pH, la gelatina tiene una carga global variante, y por eso se le considera un polielectrolito cuando se encuentra disuelta en agua. Un ejemplo de los porcentajes de aminoácidos presentes en la gelatina de cerdo viene descrito en la **Figura 5.2.**

| Amino acid | Percentage | Amino acid | Percentage |
|----------------|------------|---------------|------------|
| Glycine | 32.20 | Threonine | 1.80 |
| Proline | 13.10 | Phenylalanine | 1.38 |
| Alanine | 11.05 | Isoleucine | 1.02 |
| Hydroxyproline | 9.80 | Hydroxylysine | 0.75 |
| Glutamic acid | 7.10 | Asparagine | 0.60 |
| Arginine | 4.96 | Histidine | 0.45 |
| Aspartic acid | 4.42 | Tyrosine | 0.35 |
| Serine | 3.40 | Methionine | 0.32 |
| Lysine | 2.65 | Tryptophan | — |
| Leucine | 2.35 | Cysteine | — |
| Valine | 1.90 | | |

Figura 5.2. Lista de aminoácidos presentes en la gelatina de cerdo y su proporción [3].

Las gelatinas se clasifican en A o B, dependiendo del tipo de hidrólisis realizada en la manufactura (ácida o básica), y en la propiedad de *Bloom*. El *Bloom* (término tomado del apellido del inventor Oscar

T.Bloom [4]) es una medida derivada de un test en el que se determina la resistencia mecánica de los geles. A mayor *Bloom*, mayor resistencia y mayor peso molecular de las cadenas proteicas.

➤ *Goma arábica*

El otro biopolímero implicado en este sistema de coacervación compleja es la goma arábica o goma acacia (GA). Este compuesto es el exudado arbóreo más conocido y más antiguo de la historia ya que desde hace 5.000 años se empezó a comercializar y a usar como adhesivo para los pigmentos en los papiros. Con el paso de los años la goma fue llegando a Europa a través de los puertos de Arabia y por eso el nombre usado a día de hoy.

De todas las especies de acacia que existen (más de 1000), sólo dos están dirigidas a la producción: la *Acacia Senegal*, de la cual se obtiene una goma dura, y la *Acacia Seyal* que produce una más frágil y de menor calidad [5].

Durante muchos años Sudan ha sido el principal productor y exportador de goma arábica, llegando a abarcar el 80% del mercado. Sin embargo, las grandes sequías acontecidas en las últimas décadas han diversificado el mercado, siendo Nigeria y Chad sus actuales competidores (Figura 5.3).

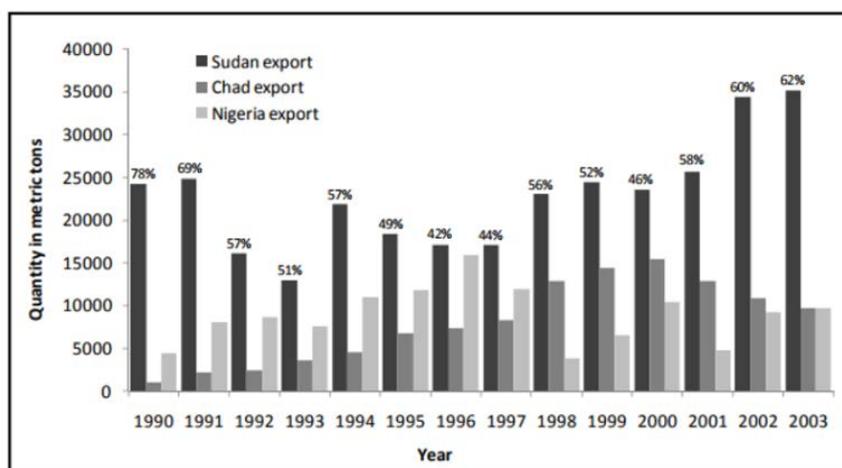


Figura 5.3. Exportaciones de goma arábica de los principales productores [6].

Europa y Estados Unidos son los mercados más importantes, ya que importan alrededor de 40 kTn/año, mientras Japón, el consumidor asiático más importante, importa unas 2kTn/año. Su uso está principalmente dedicado a la alimentación y a la industria farmacéutica gracias a sus propiedades de emulsificación, adhesión, espesante o de estabilización entre otros.

La goma arábica es un biopolímero formado por un polisacárido y una proteína. La mayor parte del biopolímero consta de 6 tipos diferentes de carbohidratos y bloques proteicos de arabinolactano (Figura 5.4.a)

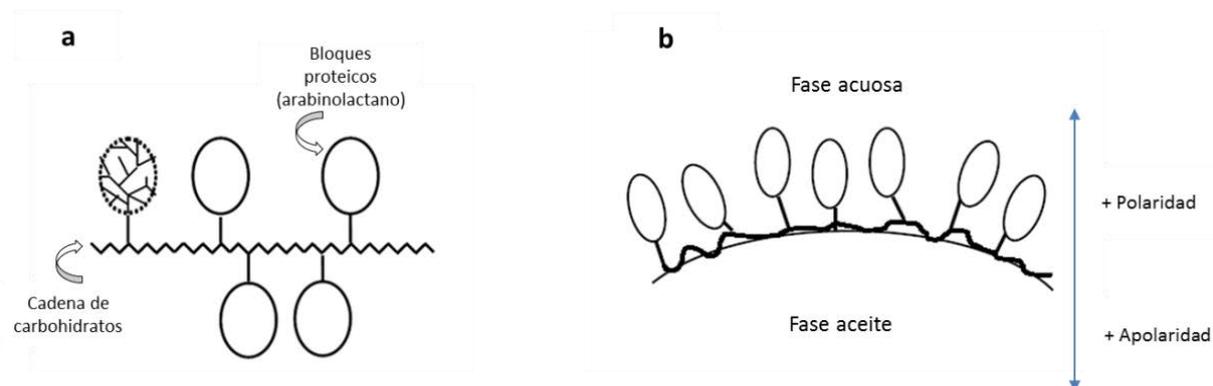


Figura 5.4. a) Representación gráfica de las partes proteicas adheridas a la cadena de carbohidratos en la goma arábica; b) representación gráfica de la orientación de las partes en una interfase agua/aceite [7].

La combinación de estas dos estructuras le confieren a la goma arábica una gran capacidad estabilizadora de emulsiones. Las cadenas de polisacáridos se sitúan en la interfase aceite-agua, mientras que los bloques de proteína se orientan hacia la fase acuosa. Esto es debido a las cargas negativas generadas en un amplio rango de pH, que proporcionan capacidad emulsionante a las gotas de la fase dispersa (Figura 5.4.b).

5.1.2. Interacción goma arábica – gelatina

La goma arábica y la gelatina son solubles en medios acuosos debido a la polaridad de sus componentes. En algunos casos (tipo de polímero, concentración, componentes, etc.) puede ser necesario calentar para su completa disolución pero el resultado final es la obtención dos soluciones homogéneas (Figura 5.5)

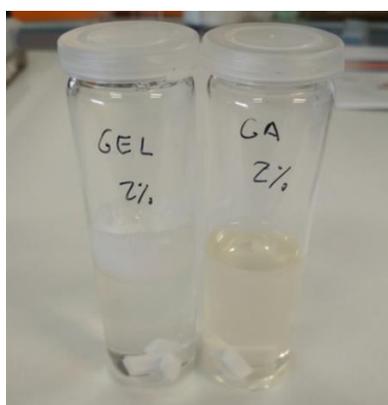


Figura 5.5. Soluciones al 2% en peso de gelatina y goma arábica.

Como se ha explicado en la introducción, en la coacervación compleja, los complejos obtenidos por la interacción de los dos polímeros dan lugar a una nueva fase dispersa, los coacervados. La interacción responsable de la generación de esta nueva fase son las fuerzas electrostáticas de los dos polímeros, que están estrechamente ligadas con el pH de la disolución.

Estos polímeros en solución son considerados polielectrolitos, y su variación de carga viene determinada por su punto isoeléctrico (P.I.), siendo éste el pH donde la molécula tiene una carga igual a 0 (Tabla 5.1).

| Biopolímero | Punto isoeléctrico (P.I.) |
|--------------|---------------------------|
| Goma arábica | 1.5-1.8 |
| Gelatina | 4.5(Tipo B)-8 (Tipo A) |

Tabla 5.1. Puntos isoeléctricos de la goma arábica y los distintos tipos de gelatina.

El punto isoeléctrico de la gelatina depende del tipo de hidrólisis aplicada o del peso molecular. Por debajo del P.E. (pH más bajos) la carga de la molécula es positiva mientras que por encima del P.E. (pH más altos) es negativa. En el caso de la goma arábica, ésta tiene una carga negativa en prácticamente todos los grados de pH debido a que su punto isoeléctrico es muy bajo. Así, para que interaccionen, se ha de bajar el pH < P.I. de la gelatina tal y como se explica a continuación.

5.1.3. Factores que afectan a la separación de fases (coacervación)

- Ajuste del pH para la interacción óptima

Teniendo en cuenta las variaciones de carga de ambos polímeros, lo que se busca es la interacción de la goma arábica con carga negativa y la gelatina con carga positiva. En la Figura 5.6 se muestra la variación de carga de los diferentes polielectrolitos en función del pH y de la mezcla de ambos.

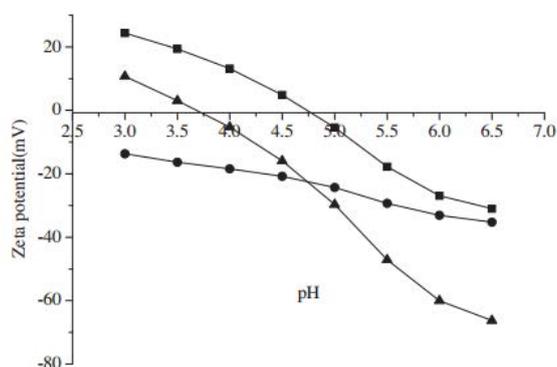


Figura 5.6. Medidas de potencial-Z en función del pH de soluciones de goma arábica (●), gelatina tipo A (■) y la mezcla (▲) [8].

Como se puede apreciar, la goma arábica (●) se presenta como un polielectrolito negativo en todo el rango de pH expuesto en el gráfico, llegando a incrementar su carga negativa según aumenta el pH. Por otro lado, la gelatina de tipo A (*), presenta un comportamiento más variable. A pH<4.7 predominan las cargas positivas que provienen sobretodo de aminas terminales protonadas.

Viendo estos dos comportamientos de cargas, se puede apreciar que hay un rango en que ambos biopolímeros se encuentran en una situación de cargas opuestas (pH 3-4.7). En todo este rango, la coacervación ocurre de manera prácticamente espontánea pero la eficiencia es máxima en el pH óptimo que es el punto de máxima compensación de carga, en este caso alrededor de pH 4. A nivel macroscópico, esta separación de fases se observa mediante un aumento de la turbidez causada por la formación de coacervados, que no son solubles en el agua, y que es máxima en el punto de máxima interacción. No obstante, además del pH, otros factores también pueden afectar a la eficiencia de este proceso.

➤ *Proporción entre polímeros*

Dado que los coacervados generan opacidad en la suspensión acuosa a causa de la dispersión de luz, la eficiencia de su formación se puede determinar mediante medidas de absorbancia por UV-VIS. Una absorbancia mayor indica una mayor concentración de coacervado, lo cual está relacionado a una mayor eficiencia de interacción entre GEL y GA. Como se puede apreciar en el gráfico de la **Figura 5.7**, la relación óptima para la generación de coacervados es una proporción 1:1 a pH=4.1.

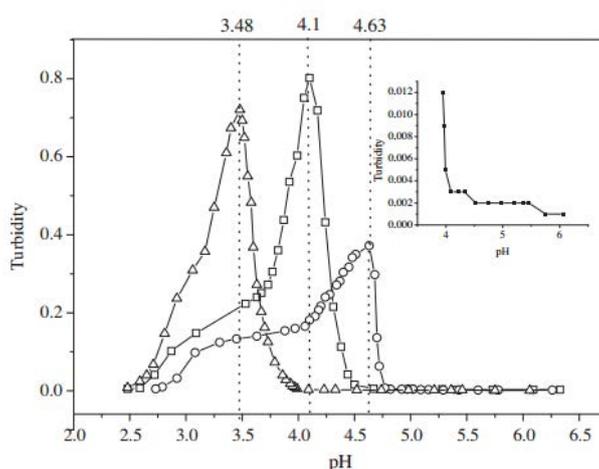


Figura 5.7. Efecto de la proporción de los polímeros (GEL/GA) y del pH en la turbidez observada (Relación de polímeros Δ=1:2, □ = 1:1, ○ = 2:1; λ=600nm) [8] .

No obstante, y dado que el punto isoeléctrico varía según el origen del polímero, estos valores son orientativos, siendo recomendable realizar estos experimentos previos para cada caso particular.

➤ *Interferencias de iones en la formación de coacervados*

Otro factor muy importante a tener en cuenta es la presencia de iones en agua ya que éstos pueden interferir en las interacciones electrostáticas (débiles) entre polímeros.

Los iones pueden complejarse con los grupos funcionales cargados de los polímeros neutralizándolos parcial o completamente. Los iones de sales en solución son de un tamaño mucho menor que las cadenas de polímero por lo que éstos pueden adentrarse fácilmente en las estructuras poliméricas (**Figura 5.8**). Se ha estudiado que la adición de iones, sobretodo sales (por ejemplo NaCl), han logrado disminuir la turbidez de soluciones de coacervados de manera drástica según se incrementa la cantidad de sal añadida [9].

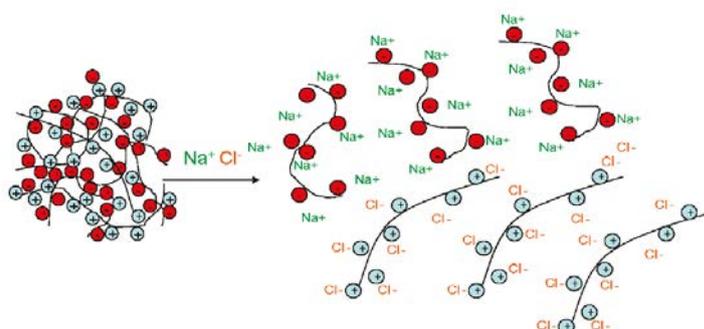


Figura 5.8. Interferencia de los iones del cloruro sódico con las cargas de los biopolímeros en el coacervado evitando así la interacción electrostática entre ambos [9].

En conclusión, tras describir los detalles respecto al proceso de coacervación y las diferentes variables a tener en cuenta, queda patente que es un proceso muy sensible a las condiciones experimentales, pero que si se cumplen determinados requisitos, se puede producir de manera satisfactoria la separación de fases (formación de coacervados) con una alta eficiencia.

A modo de resumen, los parámetros más relevantes a tener en cuenta para lograr una mayor eficiencia en la generación de coacervados son:

- Tipo de biopolímero, peso molecular y método de obtención
- Concentración total de biopolímero
- Temperatura
- Fuerza iónica del agua
- pH
- Proporción de mezcla de los polímeros
- Densidad de cargas de los polímeros

5.2. Encapsulación por coacervación compleja

La técnica de encapsulación por coacervación compleja consta de una serie de etapas bien definidas. Éstas se muestran en el esquema de la **Figura 5.9**.



Figura 5.9. Etapas del proceso de encapsulación por coacervación compleja.

5.2.1. Disolución de los polímeros

El primer paso de toda síntesis de cápsulas con este sistema es la disolución de ambos polímeros en agua. Por supuesto, estos se deben preparar por separado ya que no pueden entrar en contacto hasta el momento de la coacervación.

Como la presencia de iones en solución es contraproducente para el sistema, inicialmente se escogió agua desionizada o MilliQ®, que está exenta de iones, para todos los experimentos. De todas maneras, dado que desde un punto de vista industrial esta agua tiene un tiempo de producción y un coste elevado, se verificó durante la tesis que con agua destilada el proceso ocurre con una eficiencia similar.

La gelatina (granulado blanquecino) en contacto con el agua se hidrata rápidamente. A pesar de este efecto de hinchamiento (o *'swelling'* en inglés), para disolverse se tiene que aplicar calor (>40°C) mientras se agita la disolución correspondiente. A esta temperatura, las proteínas se desnaturalizan y las cadenas con sus respectivos grupos funcionales dejan de estar empaquetadas y se disuelven en el medio.

La goma arábiga, un polvo refinado con ligero olor a ácido acético, se puede disolver a temperatura ambiente en un amplio rango de concentraciones (hasta 45% en peso). El color obtenido en las disoluciones es ligeramente amarillento debido a la presencia de taninos. Aunque se consigan

disoluciones homogéneas a temperatura ambiente, antes de la preparación de la emulsión es necesario calentar esta disolución para evitar gradientes de temperaturas al mezclarla con la de gelatina ($\geq 50^{\circ}\text{C}$). Además, esto asegura la desnaturalización de los polisacáridos y proteínas que pierden su empaquetamiento y exponen las cargas electrostáticas haciendo posible la interacción de las cadenas.

5.2.2. Emulsión

En esta etapa la fase dispersa (compuesta por un líquido no miscible en agua como aceite, fragancia, mezclas, etc.) es emulsionada en una de las fases acuosas, concretamente en la de gelatina por su mayor capacidad estabilizante, permitiendo evitar el uso de otros tensioactivos. De hecho, más adelante se mostrará como algunos tensioactivos iónicos, debido a su carga, interfieren con los biopolímeros y afectan negativamente a la emulsión.

Para emulsionar la fase hidrófoba en agua es necesaria la aplicación de energía, ya sea por agitación mecánica, homogenización por cizalla o ultrasonidos. Cuanta más energía, las gotas tienden a ser de menor tamaño, llegando a un estado estacionario limitado por varios los factores de la mezcla (viscosidad, naturaleza del núcleo, concentración de polímeros...). Para la mayoría de las emulsificaciones aceite en agua (O/W) se aplicó la homogenización por cizalla, mediante el uso de un homogenizador Ultra-Turrax® que permite lograr tamaños de gota más adecuados para el propósito del proyecto ($< 25\ \mu\text{m}$) (**Figura 5.10**).

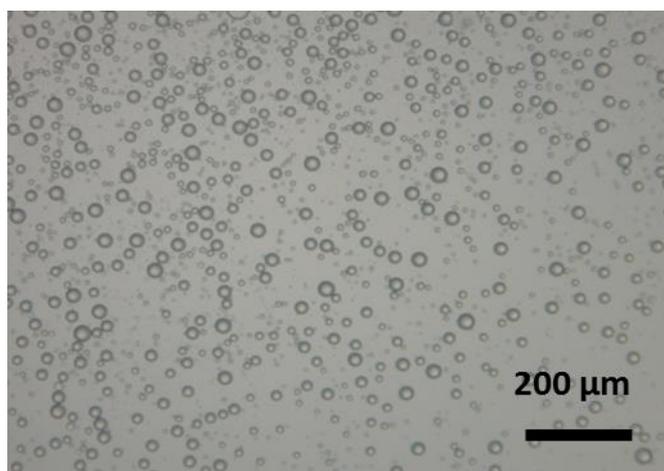


Figura 5.10. Ejemplo de emulsión O/W realizada en la disolución de gelatina (Ultra-Turrax®T25, 5.000 rpm) a través de microscopio óptico.

Es importante tener en cuenta que en este caso la emulsión se realiza en caliente, para asegurar que los polímeros permanezcan disueltos aunque por otro lado existe el riesgo de volatilización de algunos componentes de las fragancias.

5.2.3. Proceso de coacervación

Una vez preparada la emulsión a alta temperatura se procede a inducir la coacervación. Para ello, la solución acuosa de GA se añade a la emulsión manteniendo la temperatura (50 °C) y se dejan mezclar durante 5-15 min. Cuando todo está homogeneizado, se ajusta hasta el pH óptimo. La formación de coacervados (GEL/GA) produce un aumento de la viscosidad debido a la mayor densidad de la nueva fase. Si se observa esta nueva fase en movimiento (dentro de la fase acuosa) a través de microscopio óptico se presenta como un material muy lábil debido a su alto grado de hidratación y su baja rigidez. En la **Figura 5.11** se muestran, por ejemplo, los coacervados formados en ausencia de una fase dispersa, es decir, la simple mezcla de las soluciones de los biopolímeros.

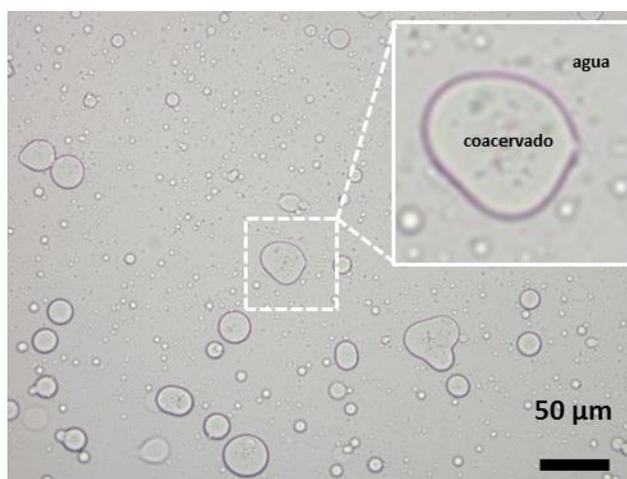


Figura 5.11. Imagen de microscopio óptico de los coacervados generados en medio acuoso (GEL/GA 1:1, conc = 1% en peso).

5.2.4. Gelificación de la corteza

Los coacervados migran hacia la interfase de las gotas de fase aceite dispersas formando una cobertura completa pero a su vez lábil y permeable. Al detener la agitación, se observa en pocos segundos coalescencia de las gotas y separación de fases a temperaturas superiores al proceso de gelificación (**Figura 5.12.a.1, a.2**), mientras que a temperaturas por debajo del punto de gelificación se obtiene una suspensión estable (**Figura 5.12.b.1, b.2**).

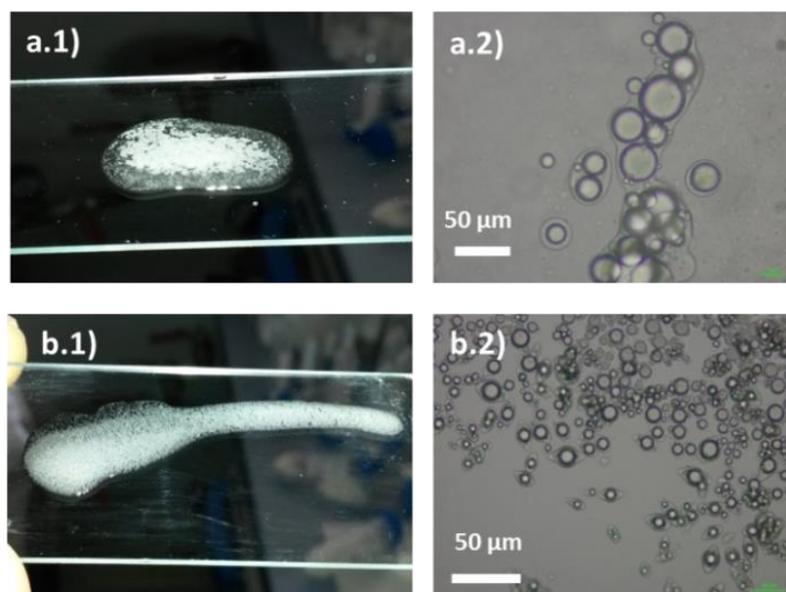


Figura 5.12. a.1, a.2) Coalescencia de las gotas de aceite y los coacervados previa al proceso de gelificación y el aspecto microscópico de la suspensión; b.1, b.2) suspensión estable de microcápsulas tras el proceso de gelificación y aspecto microscópico de la misma.

Esto es debido a que la corteza sólo mejora tras la gelificación, obteniéndose una cobertura más dura y evitándose la agregación. En el proceso de gelificación, la suspensión se enfría lentamente hasta 20-25°C. A esta temperatura, las cadenas proteicas se reestructuran y ordenan proporcionando un carácter sólido al material. En general, se ha observado que para producir un mayor endurecimiento de las cortezas es preferible alcanzar temperaturas cercanas a los 5°C. Por otro lado, dada la hidrofiliidad de los polímeros, mucha agua queda atrapada en el polímero tras la gelificación.

5.2.5. Endurecimiento del polímero de corteza

A pesar de que una primera corteza ya se genera mediante la gelificación, es bien conocido que estas cápsulas tienen pobres propiedades mecánicas ya que el agua atrapada en las cadenas poliméricas actúa de plastificante. Además, la falta de entrecruzamiento entre cadenas hace las cápsulas más permeables lo que puede representar un problema para encapsular compuestos volátiles. Por otro lado, estos materiales de corteza son sensibles al entorno como son pH muy ácidos/básicos, presencia de importante de sales, temperaturas altas, o sustancias iónicas, lo cual podría ser un problema al introducir las cápsulas en una formulación de detergente o suavizante.

Por todo esto, en algunos casos es necesario realizar un tratamiento para endurecer la corteza mediante entrecruzamiento o 'cross-linking'. El 'cross-linking' es un proceso en el cual se induce la unión entre cadenas de polímeros con la consecuente mejora de las propiedades mecánicas.

La presencia de muchos grupos funcionales provenientes de las proteínas y polisacáridos (aminas, carboxilos o hidroxilos) permite realizar entrecruzamiento entre las cadenas de los biopolímeros. Para esto es necesario el uso de un agente de entrecruzamiento que actúe con mecanismos distintos según la funcionalidad química que tengan. Todos ellos deben tener 2 o más funcionalidades reactivas para garantizar la conexión entre dos o más cadenas poliméricas. Los agentes más utilizados para el caso de este tipo de biopolímeros son:

➤ *Glutaraldehído (1,4-pentadional)*

La presencia de dos grupos aldehídos hace que esta molécula sea muy reactiva frente a los nucleófilos como los grupos amina e hidroxilo presentes en la goma arábiga y la gelatina. Por otro lado, la bifuncionalidad permite enlazar 2 especies reactivas presentes en la misma o en diferentes cadenas poliméricas, garantizando el entrecruzamiento.

El glutaraldehído reacciona mediante la formación de enlaces covalentes entre los aldehídos y las aminas dando lugar a bases de Schiff y reacciones de Michael. En la **Figura 5.13** se muestran diferentes tipos de reacciones que pueden ocurrir entre los grupos amina del colágeno y el glutaraldehído

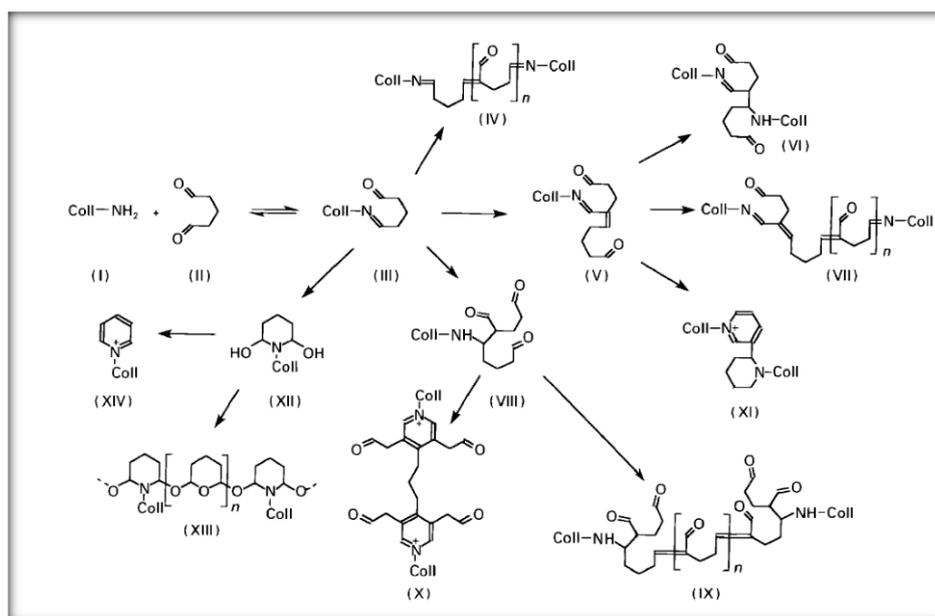


Figura 5.13. Ejemplo de reacciones de las aminas del colágeno con glutaraldehído [10].

El principal inconveniente del uso del glutaraldehído para en el entrecruzamiento es su toxicidad. Por esta razón a lo largo de este proyecto se ha intentado evitar el uso de este agente y se ha explorado procesos de entrecruzamiento por otras vías con agentes no tóxicos.

➤ *Transglutaminasa (TGasa)*

La transglutaminasa es una enzima (proteína) con la capacidad de generar enlaces covalentes entre dos aminas terminales dando lugar a enlaces peptídicos (**Figura 5.14**).

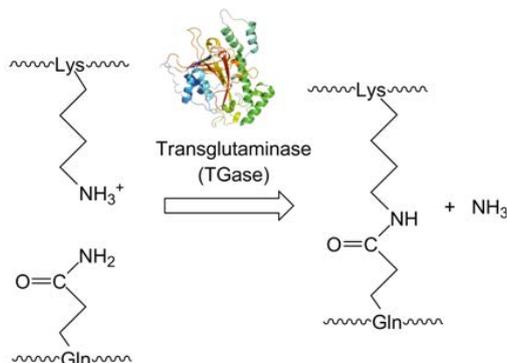


Figura 5.14. Enlace peptídico generado mediante transglutaminasa [11].

Este es un ejemplo de un compuesto nada tóxico y que de hecho, su variante comercial se usa en la industria cárnica como pegamento entre piezas de carne. Lamentablemente, en su forma pura es un producto de un alto precio y se descartó su empleo para este proyecto.

➤ *Compuestos polifenólicos*

Entre los varios compuestos disponibles de esta familia se encuentra el ácido tánico, una molécula de morfología dendrítica compuesta por una unidad de glucosa central y ramificada con polifenoles (**Figura 5.15**). Éste se encuentra en las cortezas de los árboles, el café o en la uva y uno de sus usos es para el curtido de pieles, donde los grupos hidroxilos terminales del ácido reaccionan con las aminas libres de las pieles a tratar.

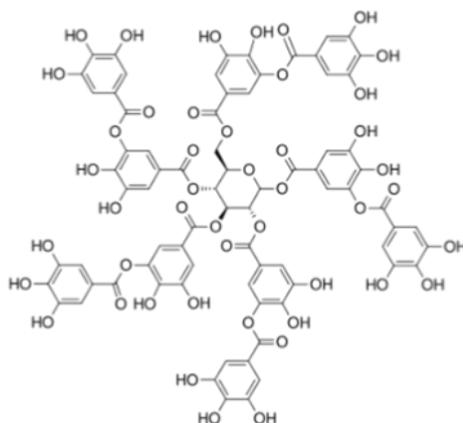


Figura 5.15. Estructura química del ácido tánico.

Dependiendo del pH en el que se realice la reacción de entrecruzamiento, las interacciones del ácido tánico con las proteínas serán diferentes. A un pH ácido lo que se produce es una interacción basada en puentes de hidrógeno, mientras que si se trabaja en medio básico, el ácido tánico produce quinonas que pueden condensar entre ellas o con aminas de las proteínas [12].

➤ *Tripolifosfato de Sodio (NaTPP)*

El tripolifosfato de sodio (NaTPP) es una sal penta-aniónica que genera entrecruzamiento de tipo iónico (**Figura 5.16.a**). Las tres unidades de fosfatos forman interacciones electroestáticas con las aminas protonadas, sobretodo terminales.

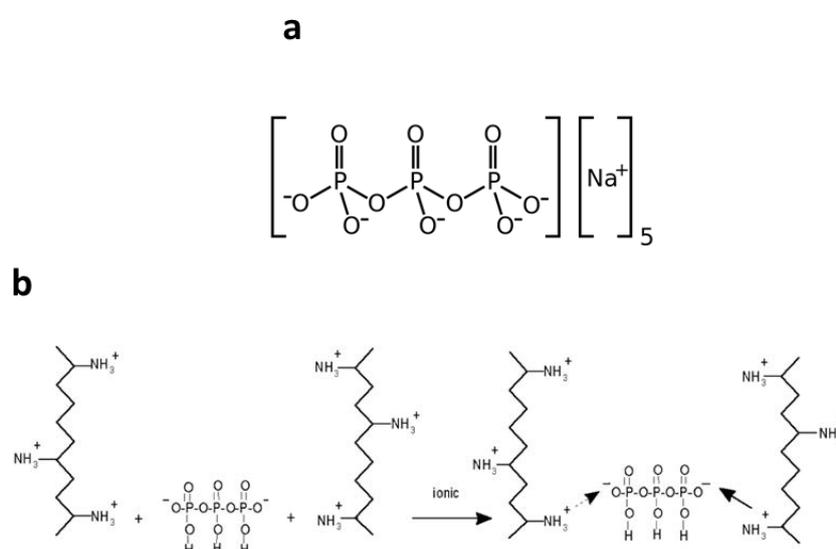


Figura 5.16. a) Estructura molecular del tripolifosfato de sodio (NaTPP); b) reacción de entrecruzamiento iónico entre los grupos amina cargados y el tripolifosfato de sodio [13].

Este tipo de entrecruzamiento es muy común en los procesos de endurecimiento del quitosano. Cada unidad de monosacárido del quitosano contiene una amina que en medio ácido se encuentra protonada y, por lo tanto, interacciona con el NaTPP (**Figura 5.16.b**). Además, NaTPP es un producto altamente disponible en el mercado, siendo la detergencia y la cosmética el mercado de más uso.

➤ *Genipina*

La genipina es una aglicona presente en el extracto de la gardenia y que recientemente ya se puede producir mediante bioreactores o de manera sintética (**Figura 5.17.a**). Es un compuesto con baja toxicidad y además es un excelente endurecedor de cadenas proteicas, del colágeno o el quitosano entre otros. La actividad de la genipina se lleva a cabo usualmente en medio básico en una reacción

parecida a la del glutaraldehído pero con la diferencia que la toxicidad es prácticamente nula (**Figura 5.17.b**). Este tipo de entrecruzamiento también se valoró como una opción interesante, pero debido al alto precio de la genipina, se descartó por el momento.

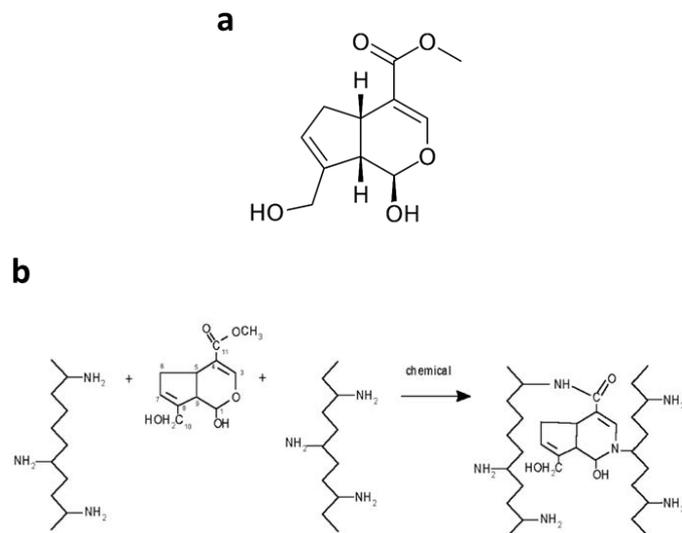


Figura 5.17. a) Estructura molecular de la genipina; b) reacción de entrecruzamiento covalente grupos amino y la genipina [13].

5.3. Encapsulación de un aceite monocomponente

El primer sistema a encapsular mediante coacervación compleja fue el Miglyol®812, siguiendo la metodología establecida para las anteriores técnicas (**apartado 1.6**). La coacervación compleja es una técnica muy utilizada en encapsulación de aceites de diferente naturaleza por lo que el uso del Miglyol no debería presentar incompatibilidad. Además, las previas caracterizaciones de este aceite facilitarían la determinación de los parámetros cuantitativos con mayor precisión.

5.3.1. Optimización de las condiciones para encapsulación de Miglyol

Como bien se explicó en el apartado anterior, la síntesis consta de varias etapas donde suceden cambios en las propiedades físico-químicas. Esto, unido a los distintos materiales y las distintas cantidades/proporciones a utilizar arroja una gran combinación de condiciones para la encapsulación. A continuación en la **Tabla 5.2** se muestran todas las variables y los rangos de trabajo en los que se realizaron encapsulaciones de Miglyol para su optimización.

| Variable | Rangos de valores escala laboratorio (50 g) |
|--|---|
| Solución gelatina (GEL _{sol}) | 25 g (0.25-1%p/p) Milli Q |
| Tipos de gelatina | Gelatina A y B y diferentes grados de Bloom |
| Cantidad de gelatina (GEL) | 0.1 - 0.25 g |
| Solución goma arábica (GA _{sol}) | 25 g (0.25 - 1%p/p) MilliQ® |
| Cantidad de goma arábica (GA) | 0.1 - 0.25 g |
| Tensioactivo añadido | Tween®80/PVA/CTAB/SDS |
| Temperatura | 50°C |
| pH | 4- 6 (ajustado con ácido acético 10%p/p) |
| Cantidad de Miglyol | 0.5 - 2 g |
| Método emulsificación | 3.000 rpm - 8.000 (Ultra-Turrax® T25) |
| Tiempo de emulsión | 5 - 15 min |
| Tiempo de coacervación | 5 - 15 min |
| Velocidad y rangos de enfriamiento | 50 - 25°C, 30 - 75 min 25 - 5°C, 30 - 75 min |
| Agitación mecánica | 300 - 1500 rpm |

Tabla 5.2. Rangos de trabajo en las síntesis iniciales de cápsulas de Miglyol por coacervación compleja.

Como se puede apreciar se realizaron muchas variaciones no solamente en parámetros físicos (temperatura, agitación, tiempo...) sino también en la cantidad de reactivos y la relación entre ellos. Los únicos parámetros que se mantuvieron constantes fueron la relación entre biopolímeros (GE/GA= 1:1), la temperatura de coacervación (50 °C) y la temperatura mínima de gelificación (5 °C). A continuación se muestran las modificaciones más relevantes para el proceso de encapsulación y su efecto sobre el producto final obtenido:

5.3.1.1. Efecto de la agitación/emulsión sobre la estructura de la microcápsula

El primer parámetro que se muestra es el efecto de la agitación (distintos métodos y distintas velocidades) ya que está estrechamente ligado a la morfología de las microcápsulas obtenidas, y por lo tanto afecta a la cantidad de fragancia que se podrá encapsular. Además, ligeros cambios en esta variable fueron más evidentes en el resultado final en comparación con otros.

Para la mayoría de los experimentos a pequeña escala, se dispuso de un sistema de agitación magnética con control de temperatura y el acoplamiento de un homogenizador Ultra-Turrax®T25 (Figura 5.18)

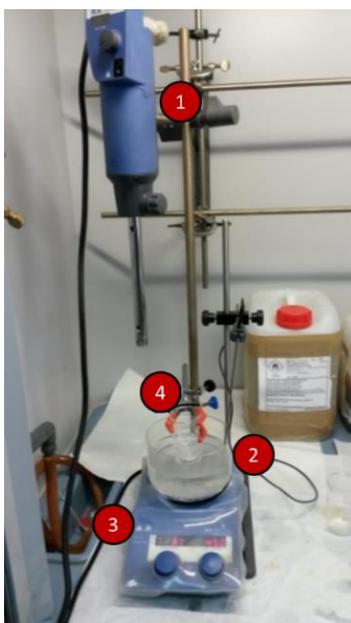


Figura 5.18. Ejemplo de montaje destinado a la síntesis de cápsulas de coacervación a escala laboratorio. **(1)** Homogenizador Ultra-Turrax®T25; **(2)** Baño de agua para control de temperatura; **(3)** Agitador magnético con control de temperatura; **(4)** Vaso de 100 mL para la síntesis de cápsulas por coacervación compleja provisto de imán agitador.

El seguimiento de las cápsulas obtenidas se realizó siempre con microscopía óptica y electrónica para determinar la morfología así como también el seguimiento de todas las etapas previas en la síntesis. Para diferenciar bien las fases por microscopía óptica se añadió (sobre todo en las síntesis iniciales) un

agente de contraste coloreado al aceite (Dispersed Red[®] o DR-13, un colorante comercial rojo perfectamente soluble en esta fase). En la **Figura 5.19** se muestra a una imagen de microscopio óptico de microcápsulas de Miglyol donde las gotas con el colorante se encuentran atrapadas por una corteza transparente y bien definida.

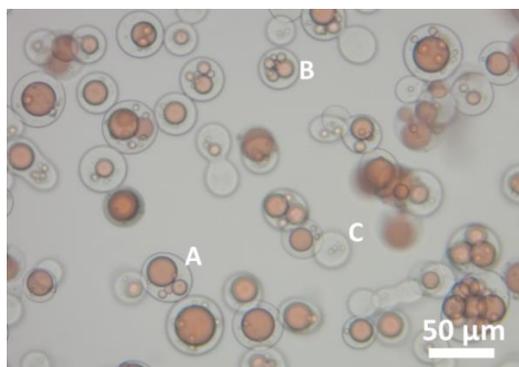


Figura 5.19. Imagen de microscopio óptico de cápsulas de Miglyol con DR-13 como colorante.

El recubrimiento de las gotas presenta un aspecto igual de transparente que el fondo de la imagen (medio acuoso). Además, se observan distintos tipos de morfologías obtenidas (**A, B, C**). Estas estructuras, manteniendo constantes las demás variables, se encuentran relacionadas directamente con el sistema de agitación y emulsificación aplicado. A continuación se detalla las características de estos tipos de morfología y como se encuentran relacionados con el sistema de agitación/emulsión.

(A) Cápsulas mononucleares con una alta carga

Se consideraron cápsulas mononucleares aquellas que contuvieran una gota de aceite que ocupara la parte central de la estructura y en una proporción en volumen mucho mayor que la corteza. En la mayoría de los casos difícilmente se pudo obtener una sola gota aislada encapsulada, sino que también se observó la adhesión de pequeñas gotas de aceite en los extremos de la cápsula (**Figura 5.20.a**)

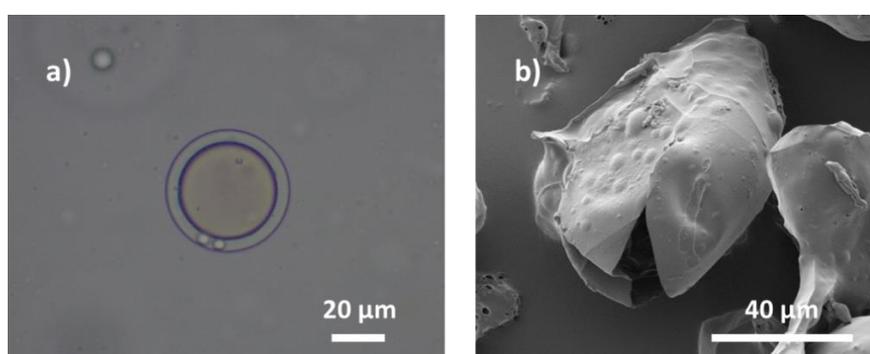


Figura 5.20. a) Imagen de microscopio óptico de una cápsula mononuclear; b) Imagen SEM de una cápsula mononuclear abierta tras su liofilización.

En este tipo de cápsulas el aceite encapsulado puede ocupar hasta un 90% del diámetro de la cápsula, pudiéndose comprobar claramente a través de microscopía electrónica de barrido (SEM) la fina corteza y el interior de la cápsula (**Figura 5.20.b**). Este tipo de cápsulas es el que asegura el máximo contenido de aceite encapsulado y es el de mayor interés para la encapsulación de fragancias.

La obtención de este tipo de microestructuras se dio principalmente cuando la emulsión se realizó a la mínima potencia del homogenizador (3.000 rpm) y los tamaños de gota se encontraban por encima de 50 μm .

Las variaciones en la agitación mecánica también mostraron un ligero cambio en la morfología de estas microcápsulas. A bajas revoluciones (300-400 rpm) la morfología de las microcápsulas era esférica (**Figura 5.21.a**), en cambio a velocidades de agitación mayores (750 rpm) las cápsulas presentaron una forma alargada de tipo de ovalada (**Figura 5.21.b**). La hipótesis de esta morfología que se planteó fue que al tratarse de un polímero lábil éste se estira alrededor de la gota con la fuerza de agitación. Llegado el momento de la gelificación (<25 °C) el polímero pasa de ser lábil a sólido, adoptando estas formas alargadas.

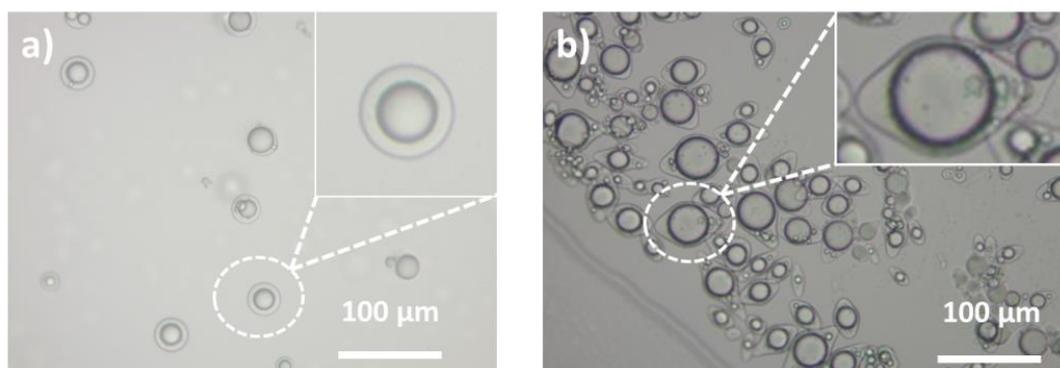


Figura 5.21. a) Imagen de microscopio óptico de cápsulas mononucleares con forma esférica al aplicar 300 rpm en la agitación magnética durante la gelificación b) imagen de microscopio óptico de cápsulas mononucleares con forma esférica al aplicar 750 rpm durante la gelificación.

Esta morfología ovalada no afectó a la correcta encapsulación del Miglyol y de hecho, las cápsulas mostraban una homogeneidad mayor en los tamaños cuando se trabajó a 750 rpm, posiblemente porque en estas condiciones se evitó la agregación entre cápsulas cuando aún el polímero era lábil.

(B) Cápsulas multinucleares con alta carga

Se consideraron cápsulas multinucleares aquellas en que el conjunto de gotas de aceite independientes fueron atrapadas por el material de corteza. Este tipo de estructuras se diferencian de un agregado de cápsulas porque hay una única corteza que atrapa las diferentes gotas (**Figura 5.22**)

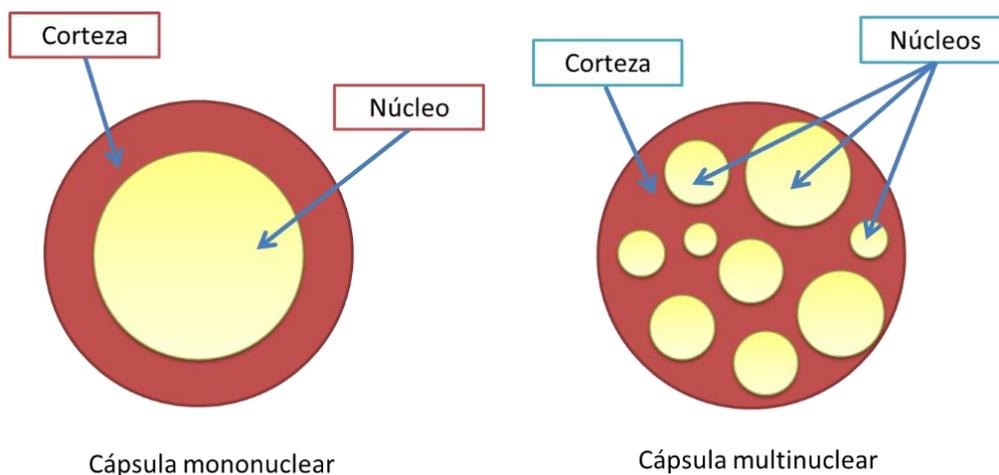


Figura 5.22. Representación gráfica de los dos tipos de estructuras obtenidos en la encapsulación de Miglyol por coacervación compleja.

La generación de este tipo de estructuras es muy común en síntesis de cápsulas por coacervación [13-16] y depende sobretodo de la velocidad emulsificación. En los casos donde la velocidad de emulsificación superó las 5.000 rpm la estructura multinuclear era la más común. En la mayoría de los casos a través de microscópico óptico fue difícil distinguir bien la estructura interna de las cápsulas debido a la superposición de gotas. En cambio, mediante SEM se pudieron apreciar las cavidades formadas por distintas gotas independientes de aceite (**Figura 5.23**).

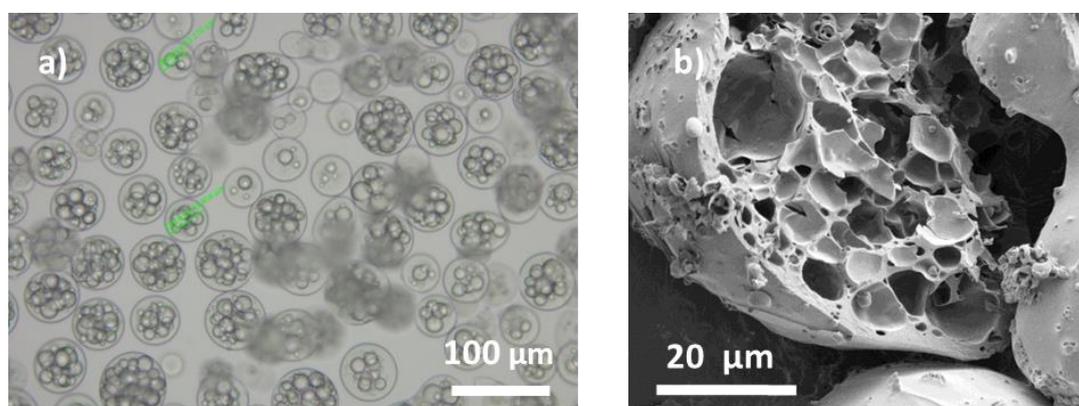


Figura 5.23. a) Imagen de óptico de cápsulas multinucleares (emulsión a 5.000 rpm; b) Imagen SEM mostrando las cavidades donde se localizan las gotas de aceite en cápsulas liofilizadas

Se realizaron distintas síntesis para determinar el tipo de morfología multinuclear obtenida según se variaban las velocidades de emulsificación y agitación. A diferencia de las cápsulas mononucleares, donde la morfología se veía alterada por una elongación de la corteza en una dirección, en las cápsulas multinucleares se obtuvieron morfologías más irregulares como se muestra en la **Figura 5.24**. En estas síntesis se lograron gotas de tamaño reducido (5-15 µm) al aplicar una velocidad de emulsificación de

10.000 rpm pero que finalmente conformaron unas estructuras mucho mayores (100-200 μm). Dependiendo de la velocidad de agitación aplicada durante todo el proceso de gelificación, se obtuvieron cambios en la morfología, siendo esféricas a bajas revoluciones e irregulares a altas revoluciones.

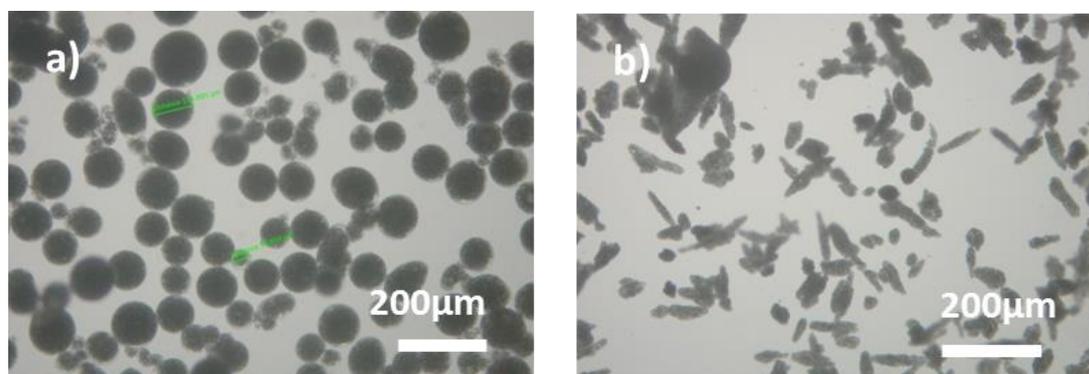


Figura 5.24. Imagen de microscopio óptico de cápsulas multinucleares de Miglyol obtenidas a diferentes velocidades de agitación. a) Síntesis a 300 rpm; b) Síntesis a 900 rpm

El interés principal sobre este tipo de microestructura fue la posibilidad de ofrecer una liberación gradual de las fragancias por la independencia de cada reservorio, lo que incrementaría la vida útil de la microcápsula. No obstante, esta posible investigación se realizaría tras la obtención de cápsulas mononucleares con una alta carga útil de fragancia.

(C) Cápsulas mono-/multinucleares con poca carga

Este tipo de cápsulas se obtuvo principalmente cuando el material de corteza se encontraba en una proporción mucho mayor que el núcleo a encapsular. La cantidad de gotas atrapadas es muy baja y suelen ser de tamaño muy reducido.

Este tipo de estructuras se obtuvieron en los primeros ensayos realizados, donde se usaron concentraciones de biopolímeros superiores al aceite (polímero/aceite=2:1). Las muestras liofilizadas y fragmentadas mostraron unas cápsulas con pequeñas cavidades correspondientes al aceite atrapado (**Figura 5.25**). Este tipo de cápsulas no aportaban ningún valor añadido a las microcápsulas ya que estaban constituidas mayoritariamente por polímero y la carga útil de fragancia encapsulada sería mínima

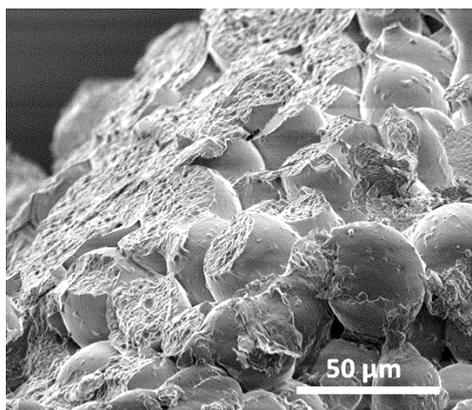


Figura 5.25. Imagen SEM de cápsulas multinucleares liofilizadas con bajo contenido de aceite

Por otro lado, teniendo en cuenta que este es un proceso que pretende ser escalable a nivel industrial, se comprobaron diferentes condiciones para simplificar lo máximo posible el proceso de encapsulación. Una de las etapas que requiere una pequeña parada es cuando se retira el sistema de agitación magnético para iniciar la emulsificación y posteriormente se vuelve a realizar el intercambio. Algunas de las opciones planteadas y que se probaron son:

- Uso de Ultra-Turrax® para todas las etapas de la síntesis (emulsificación y agitación)

Desafortunadamente con este método no se consiguieron microcápsulas. La hipótesis más probable es que las turbulencias provocadas por el homogeneizador destruyeran los coacervados durante la gelificación.

- Uso de agitación mecánica para todo el proceso de síntesis (emulsificación y agitación)

En este caso se obtuvieron microcápsulas pero presentaban una gran polidispersión de tamaños (10 – 200 μm) y las dimensiones fueron mucho mayores que en los anteriores experimentos (**Figura 5.26**). La ausencia de tensioactivos dificulta la estabilización de las gotas generadas y la agitación mecánica es incapaz de lograr emulsiones homogéneas.

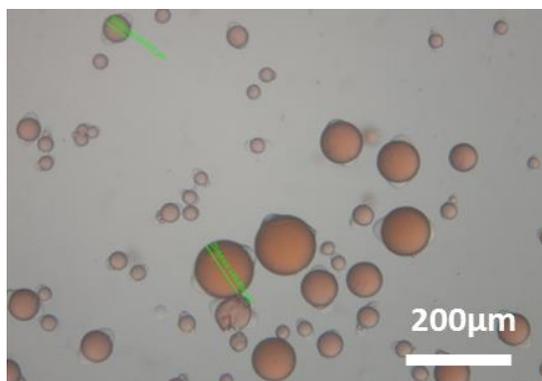


Figura 5.26. Imagen de microscopio óptico de cápsulas obtenidas usando un sistema de agitación magnético para la emulsificación y la agitación.

Tras este estudio se concluyó que las mejores condiciones para la obtención de cápsulas con características de interés para el proyecto (mononucleares y con baja polidispersión) eran:

- Velocidad y sistema para la emulsificación: 3.000 rpm (Ultra-Turrax®T25).
- Velocidad y sistema para la agitación: 750 rpm (agitación magnética).

5.3.1.2. Tiempos necesarios para las etapas de encapsulación

De igual manera que sucede para la encapsulación por polimerización *in-situ*, en la síntesis de microcápsulas por coacervación compleja, se requiere una serie de etapas que consumen periodos largos de tiempo mientras se trabaja a 50 °C. Esto afecta directamente a la volatilidad de la fragancia que se quiera encapsular por lo que se realizó un estudio para determinar si estos tiempos se podían reducir.

➤ *Tiempos de emulsificación*

Se buscó el tiempo mínimo para la obtención de una emulsión estable en la síntesis. Se consideró oportuno esta optimización para evitar evaporación de los componentes más volátiles cuando se aplica la energía del homogenizador.

➤ *Tiempos mínimos para las etapas de coacervación y gelificación*

También se exploró la posibilidad de recortar los tiempos de coacervación y la posterior gelificación de la corteza.

De este estudio se pudieron obtener cápsulas en tiempos más cortos sin que esto afectara a la estructura de la cápsula. El resultado de esta reducción de tiempos fue:

- Tiempo de emulsificación: 5 min.
- Tiempo de coacervación y gelificación: 15 min.
- Tiempos de gelificación: 30 min (50 °C a 25 °C) + 30 min (25 °C a 5°C).

5.3.1.3. Selección del tipo de gelatina para la encapsulación

Se realizaron síntesis con distintos tipos de gelatinas lográndose la encapsulación en todos los casos (**Figura 5.27**).

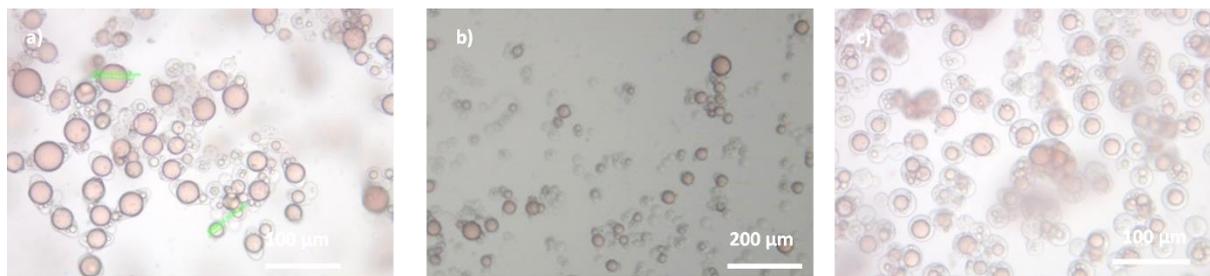


Figura 5.37. Imágenes de microscopio óptico de cápsulas de Miglyol con: a) gelatina B; b) gelatina A bloom 225; c) gelatina A bloom 300.

Finalmente se optó por:

- Gelatina de tipo A (Bloom 300).

Esta selección se realizó por las mejores propiedades mecánicas que debería ofrecer este tipo de gelatina y por el menor punto isoeléctrico (no requiere demasiado descenso de pH).

5.3.1.4. Ajuste del pH óptimo para la coacervación

Tras la elección de la gelatina adecuada para la encapsulación también se tuvo que determinar el valor de pH óptimo para la coacervación. Para ello, se realizó un estudio de turbidez por espectroscopia UV-VIS (**Figura 5.28**).

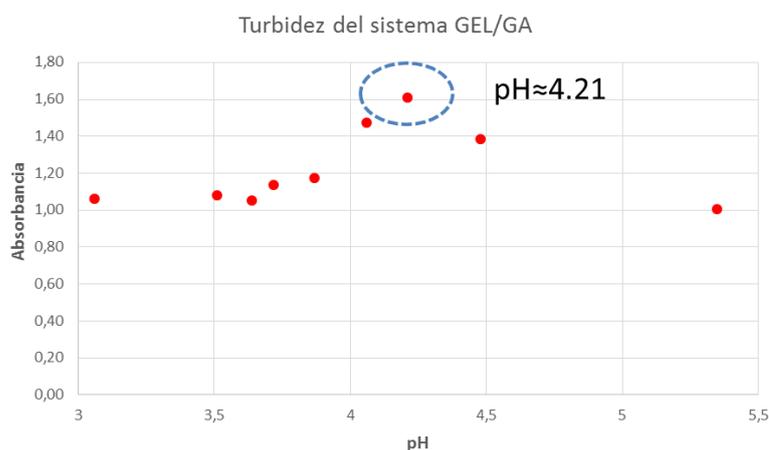


Figura 5.28. Absorbancia de un sistema Gel_{sol} : GA_{sol} (1% ambas soluciones) respecto al pH para la determinación del pH óptimo para la coacervación. $\lambda=600\text{ nm}$.

El pH óptimo para la generación de coacervatos en una relación GEL/GA 1:1 y concentración de biopolímeros de 1%:

- pH= 4.21 (relación GEL/GA= 1:1, concentración de biopolímeros de 1% p/p).

5.3.1.5. Orden de los reactivos y etapas de síntesis

Se realizaron distintas modificaciones en el orden de adición de biopolímeros, acidificación, emulsión, etc. Estas modificaciones demostraron que la eficiencia del proceso puede verse altamente afectada como por ejemplo se muestra en la **Figura 5.29**.

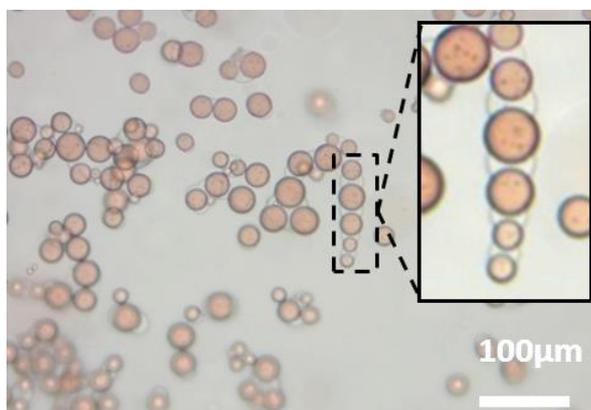


Figura 5.29. Imagen de microscopio óptico de una encapsulación de Miglyol fallida tras alterar el orden de reactivos. Se observa como los coacervados no se depositan correctamente sobre las gotas de aceite.

Las mejores condiciones para la encapsulación de Miglyol descritas por orden de ejecución fueron las siguientes:

- Emulsión realizada en la solución de gelatina.
- Adición de la solución de goma arábica sobre la emulsión.
- Acidificación hasta pH óptimo.

5.3.1.6. Uso de tensioactivos

Como bien se expuso en la introducción, el sistema gelatina y goma arábica permite la encapsulación sin necesidad de usar tensioactivos por el carácter estabilizador de los propios biopolímeros. No obstante, con el objetivo de obtener cápsulas más pequeñas sin incrementar la velocidad de emulsificación se propuso el uso de tensioactivos.

Lamentablemente algunos de estos estabilizantes y tensioactivos usados no ayudaron a mejorar la encapsulación y en muchos casos fue totalmente contraproducente. El uso de tensioactivos de tipo Tween® y estabilizantes como el PVA de diferentes grados de hidrólisis, inhiben la formación de las microcápsulas debido a las interacciones generadas entre los grupos hidroxilo libres y los grupos funcionales de los biopolímeros mediante puentes de hidrógeno, los cuales impiden la correcta formación de coacervados y su posterior deposición sobre las gotas (**Figura 5.30**).

Únicamente usando pequeñas cantidades de dodecilsulfato de sodio (SDS, 0.5%p/p) se pudo conseguir la formación de cápsulas, aunque el resultado final fue la obtención de cápsulas multinucleares. A concentraciones mayores de SDS la presencia de cargas negativas procedentes del tensioactivo disminuye la fuerte interacción entre los biopolímeros inhibiendo la formación de coacervados y favoreciendo la solubilización de los polímeros.

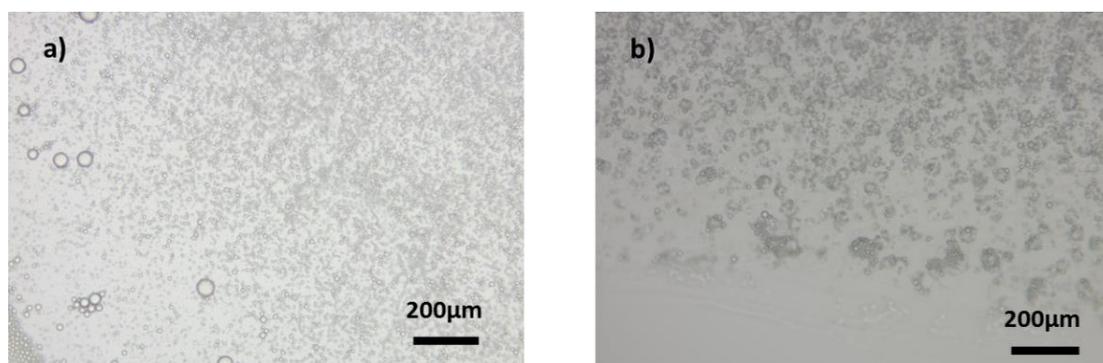


Figura 5.31. Imágenes de óptico de una encapsulación con: a) SDS 1 %; b) PVA 20-98 1%.

La decisión final para la encapsulación de cápsulas de aceite finalmente fue:

- No usar ningún tipo de tensioactivo.

5.3.2. Síntesis optimizada para la encapsulación de Miglyol y caracterización morfológica

| Condiciones | Valores escala laboratorio (50 g) |
|--|--|
| Solución gelatina (GEL _{sol}) | 25 g (1%p/p) MilliQ® |
| Cantidad de gelatina (GEL) | 0.25 g |
| Solución goma arábica (GA _{sol}) | 25 g (1%p/p) MilliQ® |
| Cantidad de goma arábica (GA) | 0.25g |
| Temperatura | 50°C |
| pH | 4.21 (ajustado con ácido acético 10%p/p) |
| Cantidad de Miglyol | 1 g Miglyol®812 + DR-13 |
| Emulsificación | 3.000 rpm (Ultra-Turrax® T25) |
| Enfriamiento | 50 - 25°C, 30 min / 25 - 5°C, 30 min |
| Tiempo de emulsión | 5 min |
| Agitación mecánica | 750 rpm |

Tabla 5.3. Condiciones optimizadas para la encapsulación de Miglyol por coacervación compleja.

Todas las modificaciones realizadas en las síntesis iniciales de cápsulas de Miglyol sirvieron para fijar unas condiciones que servirían posteriormente para la encapsulación de fragancias simples (**Tabla 5.3**). El producto de esta síntesis fue la obtención de microcápsulas mayoritariamente mononucleares de un tamaño aproximado de 50 μm . El aspecto de la suspensión a través de microscopio electrónico se muestra en la **Figura 5.32**.

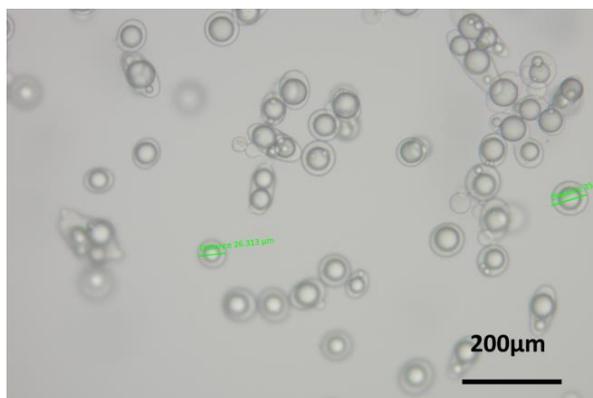


Figura 5.32. Imagen de microscopio óptico de la síntesis optimizada de cápsulas con Miglyol.

Cuando las suspensiones se dejaron reposar, se observó una separación de las cápsulas. Una parte de las microcápsulas flotó hacia la parte superior de la suspensión mientras que otras sedimentaron en el fondo. Este efecto está directamente relacionado con la diferencia de densidad entre las cápsulas (compuestas por polímero y aceite) y el agua. A pesar de que las cápsulas contienen un aceite con una densidad menor que el agua ($d=0.940 \text{ mg/mL}$), la suma total de todos los componentes, da como resultado un valor parecido ($d \approx 1$) o mayor ($d > 1$) dando lugar a una sedimentación o flotación en la parte intermedia (**Figura 5.33**).

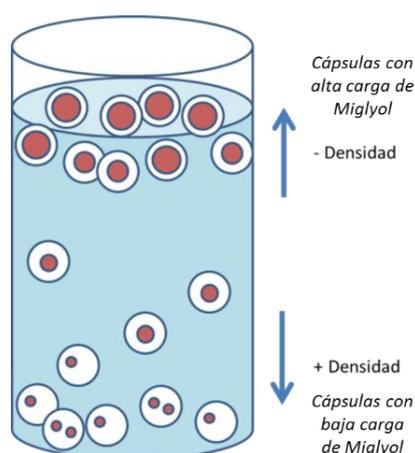


Figura 5.33. Representación gráfica del movimiento de las cápsulas de Miglyol en suspensión con el tiempo.

Por último, mediante la microscopía electrónica se obtuvo una información complementaria a la morfología de las microcápsulas. En las imágenes obtenidas a bajos aumentos (**Figura 5.34.a**), las

microcápsulas aparecen fusionadas entre ellas. Una vista cercana de las cápsulas secas (**Figura 5.34.b**) revela que no tienen la forma esférica que se intuye en el microscopio óptico sino que aparecen aplastadas contra el portamuestras y además se aprecia ligeramente donde se encuentran separadas. Otro detalle apreciable es la presencia de poros en la superficie, generados probablemente por la gran cantidad de agua almacenada en la corteza y que se evapora por el vacío de la cámara de SEM.

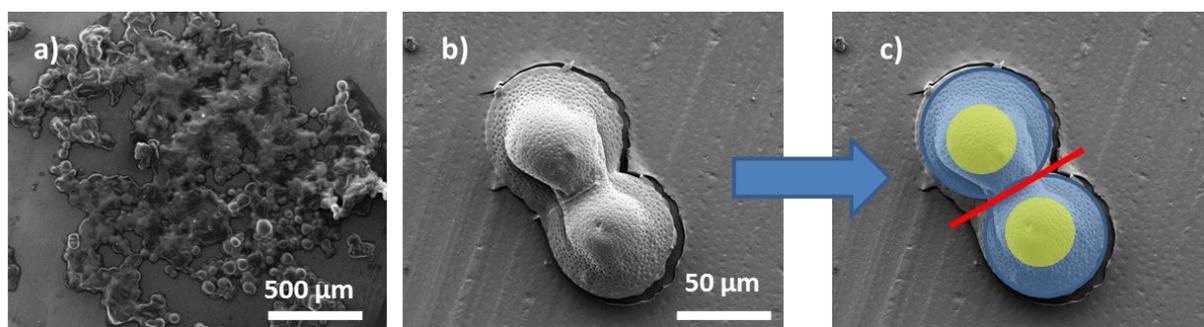


Figura 5.34. Imagen SEM de cápsulas GE/GA de Miglyol; a) aspecto de las cápsulas a bajos aumentos; b) detalle de dos cápsulas tras el secado al aire; c) representación gráfica mostrando la posición de las gotas, el material de corteza y la separación entre las cápsulas.

Por último, también se detectó la presencia de material no estructurado proveniente del polímero disuelto en la fase acuosa como se observa en la **Figura 5.34.b**. Esto indica que parte del polímero no ha interactuado para formar coacervados y por lo tanto la eficiencia es menor de la potencial. Por este motivo se quiso establecer un protocolo de lavado de cápsulas para arrastrar el exceso disuelto en la fase acuosa.

5.3.3. Purificación de las microcápsulas

Aunque la presencia de los polímeros no estructurados en la suspensión de cápsulas no supondría un problema de toxicidad, su presencia afecta a la determinación cuantitativa del rendimiento de encapsulación y la carga útil. Esto ayudaría además a obtener mejores caracterizaciones morfológicas y determinaciones más precisas de cantidad de aceite encapsulado. Por lo tanto, se valoraron diferentes tipos de protocolos para el lavado de cápsulas.

➤ Centrifugación

Se intentó separar las cápsulas del resto de agua usando diferentes velocidades y tiempos de centrifugación pero las cápsulas se agregaron y se repartieron por distintas partes del tubo de centrífuga, no lográndose una separación efectiva. La centrifugación, además, indujo la ruptura de las cápsulas más grandes probablemente debido a la presión a la cual estuvieron sometidas. Por esto, se descartó el uso de la centrifugación para la separación de este tipo de cápsulas.

➤ *Filtración*

En varios artículos publicados sobre coacervación compleja uno de los métodos usados para limpiar las cápsulas es la filtración por succión con la ayuda de un disolvente desecante [16-17]. El disolvente más usado para este propósito suele ser isopropanol o etanol absoluto (100% etanol) por la capacidad que tiene de extraer el agua presente en la corteza. Desafortunadamente, a la práctica este método dio muchos problemas desde el principio. El principal inconveniente observado al realizar la filtración fue la obturación de los poros del filtro a causa del aplastamiento de las propias cápsulas contra el papel filtrante (**Figura 5.34**) e hizo que las filtraciones se alargaran durante demasiadas horas (>3h). Además, la presión generada por las cápsulas depositadas en el papel y el uso de la espátula para quitarlas, produjo la ruptura de más cápsulas. Esto se pudo constatar con la presencia de líquido coloreado en el filtrado, indicación que algunas cápsulas habían perdido el núcleo de aceite y posteriormente por SEM.

➤ *Decantación con agua destilada*

La decantación consiste en la separación de las cápsulas ya sea por flotación o por sedimentación. Teniendo en cuenta la diferencia de densidad entre el agua y las cápsulas, la decantación permitiría una separación rápida.

Para la decantación se usó agua destilada para la eliminación del exceso de polímero. Además, la extracción con el doble de volumen en agua que el crudo de reacción inicial permite neutralizar el pH. El proceso de separación duró unos 30 minutos aproximadamente. Para acelerar el proceso se aplicó el método previamente validado para cápsulas de poliamida: decantación mediante adición de sales (más detalles en el **Capítulo 4**). No obstante esto tuvo un efecto contraproducente en las cápsulas por la gran fuerza iónica generada y los consiguientes fenómenos de agregación inducidos. Por este motivo, finalmente las decantaciones se realizaron únicamente con el uso de agua destilada. Afortunadamente la separación se produjo en pocos minutos, ya fuera obteniendo cápsulas en la parte superior por flotación, o en la parte inferior por sedimentación.

Para comprobar la extracción de polímeros de la suspensión, se extrajo una porción de agua de los lavados y se dejó secar en el horno en una placa Petri de vidrio. Al día siguiente se observó la formación de una película o *film* como consecuencia de la presencia de los biopolímeros sobrantes. Además, las cápsulas recogidas tras la decantación aparecieron mucho más limpias en el análisis por SEM (**Figura 5.35**). Por lo tanto, tras los resultados obtenidos se decidió que las muestras a partir de ahora se lavarían mediante esta última estrategia.

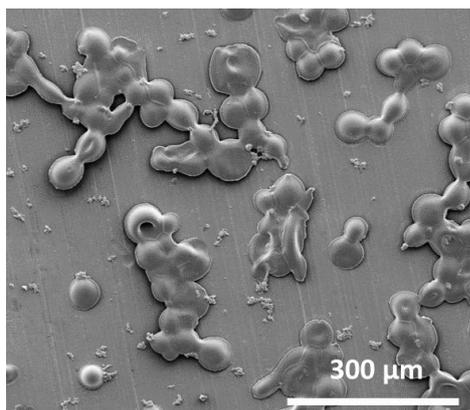


Figura 5.35. Imagen SEM de las cápsulas de Miglyol tras un lavado con agua destilada.

5.3.4. Aislamiento de las microcápsulas

Para la determinación cuantitativa por ^1H -RMN era necesario eliminar el agua de las muestras para que ésta no interfiriera en la determinación del aceite. Además, la gran cantidad de agua atrapada en el material de corteza incrementa el peso de la cápsula, hecho que dificulta la determinación real en peso del núcleo. Tras haber limpiado las cápsulas de posibles restos de material se investigaron métodos para el aislamiento de las mismas.

➤ *Spray-drying*

En la técnica de ‘*spray-drying*’ o atomización, una suspensión de cápsulas se seca en continuo mediante una pulverización de la suspensión a través de una cámara de aire caliente (para más detalle ver **Figura 1.12**). El producto resultante debe ser el de un polvo de microcápsulas.

Se realizaron una serie de pruebas modificando algunos parámetros experimentales del aparato como la temperatura de entrada, la velocidad de entrada de líquido y la presión de aire en el pulverizado. Los resultados obtenidos no fueron positivos ya que en los tres ensayos que se realizaron las cápsulas se rompieron como se pudo observar por SEM (**Figura 5.36**) y por la presencia de aceite en el colector y el ciclón.

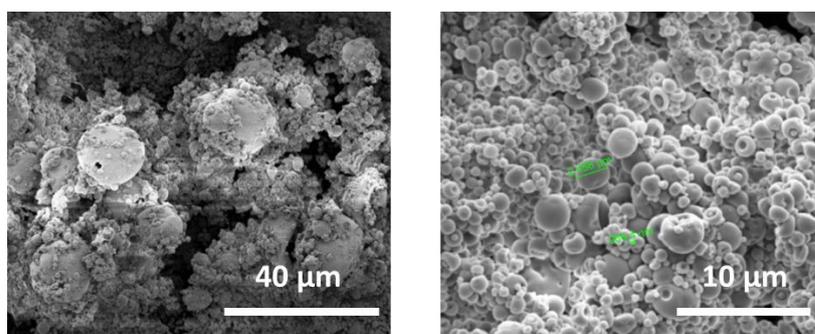


Figura 5.36. Imágenes SEM de muestras secadas por *spray-dryer*.

➤ *Liofilización*

Para los primeros procesos de liofilización se escogieron cápsulas con contenido aceite y colorantes para detectar posibles escapes del aceite. Tras recoger tanto las partes superiores e inferiores lavadas, se añadieron a un Falcon™ para su congelación. Para la congelación de las muestras se disponía de diferentes opciones:

- (A) Congelación con nitrógeno líquido: -196 °C (1-2 minutos).
- (B) Ultra congelación: -88 °C (10-15 min, utilizada en cápsulas de PA y MF).
- (C) Congelación común: -20 °C.

Para este tipo de microcápsulas se contempló realizar la congelación mediante los tres métodos de congelación mencionados para conocer el efecto sobre las cápsulas. La congelación más rápida se realiza mediante el uso de nitrógeno líquido aunque este proceso podría quebrar quebrar el polímero altamente hidratado. La ultracongelación es menos rápida pero menos agresiva para las cápsulas. Por último la congelación más lenta es la congelación común. Para los primeros experimentos se decidió por optar por la opción intermedia, mediante ultracongelación a -88°C.

Las muestras congeladas se liofilizaron posteriormente durante 48h para asegurar la completa sublimación de agua. Afortunadamente, el proceso de liofilización resultó ser menos agresivo que el *spray-drying* para el aislamiento y posterior secado de estas cápsulas.

A nivel macroscópico el material liofilizado recogido apareció como un fino polvo, y en el caso de las cápsulas rellenas con aceite y DR-13, aparecían como un polvo rojizo. Las cápsulas liofilizadas observadas a través de microscopio óptico presentaron un mayor contraste respecto a las cápsulas hidratadas debido a la pérdida de agua y al cambio del índice de refracción del material de corteza (**Figura 5.37.b**). Para comprobar que el aceite se encontraba en el interior y no adsorbido, las cápsulas se rehidrataron. El aspecto de estas cápsulas rehidratadas confirmó la presencia del aceite coloreado en el interior, además de confirmar una buena redispersabilidad en agua. Esta hidratación en algunos casos resulta ser algo agresiva para la corteza y se observa en forma de deformación o ruptura parcial de la cápsula. No obstante, este efecto fue minoritario y en la mayoría de los casos el aceite permaneció en el interior (**Figura 5.37.c**).

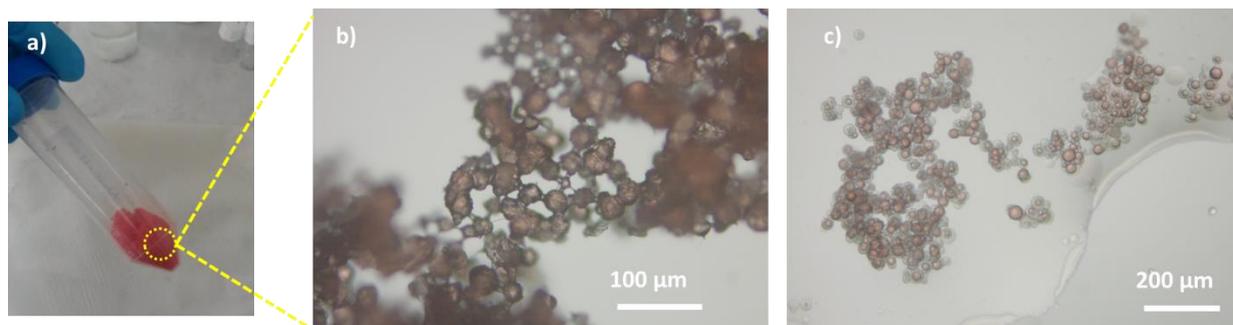


Figura 5.37. a) Aspecto macroscópico de cápsulas liofilizadas de Miglyol + DR13 en un tubo Falcon®; b) Imagen de microscopio óptico de cápsulas liofilizadas de Miglyol+DR-13; c) aspecto de las mismas tras su hidratación.

Cuando las cápsulas liofilizadas se observaron por SEM, presentaron un aspecto distinto respecto a las que previamente se analizaron directamente de la suspensión secada al aire. Aunque algunas estuvieran unidas entre sí, se podían distinguir las cápsulas individualmente. Además, las cápsulas no colapsaron contra el portamuestras sino que mantuvieron una estructura rígida y su corteza era lisa, sin observarse las cavidades ocasionadas por la evaporación de agua. El aumento de la rigidez fue atribuido a la ausencia total de agua en la corteza deshidratada completamente durante la liofilización. En las muestras preparadas a partir de la suspensión, en cambio, el agua atrapada en los polímeros actúa de plastificante, reblandeciendo el polímero y disminuyendo la rigidez de la corteza que por su peso tiende a aplastarse durante el secado.

Para comprobar la estructura núcleo-corteza se indujo la ruptura mecánica de las cápsulas recogidas rascando algunas regiones de la muestra. La visualización por SEM corroboró este tipo de estructura, pudiéndose observar claramente una corteza y una cavidad interior (**Figura 5.38.b**).

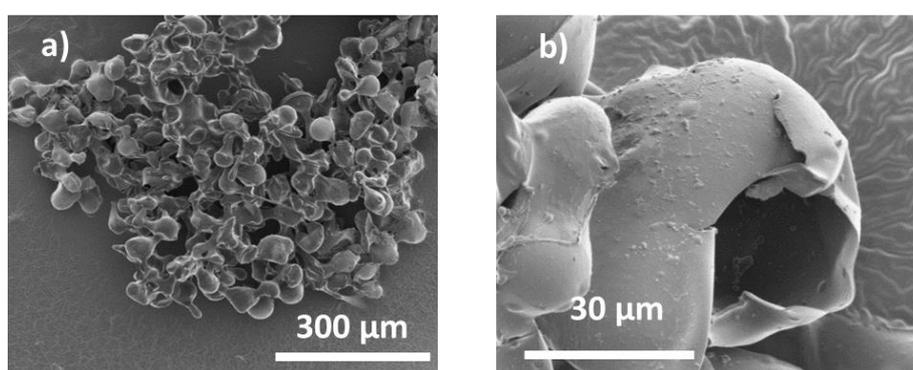


Figura 5.38. Imágenes SEM de: a) Polvo liofilizado de cápsulas de Miglyol + DR13; b) capsula rota de estructura mononuclear donde se ve la cavidad interior.

La liofilización, además, resultó ser muy útil para la preservación de las muestras. En las suspensiones de cápsulas de aceite después de 2-3 semanas empezaron a generarse microorganismos. Al tratarse de materiales biodegradables (carbohidratos y proteínas) las bacterias/hongos que pueden

alimentarse de estos sustratos se multiplican dando lugar a colonias. Las suspensiones almacenadas en la nevera permanecieron estables por algo más de tiempo (hasta 2 meses), pero si no se elimina el agua o se añade un preservante, la corteza acababa por degradarse emitiendo además olores desagradables (**Figura 5.40**). Aunque en este estadio de la investigación no interesaba, esta observación demostraba la biodegradabilidad de la corteza de las cápsulas suspendidas en agua.

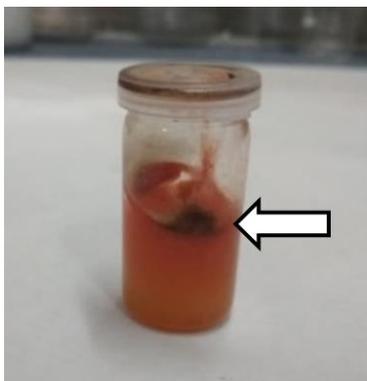


Figura 5.40. Ejemplo de muestra degradada por el crecimiento de microorganismos en una suspensión cápsulas de Miglyol+DR13 tras pocas semanas de la síntesis.

Con las cápsulas lavadas y liofilizadas es posible validar cuantitativamente el proceso de encapsulación mediante el cálculo de la carga útil y la eficiencia de encapsulación. Se puede resumir esquemáticamente las diferentes fases de síntesis, purificación, aislamiento y caracterización de la siguiente forma (**Figura 5.41**).

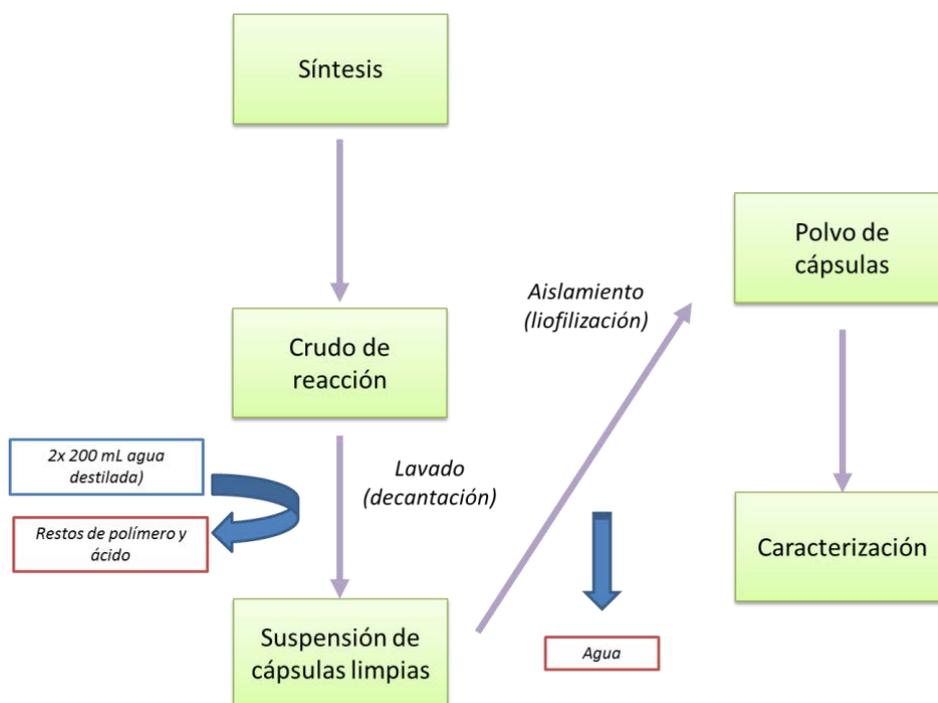


Figura 5.41. Esquema del proceso de lavado y aislado de las cápsulas.

5.3.5. Determinación de la cantidad de aceite en las cápsulas

Tras la caracterización morfológica de las cápsulas (SEM y OM) que permite averiguar el éxito de la formación de las cápsulas y su estructura interna, se determinó la carga útil y el rendimiento de encapsulación (como se describe en 1.5.2. **Parámetros cuantitativos**)

5.3.5.1. Método de ruptura y extracción del aceite liberado

Para esta determinación fue necesario inducir la ruptura de las cápsulas y extraer el aceite encapsulado con un disolvente orgánico. Para la determinación de cantidad de núcleo con este tipo de cápsulas se plantearon dos estrategias distintas (**Figura 5.42**):

➤ **Método indirecto:**

Consiste en romper una cantidad de microcápsulas liofilizadas suspendiéndolas en un disolvente orgánico bajo agitación vigorosa por un periodo prolongado de tiempo. Tras la ruptura se separa la fase líquida de la sólida mediante filtración y se determina la cantidad de aceite encapsulado por diferencia de peso inicial de las cápsulas y del sólido seco recogido (material de corteza). En este caso la filtración es posible por la mayor rigidez del polímero y la falta de obturación de los poros de los filtros. El inconveniente con este método es que se requiere cantidades grandes de cápsulas para así obtener un menor error.

➤ **Método directo:**

La segunda estrategia consiste en la ruptura y la extracción del núcleo mediante agitación o ultrasonidos (US) con el uso de disolventes orgánicos deuterados para su análisis directo por ^1H -RMN siguiendo el procedimiento usado para las cápsulas de MF y PA. Con este método se requiere de una menor cantidad de cápsulas.

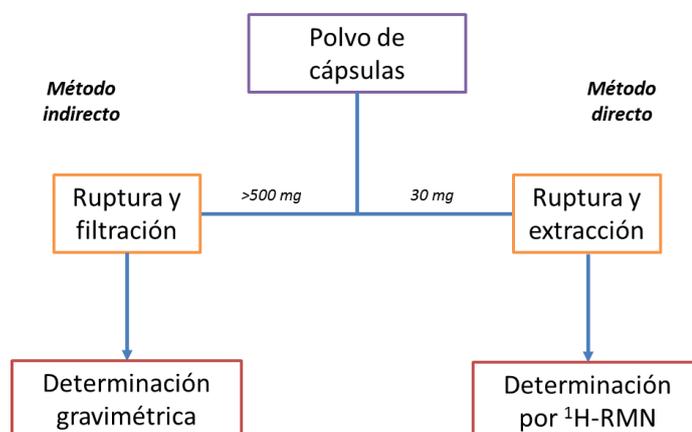


Figura 5.43. Esquema mostrando las diferentes opciones para la determinación cuantitativa de las cápsulas

Para ambos procedimientos se necesita asegurar que el tratamiento de ruptura sea lo más eficiente posible. El efecto de distintos disolventes sobre este tipo de microcápsulas y materiales no se había determinado anteriormente ni en CARINSA ni en NANOSFUN, por lo que se realizó un estudio sistemático. Para averiguar esto se suspendieron cápsulas liofilizadas en diferentes disolventes orgánicos de distinta polaridad. Tras esto se analizaron por SEM para conocer el efecto de estos sobre la morfología (**Figura 5.44**).

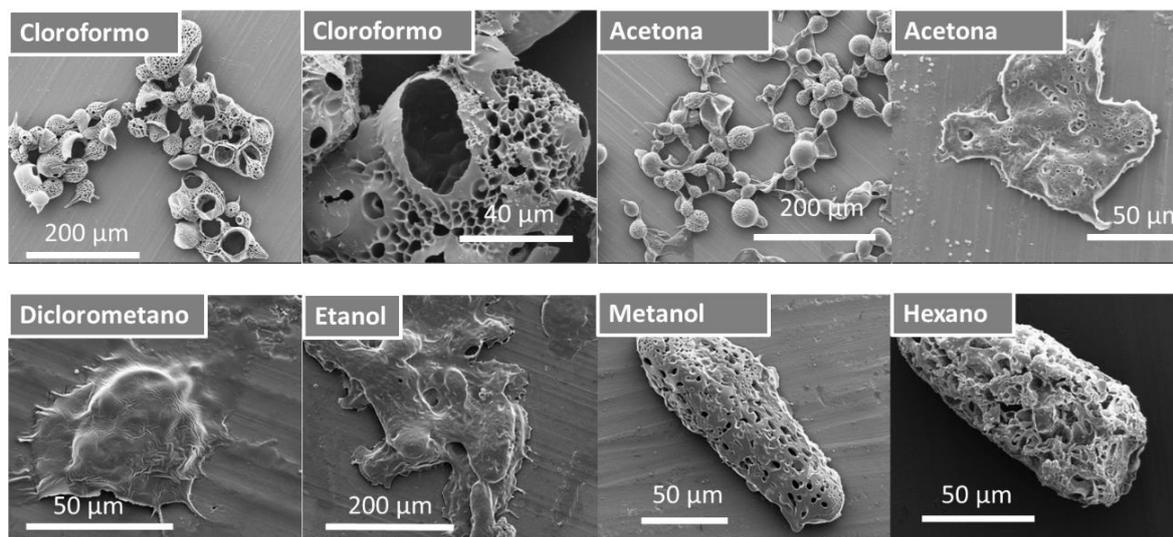


Figura 5.44. Imágenes SEM mostrando el efecto de los disolventes sobre las cápsulas de Miglyol.

Dependiendo del disolvente aplicado las cápsulas presentaron un aspecto u otro. En los disolventes más polares la corteza del polímero tendía a hacer un hinchamiento o ‘swelling’, mientras que en los más apolares la corteza se mantuvo rígida. Respecto a la extracción del contenido los más eficientes resultaron ser la acetona y el cloroformo nuevamente, además de ser los más adecuados para la extracción de las fragancias que se intentaron encapsular posteriormente.

Para la ruptura se investigaron dos métodos:

- Ruptura por ultrasonidos (US) de una suspensión de cápsulas liofilizadas y disolvente

Con este método la suspensión acababa calentándose, fomentando la evaporación del solvente usado para la extracción del aceite. Además, el aumento de la temperatura induciría la pérdida de compuestos volátiles como las fragancias, causando pérdidas en la estimación de la carga útil. Una de las soluciones consistió en añadir hielo al baño de ultrasonidos para así mantener el vial frío por un periodo más largo de tiempo.

- Ruptura por agitación de una suspensión de cápsulas liofilizadas y disolvente

El método de agitación magnética de una suspensión de cápsulas en el disolvente orgánico se mostró mucho más eficiente ya que en 6h (vial tapado, 1500 rpm) se consiguieron romper prácticamente todas las microcápsulas

Las imágenes SEM (**Figura 5.45**) confirmaron la ruptura de las cápsulas mediante el método de agitación magnética de una suspensión de microcápsulas en cloroformo. Además, se confirmó la extracción del aceite al dejar las cavidades huecas. Las cápsulas huecas mantenían su forma esférica, confirmando la rigidez de la corteza de las cápsulas liofilizadas y su incompatibilidad para disolverse en este cloroformo.

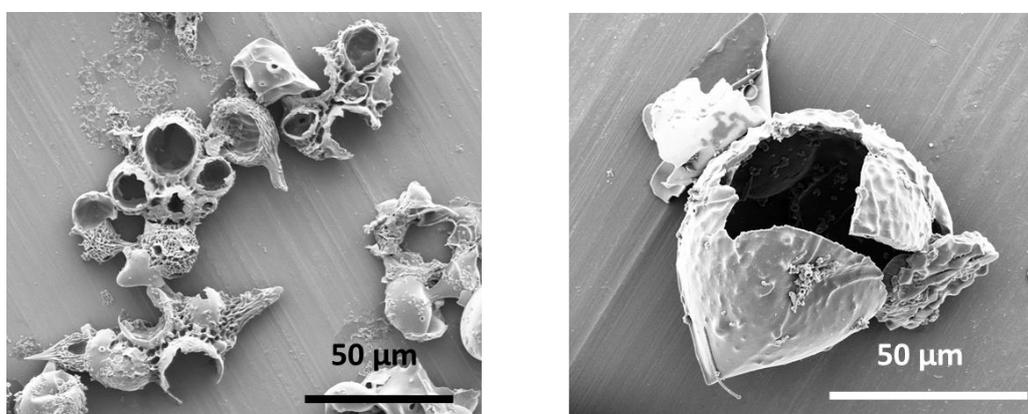


Figura 5.45. Imágenes SEM de cápsulas liofilizadas tras el proceso de ruptura con cloroformo.

La conclusión extraída de este estudio es:

- El cloroformo es el disolvente que mejor rompe y extrae el aceite de las microcápsulas.
- La agitación magnética de la suspensión de cápsulas es el método más eficiente para la ruptura.
- El método directo mediante ^1H -RMN fue el seleccionado por la menor cantidad de muestra requerida.

5.3.5.2. Cuantificación del aceite por ^1H -RMN

Teniendo en cuenta que el disolvente y el método de ruptura coincidieron con los utilizados para el resto de microcápsulas (PA y MF), se realizó la cuantificación siguiendo los **Protocolos RUPT.1 y RMN.1** con el uso de cloroformo deuterado y DMF como patrón interno. A continuación se registraron los correspondientes espectros que son los que se muestran en la **Figura 5.46**.

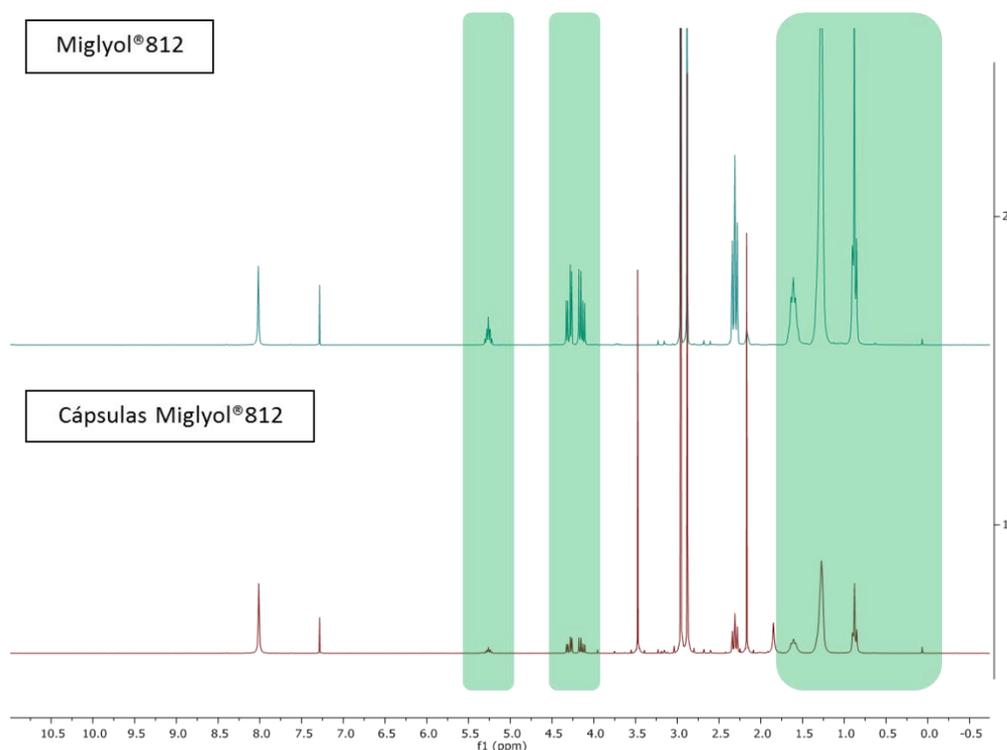


Figura 5.46. Comparativa de los espectros de ^1H -RMN de Miglyol puro y cápsulas de Miglyol rotas. En verde se muestran las regiones de los picos correspondientes al aceite.

El análisis mostró que:

- La extracción del Miglyol con el cloroformo se pudo confirmar tras la comparación con el espectro de una muestra de Miglyol puro.
- No se revelaron picos que no fueran del DMF o el aceite, demostración de que el cloroformo no disuelve el polímero de la corteza.
- Mediante la adición de DMF a una cantidad conocida de microcápsulas liofilizadas se puede determinar la carga útil de las cápsulas obtenidas por coacervación compleja.

La cantidad de carga útil determinada para estas microcápsulas alcanzó un valor de un **65%**. La cantidad obtenida fue algo inferior a la deseada para el proyecto, pero aún se debía comprobar el resultado en fragancias y posteriores ajustes de los parámetros. El resto de parámetros cuantitativos no se determinaron hasta que no se optimizara el sistema para la fragancia objetivo.

5.4. Encapsulación de fragancias simples

Una vez optimizada la síntesis de las cápsulas de aceite por coacervación, se utilizaron las mismas condiciones para encapsular fragancias simples. Para estos casos las fragancias escogidas fueron Apple TOP FCAP952505 (APPLE, formada por 4 componentes, ver **Anexo II**), limoneno y acetato de bencilo. A continuación se muestran las condiciones para encapsulación de estas fragancias (**Tabla 5.4**).

| Condiciones | Valores escala laboratorio (50 g) |
|--|--|
| Solución gelatina (GEL _{sol}) | 25 g (1%p/p) MilliQ® |
| Cantidad de gelatina (GEL) | 0.25 g |
| Solución goma arábica (GA _{sol}) | 25 g (1%p/p) MilliQ® |
| Cantidad de goma arábica (GA) | 0.25g |
| Temperatura | 50°C |
| pH | 4.21 (ajustado con ácido acético 10%p/p) |
| Material a encapsular | Fragancia simple |
| Emulsificación | 3.000 rpm (Ultra-Turrax® T25) |
| Enfriamiento | 50 - 25°C, 30 min / 25 - 5°C, 30 min |
| Tiempo de emulsión | 5 min |
| Agitación mecánica | 750 rpm |

Tabla 5.4. Condiciones de partida para la encapsulación de fragancias simples.

5.4.1. Encapsulación de fragancia APPLE

Inicialmente encapsuló la fragancia APPLE viendo los buenos resultados obtenidos con cápsulas de PA y MF. La emulsificación de esta fragancia dio lugar a gotas de un tamaño menor al obtenido con aceite debido a la menor densidad y viscosidad. En la encapsulación se observó un proceso de evaporación o difusión de la fragancia a través del material de corteza que se presentó como una generación cavidades entre la gota y la corteza polimérica (**Figura 5.47**).

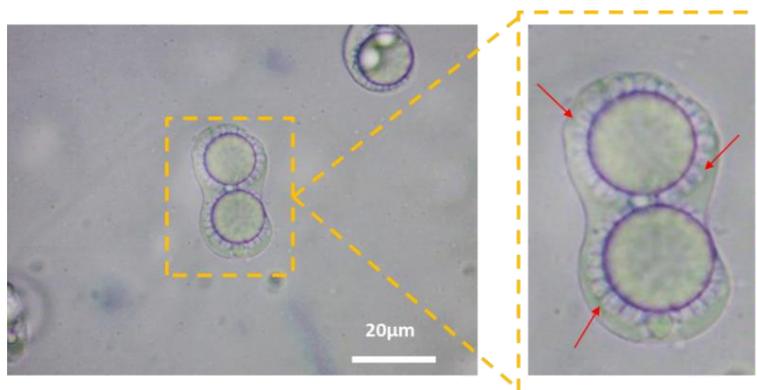


Figura 5.47. Imagen de microscopio óptico donde se intuye la evaporación del núcleo en el proceso de coacervación (previo a la gelificación).

A pesar de ello, la reacción se completó obteniéndose finalmente cápsulas mononucleares o multinucleares con una alta presencia de fragancia atrapada. Inesperadamente, al visualizar la muestra tras 30 minutos de la finalización de la síntesis, se apreciaron cápsulas que parecían haber perdido su núcleo parcial o totalmente. Se corroboró que este efecto no fue a causa de un posible cambio de difracción de la luz. Tras observar esto, se creyó conveniente guardar la muestra en la nevera (4°C) durante 12 h con el propósito de ralentizar este proceso y favorecer una mayor reticulación de la corteza de las cápsulas. Pasadas estas horas, se observó nuevamente la muestra y se verificó que no se pudo evitar la fuga de los núcleos de fragancia (**Figura 5.48**).

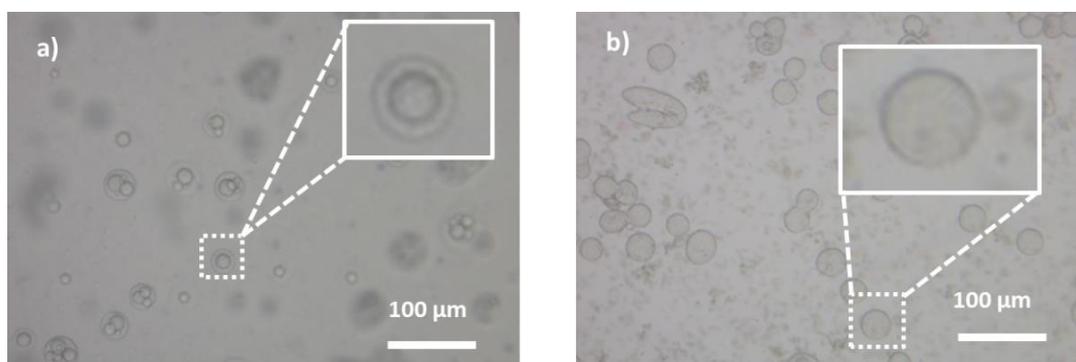


Figura 5.48. a) Imagen de microscopio óptico donde se puede apreciar la suspensión de cápsulas con núcleo APPLE tras 30 minutos de finalizar la síntesis; b) imagen de microscopio óptico de la misma muestra tras 12 horas en la nevera a 4°C.

La pérdida de fragancia se podría deber a un proceso de volatilización de la fragancia a través de los poros que pudiera tener la corteza durante su formación o a la difusión de la fragancia a hacia la fase acuosa. La explicación más probable es que la pérdida de fragancia fuera debido a la volatilización durante todo el proceso de encapsulación ya que los compuestos de la fragancia, de tipo éster, son bastante apolares como para difundir a la fase acuosa y se emulsionaron de manera correcta.

5.4.2. Encapsulación de limoneno y acetato de bencilo

Tras los resultados obtenidos, se decidió simplificar aún más el sistema y estudiar la encapsulación de una molécula concreta como fragancia mono-componente. Para ello, se seleccionaron candidatos de las listas de materias primas más empleadas por CARINSA (Tabla 5.5).

| Producto | Consumo anual (kg) | Tipo |
|-----------------------------------|--------------------|------------------|
| Dipropilenglicol | 2239868.6 | Disolvente |
| Pino China | 18540 | Multicomponente |
| Limoneno | 17374 | Compuesto simple |
| Acetato de PTBCH | 17270 | Compuesto simple |
| Dihidromircenol | 16740 | Compuesto simple |
| Alcohol feniletílico | 12750 | Compuesto simple |
| Acetato de bencilo | 11200 | Compuesto simple |
| Acetato de isobornilo | 11020 | Compuesto simple |
| Aldehído α -hexil cinámico | 11260 | Compuesto simple |
| Linalol | 10120 | Compuesto simple |
| Galaxolide-Abbalide -Musk 50 | 7000 | Multicomponente |
| Iso e Super | 5600 | Compuesto simple |

Tabla 5.5. Listado de las materias primas más utilizados por CARINSA para sus formulaciones (2014).

Se analizó cada una de las moléculas y se buscaron compuestos que mostraran diferencias en cuanto a polaridad y volatilidad. La elección definitiva para la encapsulación fueron el limoneno y el acetato de bencilo, cuyas las propiedades físico-químicas más importantes se muestran a en la Tabla 5.6.

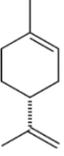
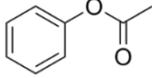
| Nombre | Fórmula | Propiedades físico-químicas |
|--------------------------|---|---|
| Limoneno (LIM) |  | <p>P.M.: 136.24 g/mol</p> <p>Densidad: 0.841 g/mL</p> <p>Punto ebullición: 176 °C</p> <p>Presión de vapor: 20 Torr/2,7 Kpa</p> |
| Acetat de bencilo (BnAc) |  | <p>P.M.: 150,18 g/mol</p> <p>Densidad: 1.05 g/mL</p> <p>Punto de ebullición: 214 °C</p> <p>Presión de vapor: 90 Torr/11.9 Kpa</p> |

Tabla 5.6. Compuestos seleccionados para la encapsulación de fragancias básicas.

Químicamente el limoneno (LIM) es un monoterpenoide cíclico, volátil, poco polar y poco o nada soluble en agua. Por otro lado el acetato de bencilo (BnAc) es un éster con un anillo aromático que le confiere una mayor polaridad y lo hace ligeramente soluble en agua (0.30 g/100 mL). Las densidades y las presiones de vapor de ambos compuestos también son diferentes, siendo ambas mayores para el acetato de bencilo.

La síntesis de cápsulas de limoneno y acetato de bencilo se realizaron aplicando las condiciones utilizadas con la fragancia APPLE.

➤ *Cápsulas de limoneno*

El fenómeno de evaporación observado con la fragancia APPLE no se presentó en este caso y tras la formación se pudieron diferenciar cápsulas con alta carga y otras con baja carga (de manera similar a las cápsulas con Miglyol). Una posterior observación por microscopía óptica y SEM confirmó la forma esférica de las cápsulas de limoneno y su corteza lisa y aparentemente estanca (**Figura 5.49**). Los tamaños medios observados fueron también muy similares a los obtenidos con aceite, situándose en el rango de 50-100 μm .

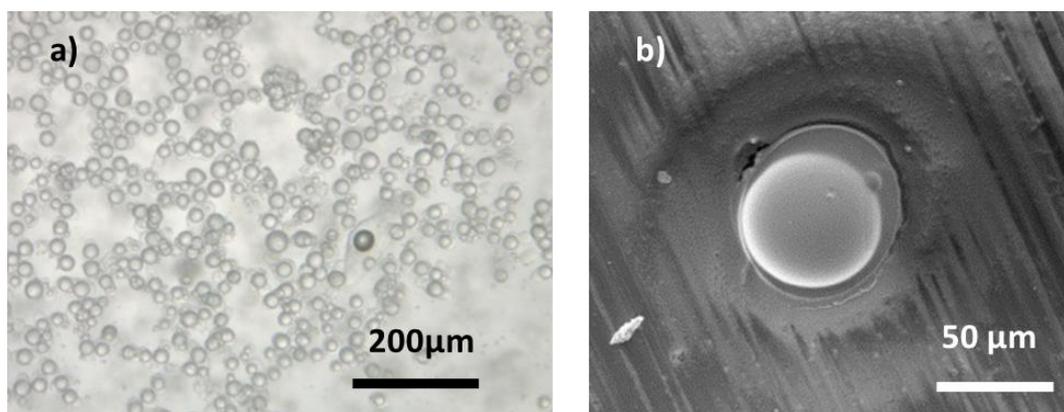


Figura 5.49. a) Imagen de microscopio óptico de la síntesis de cápsulas de limoneno.; b) imagen SEM de una cápsula con alta carga de limoneno.

➤ *Cápsulas de acetato de bencilo*

El resultado de la síntesis de cápsulas con acetato de bencilo no fue tan positivo como el obtenido con el limoneno. En el proceso de coacervación se volvió a observar un comportamiento parecido al observado con APPLE provocado por la volatilización de la fragancia. El aspecto del producto final a través de microscopio óptico mostró pérdida de contenido con el paso de las horas (se hizo un

seguimiento cada hora) y esto repercutió en la morfología tras el secado observada por SEM (**Figura 5.50**).

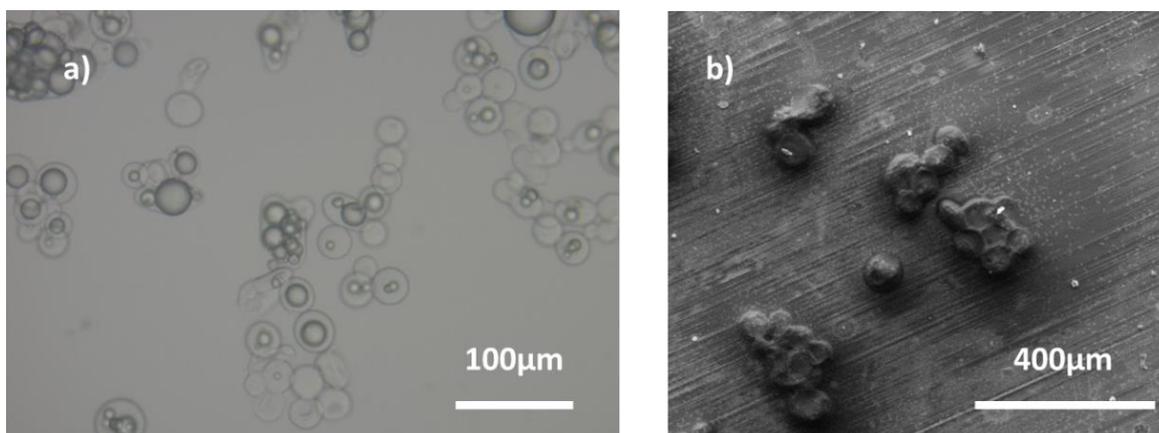
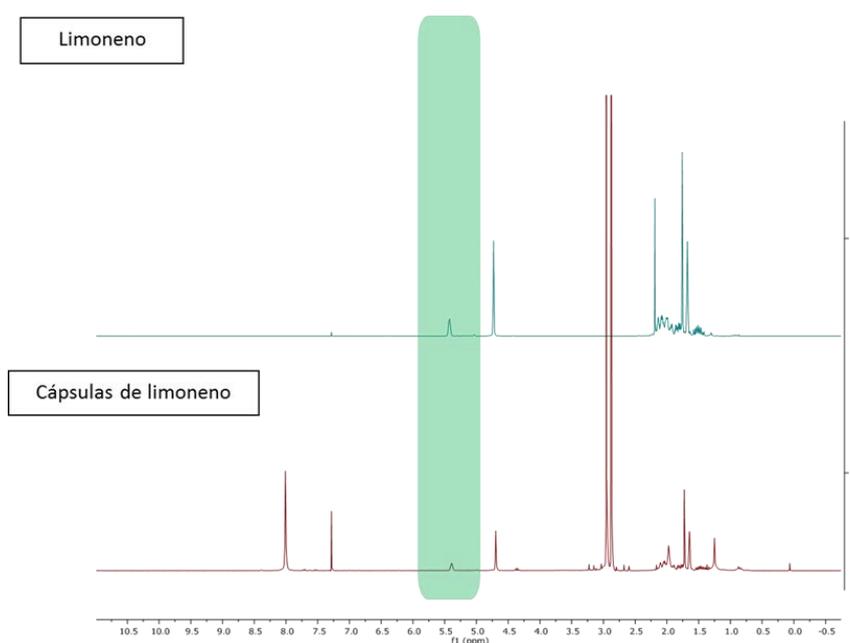


Figura 5.50. a) Imagen de microscopio óptico de la suspensión de cápsulas de BnAc al cabo de 1 h de la síntesis; b) Imagen SEM de las mismas tras de evaporación del núcleo.

Ambas suspensiones se recogieron y liofilizaron tan pronto como se finalizó la reacción para intentar recoger cápsulas cargadas con la mayor cantidad de fragancia posible. Tras la liofilización de la suspensión de cápsulas se obtuvo un fino polvo blanco, indicación que el agua se eliminó totalmente.

La ruptura y extracción del contenido se realizó por agitación magnética con cloroformo como disolvente de extracción. El análisis ^1H -RMN de las cápsulas rotas mostró que los picos relativos a ambas fragancias eran detectables, indicando que se habían encapsulado (**Figura 5.51**).



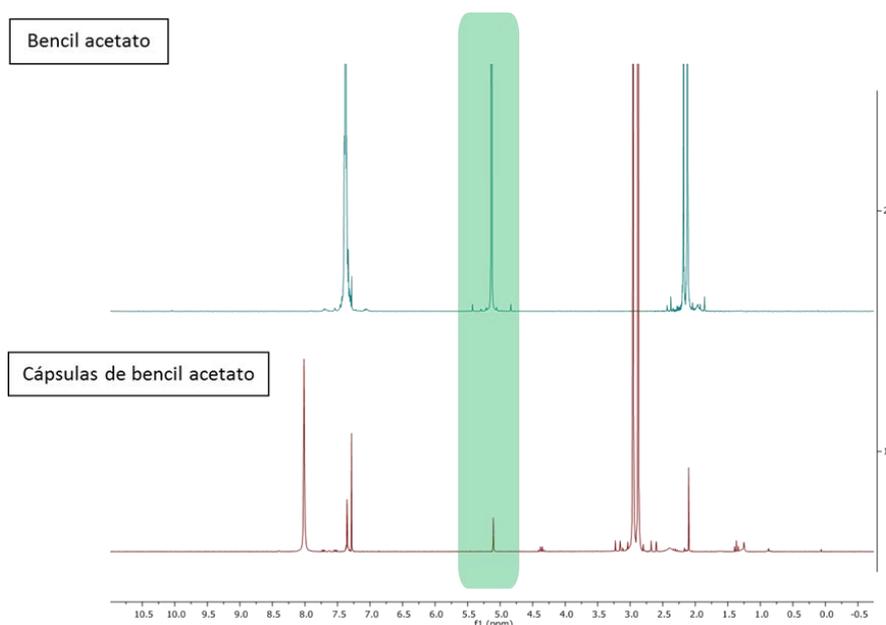


Figura 5.51. Comparativa de espectros de ^1H -RMN de los núcleos extraídos de las cápsulas de LIM y BnAc con sus respectivos componentes de núcleo sin encapsular. En verde se marca el pico analizado.

No obstante, se determinó que la cantidad de carga útil era muy inferior a lo obtenido con aceites ($\approx 60\%$). Concretamente, para el **limoneno** la cantidad determinada fue de **7.9%** y para el **acetato de bencilo** el resultado fue **2.90%** en peso (Tabla 5.7),

| Fragancia encapsulada | Cantidad de cápsulas | Fragancia determinada | Carga útil |
|---------------------------|----------------------|-----------------------|------------|
| Limoneno | 30 mg | 2.38 mg | 7.91%p/p |
| Acetato de bencilo | 30 mg | 0.878 mg | 2.90%p/p |

Tabla 5.7. Carga útil de las cápsulas con fragancias LIM y BnAc.

La cantidad de carga retenida en las cápsulas distaba mucho de las características deseadas para la encapsulación de fragancias. Además, la diferencia con la carga de cápsulas de aceite era prácticamente de un orden de magnitud.

Los resultados cuantitativos mostraban una discordancia con el análisis visual realizado por microscopía, donde se observaron cápsulas aparentemente con una alta carga en su interior. Una posible causa de esto podría ser que la fragancia se hubiera perdido durante la liofilización o por volatilización en el proceso de encapsulación. Para confirmar estas hipótesis se realizaron una serie de pruebas que se muestran a continuación.

5.4.3. Estudios para la mejora de la carga útil de limoneno

Para conseguir incrementar la cantidad de limoneno encapsulado inicialmente se estudiaron varios factores que podrían favorecer la pérdida en diferentes etapas del proceso de encapsulación por coacervación. Teniendo en cuenta la baja cantidad encapsulada del acetato de bencilo y los problemas de estabilidad observados, se decidió a partir de este momento continuar solamente con el limoneno. Debido a su baja polaridad, la pérdida del limoneno es principalmente debido a su evaporación durante el proceso de encapsulación/aislamiento más que su difusión a la fase acuosa.

Tras la síntesis de las cápsulas de limoneno se vió que la suspensión obtenida presentaba dos fracciones distintas, una inferior y una superior de igual forma que se observó con Miglyol (**Figura 5.52**).

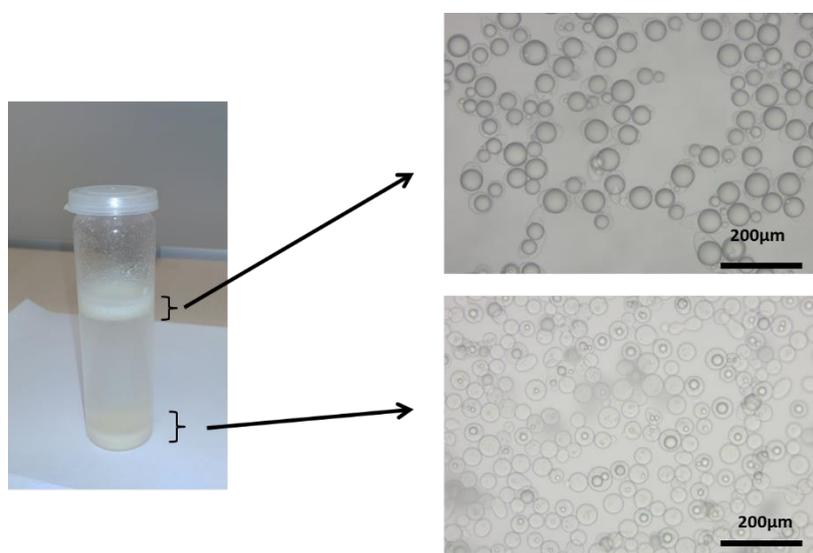


Figura 5.52. Fotografía realizada a la suspensión de cápsulas de limoneno tras su almacenamiento e imágenes de microscopio óptico de las cápsulas localizadas en ambas fracciones (superior e inferior).

A nivel macroscópico se confirmó que la ruptura mecánica de las cápsulas secadas al aire de la fracción superior producía una mayor liberación de limoneno respecto a las de la fase inferior, que fue detectado visual y olfactivamente. Posteriormente, mediante microscopía óptica se verificó que las cápsulas localizadas en la fracción superior presentaban un contenido mayor de limoneno que las localizadas en zona inferior y superior.

En este caso, las dos fracciones de un nuevo replicado de la síntesis se liofilizaron por separado y se cuantificó la carga útil. El resultado obtenido corroboró los datos extraídos de su análisis macroscópico

y microscópico (**Figura 5.53**). La fracción superior tenía una carga hasta 3 veces más alta que la inferior pero aún insuficiente para los intereses del proyecto.

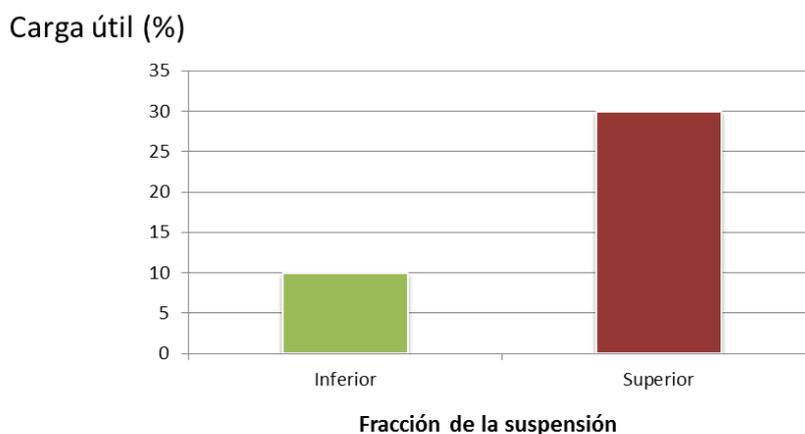


Figura 5.53. Cantidad de limoneno determinada para cada una de las fases de la suspensión.

Estos análisis sobre la suspensión mostraron que:

- Las cápsulas generalmente tienen un bajo contenido de fragancia ($\leq 30\%p/p$).
- Las cápsulas que tienen una mayor carga están diluidas por otras de menor contenido, disminuyendo el contenido total de la fragancia.

Tras este estudio quedó claro que era necesario:

- Reducir la cantidad de cápsulas en la fracción inferior (menos fragancia).
- Aumentar el contenido de la fragancia en todas las cápsulas.

Para esto se procedió en 2 etapas que describen a continuación.

5.4.3.1. *Detección del mecanismo de pérdida de la fragancia*

➤ *Evaporación*

Uno de los aspectos a analizar fue la volatilización de las fragancias durante diferentes etapas de la encapsulación. Para ello, se realizaron dos tipos de experimentos que recrearon las condiciones que podrían acelerar la volatilización.

a. Evaporación causada por la temperatura

Una cantidad conocida de limoneno se añadió a un vaso de precipitados y se dejó bajo agitación a 50 °C durante 1 hora aproximadamente. El resultado fue la pérdida del

30% de peso. Tanto el proceso de emulsificación como el de encapsulación se realizan a 50 °C, lo cual seguramente induce la pérdida de una parte importante del limoneno.

Para reducir la evaporación de la fragancia se propuso preparar la emulsión y encapsulación durante periodos más cortos y si fuera posible, realizar estas etapas a una temperatura inferior

b. Evaporación causada por vacío durante la liofilización

El alto vacío alcanzado durante la liofilización propicia la evaporación de agua y de las sustancias volátiles como las fragancias. Para conocer realmente el impacto del vacío en las fragancias se congelaron muestras puras de limoneno y se liofilizaron con las mismas condiciones que las cápsulas. El resultado fue la completa evaporación de la fragancia en un periodo de 24 h. Esto explicaría que el contenido de limoneno en el polvo liofilizado fueran inferiores los esperados ya que la fragancia encapsulada se habría evaporado a través de los poros de la corteza

El efecto de la liofilización posteriormente también se estudió directamente con las cápsulas. Hasta el momento, el método de liofilización utilizado había sido el de ultracongelación a -88°C en detrimento de nitrógeno líquido por temor a quebrar las cápsulas por su alta hidratación. De todos modos, para este caso específico se pensó que una congelación más veloz (mediante nitrógeno líquido) pudiera contribuir a un diferente empaquetamiento de las cadenas de biopolímero y generar una corteza menos porosa capaz de retener de una manera más eficiente el limoneno. Para poder comprobar esta hipótesis, se realizaron liofilizados de una misma muestra mediante ambos métodos de congelación.

Las dos muestras liofilizadas no mostraron diferencias a nivel macroscópico, no obstante, mediante SEM se vió que el método de liofilización afectaba a la estructura de las cápsulas. El liofilizado obtenido no mostró diferencias a nivel macroscópico respecto al obtenido con el método de ultracongelación. No obstante, su visualización por SEM, mostró un resultado muy distinto (**Figura 5.54**).

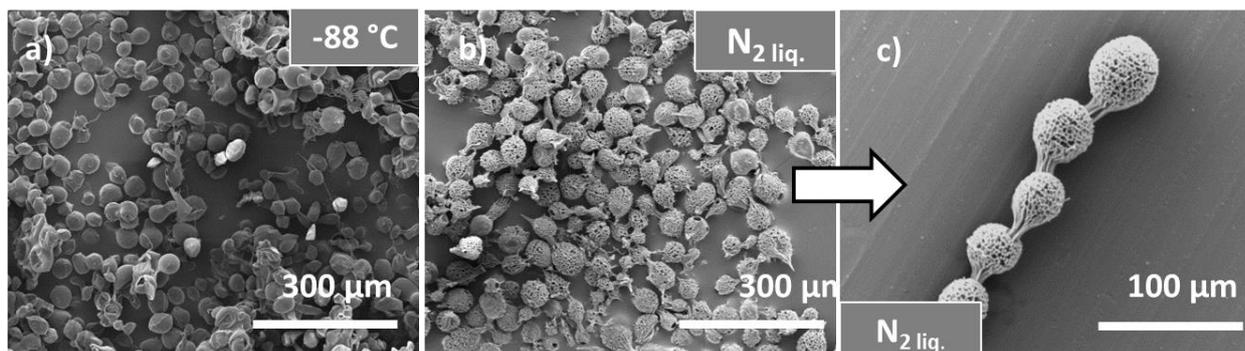


Figura 5.54. Imágenes de SEM de las cápsulas de limoneno obtenidas mediante diferentes métodos de congelación previos a la liofilización. a) cápsulas congeladas a $-88\text{ }^{\circ}\text{C}$ mediante ultracongelador; b) cápsulas congeladas con nitrógeno líquido; c) zoom de la superficie aparentemente porosa de cápsulas congeladas con nitrógeno.

Aunque las cápsulas conservaran tamaños similares, se observó claramente una diferencia en la estructura de la corteza. En las cápsulas liofilizadas a $-88\text{ }^{\circ}\text{C}$, la corteza presentaba una superficie lisa mientras que las preparadas con nitrógeno líquido presentaban una superficie muy rugosa. Al observarlas a mayor magnificación se vio muy claramente este efecto (**Figura 5.54.c**).

Pese al aspecto poroso de las cápsulas liofilizadas con nitrógeno líquido, que hacía pensar que la fragancia podría volatilizarse más rápidamente, la carga útil determinada resultó ligeramente mayor (**Figura 5.55**).

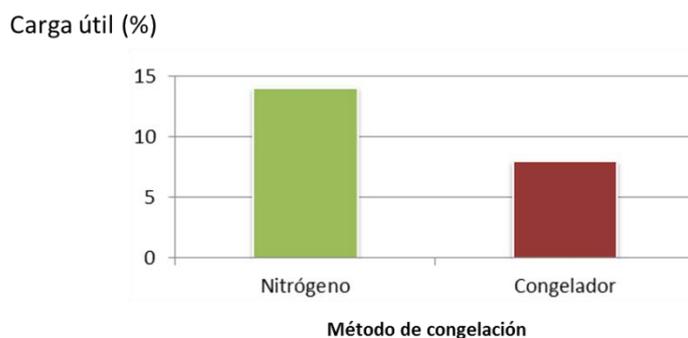


Figura 5.55. Comparativa de carga útil de limoneno determinada en cápsulas liofilizadas mediante diferentes métodos de congelación.

Para encontrar una explicación que relacionara esta morfología aparentemente porosa pero que a su vez mostraba una mayor retención de limoneno, se analizaron distintas cápsulas liofilizadas. En una de las pruebas se separaron nuevamente la fracción superior e inferior y se congelaron con el método de nitrógeno líquido. El análisis de estas dos fracciones indicó que las cápsulas se diferenciaban en algunos aspectos. Donde hay más grosor de biopolímeros, se forma más rugosidad, que fue atribuida

a la sublimación del agua atrapada en la parte más interna de la matriz polimérica. En la parte central, alrededor del núcleo, la corteza es más fina y el agua sublima de una forma distinta, sin dejar rugosidad (Figura 5.56).

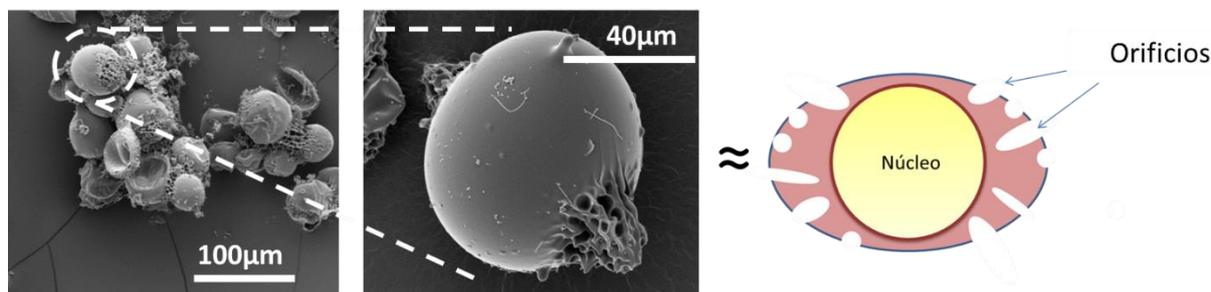


Figura 5.56. Imágenes SEM de las cápsulas de limoneno liofilizadas de la fracción superior (tras congelación con nitrógeno líquido) donde se aprecian los dos tipos de superficies y al lado la representación gráfica de los orificios de la cápsula.

Para verificar que se trataba de rugosidad y no porosidad, posteriormente se realizó la ruptura de algunas de estas cápsulas para comprobar esta hipótesis. En la **Figura 5.57** se muestra el fragmento de una cápsula liofilizada tras la ruptura donde se puede apreciar como la pared externa de la cápsula presenta la rugosidad mencionada, pero sin llegar a generar un poro hacia el interior del núcleo.

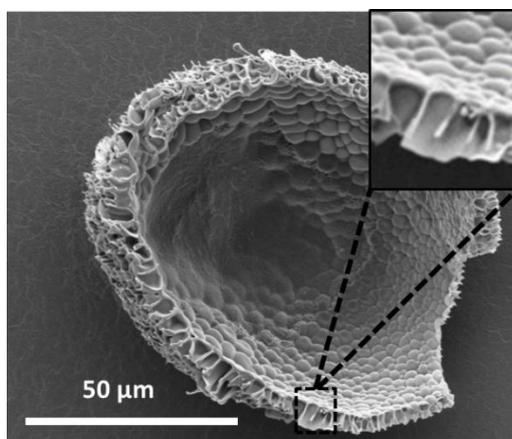


Figura 5.57. Imagen SEM de una cápsula de limoneno liofilizada y fragmentada. La corteza exterior es altamente rugosa, pero sin llegar a crear cavidades hacia el núcleo.

Este estudio indicó que el método de liofilización afecta a la morfología de las cápsulas y ligeramente al limoneno retenido, pero sigue siendo insuficiente para determinar la pérdida mayoritaria de la fragancia.

5.4.3.2. Mejoras para incrementar la carga útil de limoneno de las cápsulas

Tras descartar que la pérdida de limoneno se produjo en la etapa de liofilización, se iniciaron un conjunto de modificaciones en el proceso de síntesis con el objetivo de lograr una mejora significativa de la carga útil de limoneno.

➤ Mezcla del núcleo de limoneno con aceite

Una estrategia propuesta para la retención del limoneno y que se usó también en otras técnicas, fue el uso de aceites, o llamados comúnmente *carriers*, que solubilizan la fragancia y favorecen su retención. Uno de estos aceites usados fue el dietilftalato (DEP) por su buena miscibilidad con la fragancia.

Idealmente se debería usar la mínima cantidad de aceite posible para no disminuir demasiado el porcentaje de la fragancia en las cápsulas. Se planteó inicialmente realizar mezclas al 50% en peso de DEP en limoneno y, en función de los resultados, ir reduciéndolo hasta la proporción óptima. La mezcla al 50% se encapsuló siguiendo el las condiciones de la **Tabla 5.4**, pero los resultados no resultaron ser positivos. La determinación del limoneno y los aceites encapsulados fue posible por $^1\text{H-RMN}$ ya las señales no se solapan (**Tabla 5.8**).

| Compuesto | Proporción inicial(%p/p) | Cantidad determinada en 30 mg de cápsulas | Carga | Proporción final (%p/p) |
|-----------|--------------------------|--|-------|----------------------------|
| Limoneno | 50 % | 1.59 mg | 5.23% | 11.15% |
| DEP | 50% | 12.66 mg | 42% | 88.85% |

Tabla 5.8. Resultado obtenido de la síntesis de cápsulas con mezcla de limoneno y DEP 1:1.

La cantidad de limoneno en las cápsulas resultó ser nuevamente muy baja (5.23%p/p) aunque, por otro lado la encapsulación del DEP fue casi cuantitativa (42%p/p). Viendo estos resultados se descartó la opción de usar aceites junto con el limoneno.

➤ Incremento de la proporción de fragancia respecto al polímero

La estrategia propuesta para incrementar la carga útil de limoneno en las cápsulas fue aumentar la cantidad de éste respecto al polímero, manteniendo el resto de condiciones inalteradas. Las distintas síntesis realizadas y su cuantificación de carga útil se muestran en la **Tabla 5.9**

| Proporción (Pol:lim) | Carga teórica(%p/p) | Carga máxima determinada | Diferencia teórico - determinado |
|-------------------------|---------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| 1:2 | - | 14% | - |
| 1:4 | 28% | 16% | -12% |
| 1:8 | 56% | 24% | -32% |

Tabla 5.9. Comparativa de la carga útil teórica y determinada de limoneno en las diferentes proporciones de polímero: limoneno.

Como puede comprobarse en la **Figura 5.58**, el incremento de carga aumenta progresivamente al incrementar la fragancia pasando de un 14% (proporción 1:2) hasta un 24% (proporción 1:8). Aunque el incremento de la carga fue significativo, seguía siendo muy inferior de los valores teóricos. Además, esto acaba disminuyendo la eficiencia de encapsulación ya que estos valores indican que la mayoría del limoneno no se encapsuló y se perdió por el camino en los distintos procesos (emulsión, síntesis, evaporación o liofilización).

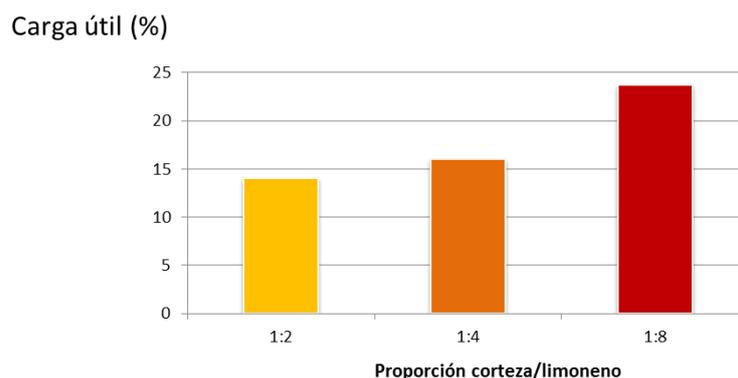


Figura 5.58. Incremento de la carga en función del ratio polímero: fragancia.

➤ *Incremento de la concentración del sistema (polímero y fragancia a la vez)*

Se decidió también aumentar la concentración absoluta tanto de la fragancia como de los polímeros en la fase acuosa inicial. Hasta el momento se usaron concentraciones máximas de polímero de 1% para evitar posibles agregaciones de las cápsulas. En la nueva síntesis se doblaron las cantidades tanto de limoneno como de biopolímeros. El resultado obtenido tras esta variación en las condiciones se consideró satisfactorio por varios motivos. La cantidad de cápsulas localizadas en la fracción superior fue mucho mayor que en los casos precedentes, con muy poco precipitado en la fracción inferior (**Figura 5.59.a**). Además tras purificar (decantación) y liofilizar las cápsulas, se obtuvo una mayor cantidad de sólido. La visualización por SEM del sólido recogido mostró también un material de corteza más grueso, apreciándose cápsulas con largos extremos rugosos por la mayor cantidad de biopolímero (**Figura 5.59.b**). Respecto a los tamaños, las cápsulas parecían mantener la distribución de las otras

síntesis (50-100 μm). La carga de limoneno determinada para este caso específico alcanzó el **42%**, un valor mucho más alto que las síntesis anteriores.

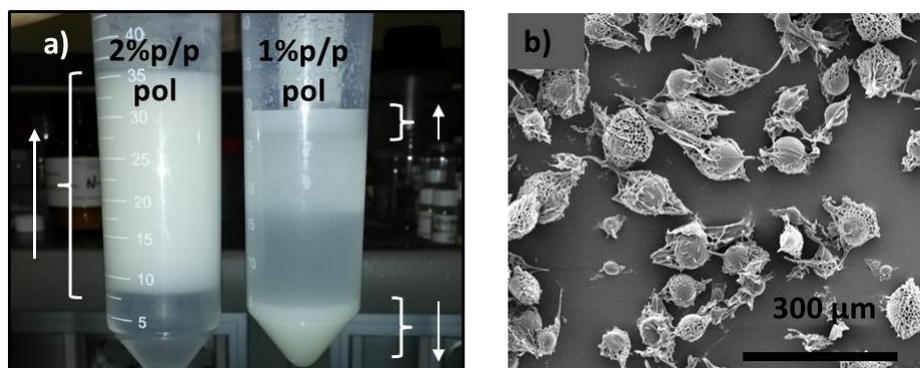


Figura 5.59. a) Diferencias observadas de las suspensiones de cápsulas al 2% p/p y 1% p/p en polímeros con la misma proporción fragancia/polímero; b) imagen SEM de las cápsulas liofilizadas de limoneno al 2% p/p en polímero.

Dado el buen resultado obtenido con el aumento de la concentración absoluta de fragancia y polímeros, también se valoró determinar la eficiencia y el rendimiento de encapsulación del proceso para así establecer una relación con la carga útil obtenida. Para lograr estos datos complementarios, se liofilizaron el conjunto de microcápsulas obtenidas de cada síntesis. Además, demostrado que a estas concentraciones se consiguió una carga útil mayor, se volvió a variar la proporción en peso de polímero/limoneno en distintas síntesis. El resultado de estos experimentos se muestra en la **Figura 5.60**.

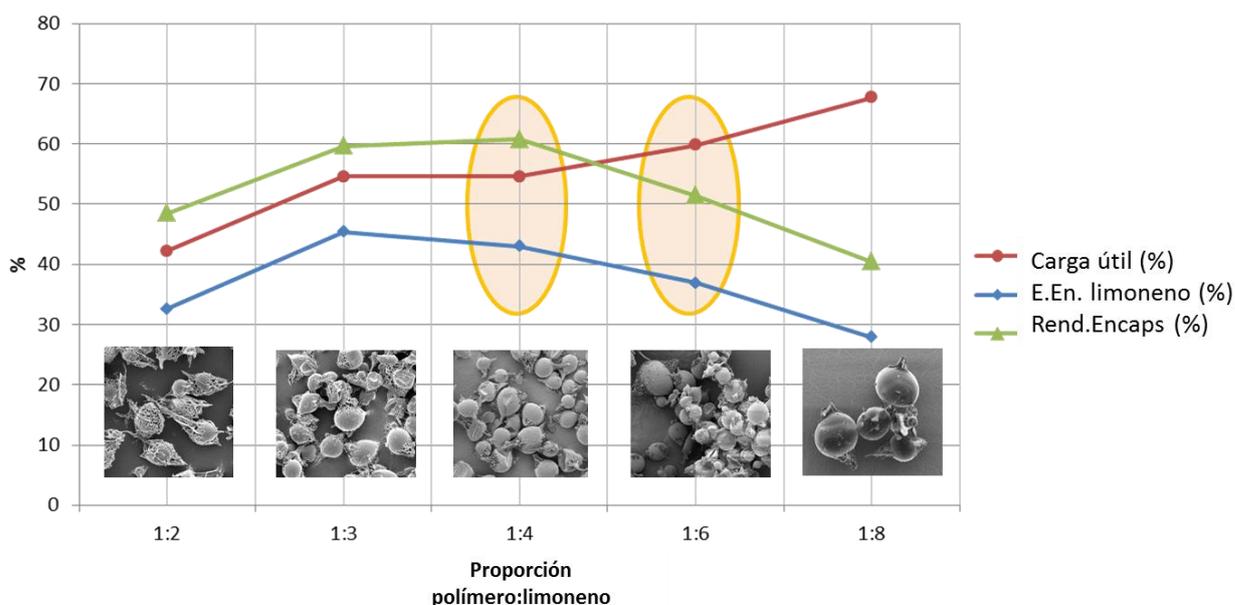


Figura 5.60. Variación de los valores cuantitativos y el aspecto microscópico de cápsulas obtenidas con diferentes proporciones polímero:limoneno con una concentración de polímeros al 2% p/p.

En todas las proporciones de polímero/limoneno se obtuvieron cargas bastante más elevadas de las obtenidas a concentraciones menores, indicando que la cantidad absoluta de biopolímeros es un factor muy relevante para la optimización del proceso. Además, en una relación de 1:8 se alcanzó prácticamente un 70% de carga de limoneno, lo que fue una mejora importante y cercana al objetivo deseado (>80%).

No obstante, las eficiencias y rendimientos de encapsulación no siguieron el mismo patrón que la carga. Si se analizan los datos se puede ver como al principio sí que se produce un incremento de la eficiencia de encapsulación, hasta llegar a un máximo de un 45%, para luego descender continuamente. Para el rendimiento de encapsulación, el máximo corresponde a la síntesis con relación 1:4, por lo que si se añade demasiada fragancia la cantidad recogida de cápsulas respecto a la cantidad teórica va disminuyendo.

Con estos datos se creyó conveniente trabajar en proporciones entre 1:4 y 1:5 para lograr un compromiso entre altas cargas y un rendimiento de encapsulación aceptable. Las condiciones optimizadas se encuentran resumidas en la **Tabla 5.10** y el proceso viene detallado en el **Protocolo CO.1**.

| Condiciones | Valores escala laboratorio (50 g) |
|---|--|
| Solución gelatina (GEL _{sol}) | 25 g (2%) MilliQ® |
| Cantidad de gelatina (GEL) | 0.5 g |
| Solución goma arábica(GA _{sol}) | 25 g (2%) MilliQ® |
| Cantidad de goma arábica(GA) | 0.5g |
| Temperatura | 50°C |
| pH | 4.21 (ajustado con ácido acético 10%p/p) |
| Cantidad de fragancia | 5 g de limoneno |
| Emulsificación | 3.000 rpm (Ultra-Turrax® T25) |
| Enfriamiento | 50-25°C, 30 min /25 - 5°C, 30 min |
| Tiempo de emulsión | 5 min |
| Agitación mecánica | 750 rpm |

Tabla 5.10 Condiciones de partida para las síntesis de cápsulas de limoneno con entrecruzamiento.

Estos estudios demostraron que la carga útil final depende más de las condiciones de síntesis (concentración de polímero y proporción con la fragancia) que de la evaporación de la fragancia durante la síntesis y liofilización posterior.

De hecho, de estas cápsulas con alta carga útil se quiso estudiar la pérdida de la fragancia durante la liofilización para comprobar su estanqueidad. Para ello se escogieron alícuotas líquidas de una síntesis de la proporción 1:4 y se analizaron tras 2, 4, 7, 10 y 14 bajo vacío (liofilización) (**Figura 5.61**).

Como puede comprobarse, la carga de limoneno desciende a partir del cuarto día, hasta valores cercanos al 40%. No obstante, esta cantidad permanece constante hasta catorce días de liofilización lo que certifica que ya no se perdió más material limoneno a pesar de aplicar alto vacío durante tanto tiempo.

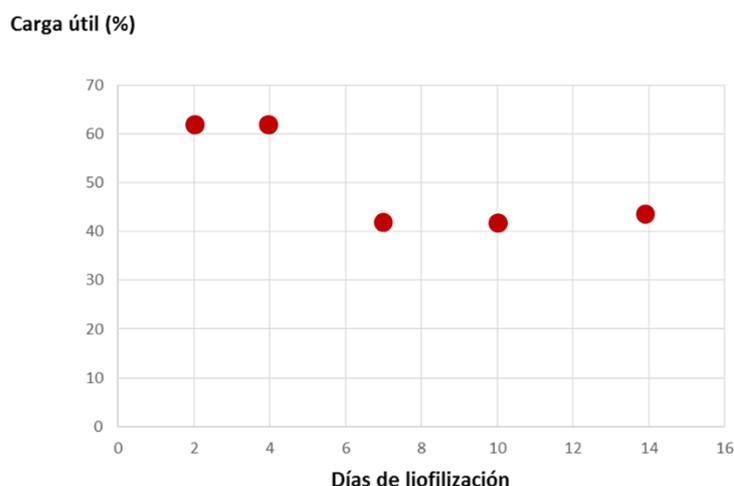


Figura 5.61. Variación de carga en relación a los días de liofilización de cápsulas de limoneno con la proporción de 1:4 y una concentración de 2%p/p de polímeros encapsulantes.

Los próximos estudios de estanqueidad que se plantearon deberían realizarse en muestras ya liofilizadas durante solamente 48 horas, pero posteriormente almacenadas en un recipiente cerrado durante meses para poder determinar la vida útil de este tipo de microcápsulas.

➤ *Entrecruzamiento de la corteza de las cápsulas*

Para mejorar la estabilidad mecánica y la impermeabilidad de la corteza se intentó aplicar un entrecruzamiento o *cross-linking*. Éste es un proceso que se aplica partiendo de las cápsulas sintetizadas y suspendidas en la fase acuosa. Para el estudio de entrecruzamiento se utilizaron las cápsulas de limoneno obtenidas con las condiciones optimizadas (2% polímeros, proporción polímero/fragancia 1:5, **Tabla 5.10**).

Aunque se realizaron algunas pruebas de *cross-linking* con glutaraldehído (el más usado en entrecruzamiento de estos polímeros), la falta de mejora de estanqueidad observada y su toxicidad propició que el estudio estuviera centrado en el ácido tánico (TA).

Para la realización de las pruebas se realizaron previamente disoluciones del ácido tánico, las cuales son de un color ámbar muy característico de los taninos (**Figura 5.62**).



Figura 5.62. Solución al 10%p/p de ácido tánico.

Para la optimización del entrecruzamiento con TA se decidió estudiar los siguientes parámetros a modificar.

➤ *Cantidad de TA en la reacción:*

Debido a su elevado carácter entrecruzante y según lo descrito en la literatura, se propuso usar una cantidad mínima de TA del 10% en peso respecto a la gelatina, que es el polímero más involucrado en la reacción.

➤ *Selección del pH para el entrecruzamiento:*

La reacción del ácido tánico es fuertemente dependiente del pH. Por norma, a pH alcalinos se consiguen enlaces covalentes más resistentes mientras que a pH ácidos se producen interacciones no covalentes de puentes de hidrógeno. Aunque éstas últimas son más débiles, el uso de pH básico no era viable debido a la redisolución de los coacervados que se produciría.

➤ *Tiempo de reacción de entrecruzamiento:*

Aunque en la literatura se reportan tiempos de entrecruzamiento de hasta 24 h, para evitar la ruptura de las cápsulas y la pérdida del limoneno se optó por periodos más cortos (3-12 h) y a bajas revoluciones (150 rpm).

A continuación en la **Tabla 5.11** se resumen los experimentos de entrecruzamiento con el uso de TA.

| Cantidad TA vs GEL | pH | Adición | Orden de modificación | Condiciones | Comentarios |
|--------------------|-----|----------------|---------------------------|---------------|---------------------------------------|
| 10% | 4.1 | <i>In-situ</i> | - | 5 °C 3h | Agregación excesiva de las cápsulas |
| 10% | 4.1 | Gradual | - | 5 °C 3 h | Ligera compresión, algo de agregación |
| 20% | 4.1 | Gradual | - | 5 °C 3h | Agregación |
| 40% | 4.1 | Gradual | - | 5 °C 3h | Compresión excesiva de la cápsula |
| 10% | 8-9 | Gradual | 1.NH ₃ 2.TA | 25 °C 3h | Coloración verde y agregación |
| 5% | 7 | Gradual | 1. NaOH 2.TA | 20 °C 12 h | N.D. |

Tabla 5.11. Condiciones y resultados de entrecruzamiento con ácido tánico de cápsulas de limoneno.

De manera general, tras la adición de ácido tánico sobre la suspensión de cápsulas, se manifiesta un pequeño aumento de la viscosidad y un cambio en la tonalidad del color, pasando de blanco a amarillo pálido. También se observó una tendencia a la floculación de las cápsulas (**Figura 5.63.a**). Una posible causa podría ser que las aminas terminales del polímero entrecuzaran y por lo tanto disminuyera la carga total de las microcápsulas (positiva en este caso). Por otro lado, la presencia de polímero no estructurado en solución (en suspensiones no purificadas completamente) dio lugar a un precipitado que enturbió la suspensión. Este precipitado también fue fruto de la reacción con ácido tánico (**Figura 5.63.b**).

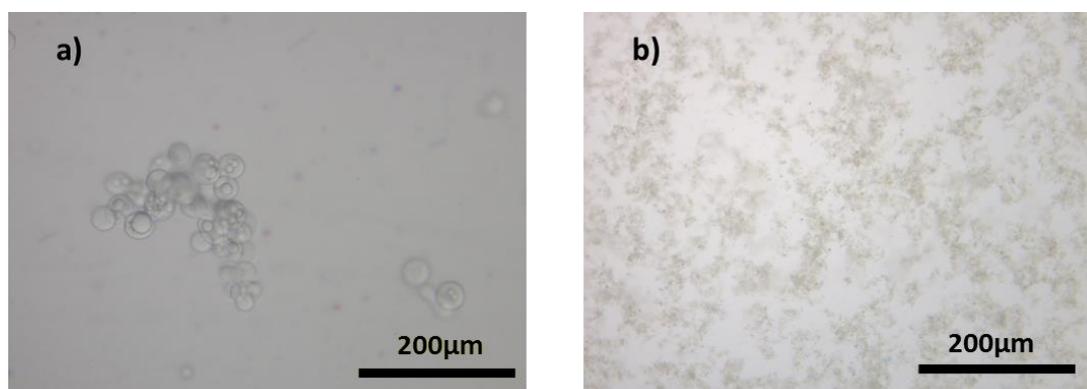


Figura 5.63. Imágenes de microscopio óptico de ensayos con TA como agente entrecruzante. a) Floculación de cápsulas tras la adición de TA; b) Suspensión de polímero precipitado de polímero no estructurado en solución tras reaccionar con TA.

Tras el entrecruzamiento, las cápsulas se liofilizaron y se analizaron. A nivel macroscópico el polvo obtenido presentaba un aspecto de polvo más fino y suelto con una ligera coloración amarillenta debido a la reacción con TA. El análisis cuantitativo por $^1\text{H-RMN}$ de las mejores cápsulas obtenidas mostró un ligero incremento de la carga de limoneno respecto a las cápsulas sin tratar como se muestra en la **Figura 5.64**.

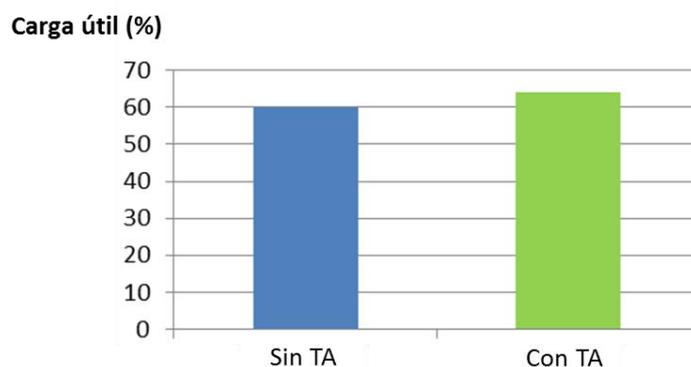


Figura 5.64. Cantidad de carga de limoneno determinada para cápsulas tratadas con TA como agente entrecruzante frente a las cápsulas sin tratar.

En los experimentos de entrecruzamiento de las cápsulas se fue incrementando la cantidad de ácido tánico para determinar si se podía mejorar la estanqueidad. En la **Figura 5.65** se muestra la tendencia de los valores cuantitativos respecto a los diferentes grados de entrecruzamiento.

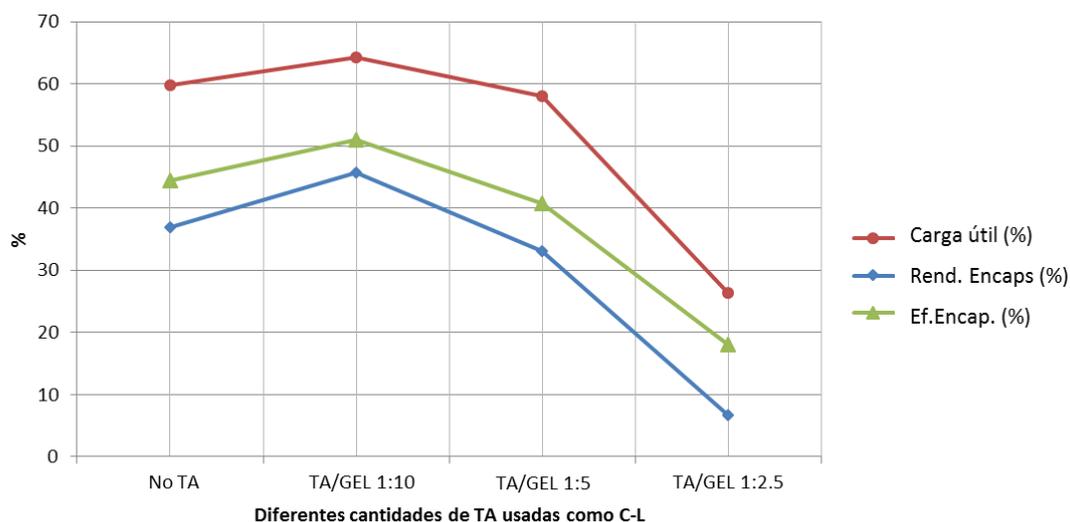


Figura 5.65. Datos cuantitativos de las cápsulas endurecidas con ácido tánico a diferentes proporciones

Como se puede apreciar, las condiciones que dieron cápsulas con mayor carga útil, rendimiento y eficiencia de encapsulación fueron las que se entrecruzaron con una relación TA/gelatina de 1:10. El efecto del aumento del ácido tánico también se observó por microscopio óptico y SEM (**Figura 5.66**).

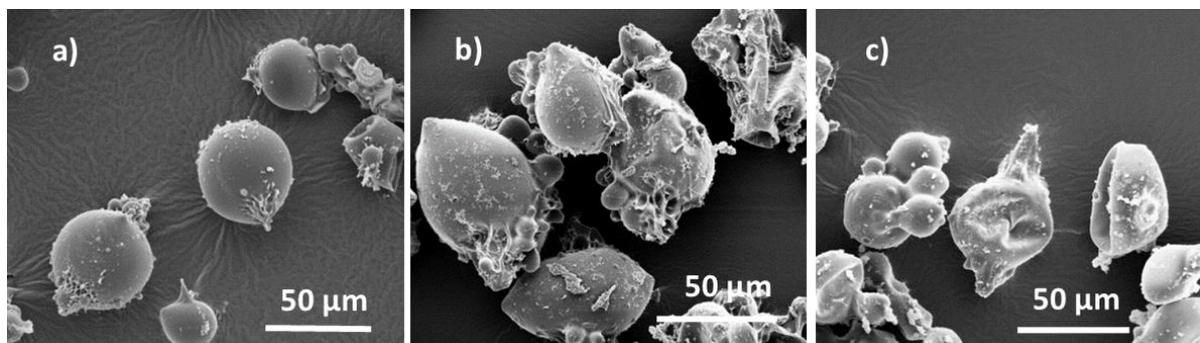


Figura 5.66. Imágenes SEM de cápsulas de limoneno con diferentes grados de entrecruzamiento con TA: **a)** Relación 1:10 TA/GEL; **b)** Relación 1:5 TA/GEL; **c)** Relación 1:2.5 TA/GEL.

Las cápsulas entrecruzadas con TA presentaban menos rugosidad en la superficie, sobre todo en las extremidades, y se asumió como indicación de un mayor endurecimiento generado en la corteza. Además, el incremento de TA añadido produjo una deformación de las cápsulas originando una forma ovalada. La ruptura de cápsulas observada para proporciones TA/GEL más altas (**Figura 5.66.b y 5.66.c**) coinciden con la disminución de carga útil, eficiencia y rendimiento de encapsulación. La hipótesis más probable fue que la deformación y/o ruptura de las microcápsulas fue provocada por la excesiva contracción del polímero durante el entrecruzamiento (**Figura 5.67**).

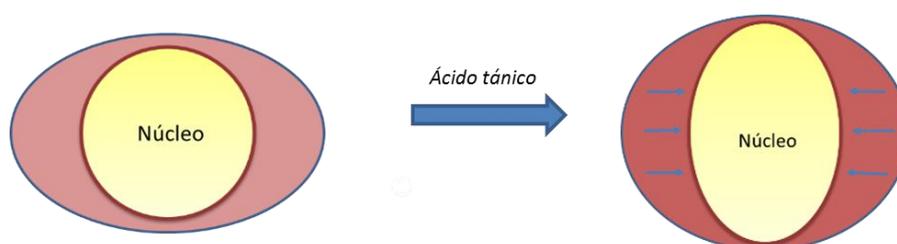


Figura 5.67. Representación esquemática de la contracción de la corteza por efecto del ácido tánico.

Por otro lado, los experimentos realizados con TA a pH básicos para promover el entrecruzamiento de tipo covalente no fueron satisfactorios, ya que se formaron agregados irreversibles en todos los casos. Además, el cambio de color de amarillo claro a verde oscuro era indicación de la polimerización del TA así que se decidió abandonar este método.

5.4.4. Reducción del tamaño de cápsulas de limoneno

Uno de los mayores retos que se planteó después de optimizar el método de síntesis y purificación de cápsulas mediante la técnica de coacervación, fue la reducción de tamaño de la misma manera que también se realizó en los dos métodos de encapsulación previos (**Capítulos 3 y 4**). Las cápsulas obtenidas hasta ahora superaban las 50 μm en todos los casos, siendo el objetivo principal conseguir tamaños inferiores a estos diámetros.

A continuación se describen las estrategias de optimización sugeridas y realizadas para obtener este tipo de cápsulas. Como punto de partida se tomaron las condiciones optimizadas para la síntesis de cápsulas de limoneno (**Tabla 5.10**) variando la velocidad de emulsificación para lograr tamaños de gota ($\leq 25 \mu\text{m}$).

➤ *Velocidad de agitación en la etapa de gelificación*

En las síntesis donde se realizaron emulsiones de la fragancia con un tamaño de gota menor ($< 25 \mu\text{m}$) la tendencia del sistema fue producir cápsulas multinucleares de igual manera que pasaba con la encapsulación del Miglyol. Esta agregación de los polímeros se produce sobretodo durante el proceso de gelificación por lo que se creyó conveniente agitar el sistema a una velocidad mayor. Para ello se realizaron pruebas a altas revoluciones, llegando hasta 1500 rpm. El resultado, no obstante, no fue el deseado. Ciertamente, las cápsulas alcanzaron tamaños menores (hasta 20 μm), pero el resultado fue en todos los casos estructuras multinucleares (**Figura 5.68.a**).

➤ *Velocidad de enfriamiento en la etapa de gelificación*

Otro de los factores determinantes en la etapa de gelificación es la temperatura. Una de las modificaciones planteadas consistió en inducir la gelificación más rápidamente para endurecer la corteza antes que hubiera agregación entre gotas recubiertas con el polímero lábil. Desafortunadamente el hecho de enfriar mucho más rápido no evitó la formación de estructuras multinucleares. En el mejor de los casos se obtuvieron cápsulas multinucleares de 50 μm (**Figura 5.68.b**).

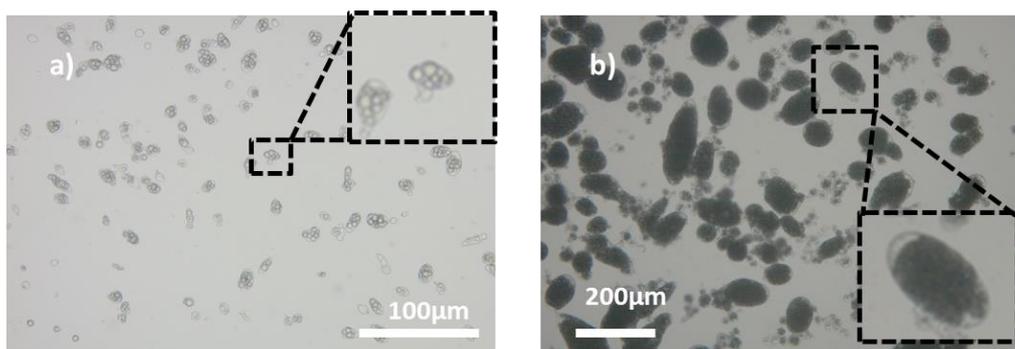


Figura 5.68. Imágenes de microscopio óptico de: a) microcápsulas de limoneno obtenidas mediante gelificación a 1500 rpm; b) microcápsulas multinucleares de limoneno obtenidas tras la gelificación con un descenso acelerado de la temperatura (5°C/min). La dificultad para distinguir las gotas en este caso es alta, observándose un gran contraste.

➤ *Incremento de las fuerzas repulsivas mediante la adición de aditivos*

Para evitar el contacto entre gotas en la etapa de gelificación se intentó añadir aditivos que impidieran este proceso. Por un lado se intentó usar tensioactivos (iónicos y no iónicos) para estabilizar la emulsión de la fragancia y la posterior cápsula, pero como ya se vió en la optimización de microcápsulas de aceite (ver **apartado 5.3.1.6**), no se obtuvo ningún tipo de mejora en la desagregación, generando además interacciones competitivas con los coacervados.

Por otro lado, se decidió añadir un espesante para aumentar la viscosidad de la suspensión que podría disminuir la tendencia a la agregación de las gotas. Para este tipo de prueba se seleccionó la goma de xantano (XG) por su alto poder espesante a bajas concentraciones y por su inocuidad. Esta adición resultó en una mala formación de coacervados y por lo tanto una mala encapsulación. La goma de xantano es un polielectrolito que tiene carga negativa también a pH ácidos por lo que pudo interferir en la atracción de los dos biopolímeros de corteza.

➤ *Cambios en la proporción fragancia-polímero*

Se aumentó la cantidad de fragancia hasta lograr una relación de 1:4 y 1:6 (polímero/fragancia), condiciones que no se había aún probado para tamaños de gota <25 µm. La idea fue crear un déficit de polímero respecto a la mayor superficie de gotas generadas y así evitar la agregación y generación de cápsulas multinucleares. No obstante, en ningún caso se consiguieron cápsulas aisladas, sino que se volvieron a obtener cápsulas con estructura multinuclear. Además, estos agregados, debido a la menor cantidad de polímero para cubrir la mayor superficie de contacto generada, mostraban muchas cavidades abiertas y sin líquido en el exterior (**Figura 5.69**).

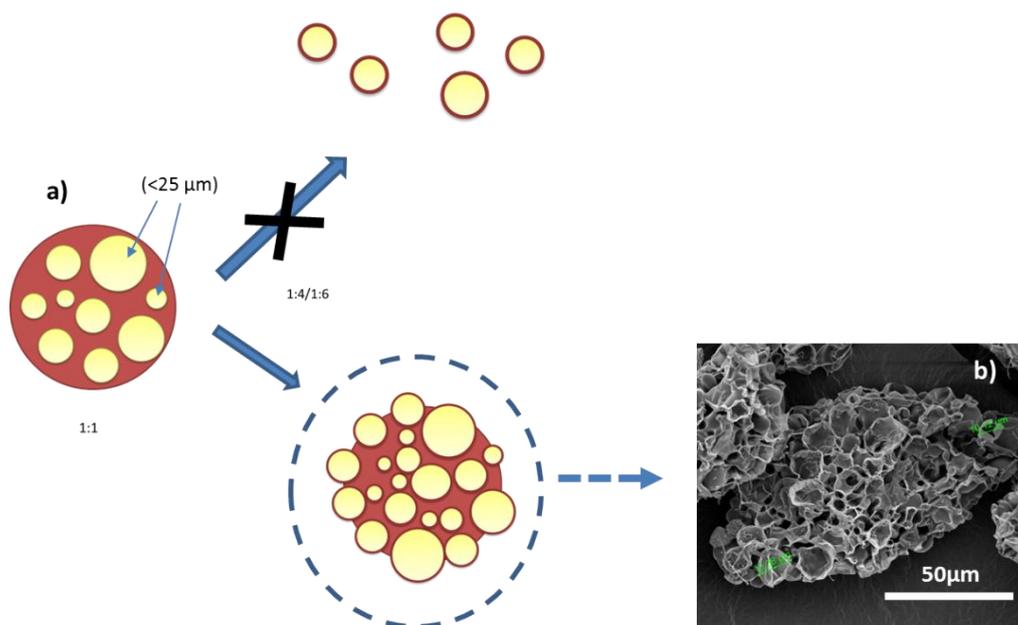


Figura 5.69. a) Representación gráfica del resultado obtenido en el incremento de fragancia respecto al polímero con gotas de menor tamaño; b) imagen SEM de las cápsulas obtenidas de la proporción polímero/fragancia 1:6.

Posteriormente se determinó la carga de estas cápsulas y el resultado fue un valor muy bajo ($\approx 25\%$), probablemente debido al elevado número de cavidades rotas en la superficie de la cápsula

➤ *Dilución de la mezcla tras la coacervación*

Para evitar el proceso de agregación durante la gelificación se decidió diluir el sistema inmediatamente después de la formación de los coacervados. Así pues, tras inducir la coacervación con el pH, se añadió una cantidad de agua destilada hasta doblar el volumen de la mezcla. El resultado de esta dilución fue el de una agregación más evidente de las gotas, incluso mayor que la agregación observada sin aplicar esta dilución.

➤ *Incremento de la concentración de los componentes (polímeros y fragancias)*

Para estas modificaciones se partió de las condiciones de síntesis para la encapsulación de limoneno donde se obtiene un alto valor de carga, en este caso, una relación polímero/fragancia 1:6, con la diferencia que las cantidades tanto de polímero como de fragancia se fueron incrementando progresivamente manteniendo constante la proporción entre ellos. Los experimentos más relevantes realizados con estas variaciones están reportados en la **Tabla 5.12**.

| Componente | Cápsulas | Modificación | Modificación | Modificación | Modificación |
|--------------------------------|---------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | Mononucleares ($>50\mu\text{m}$) | 1 | 2 | 3 | 4 |
| GEL_{sol} | 2% p/p | 3% p/p | 4% p/p | 4% p/p | 4% p/p |
| GA_{sol} | 2% p/p | 3% p/p | 4% p/p | 4% p/p | 4% p/p |
| Fragancia | 6g | 9g | 12g | 12g | 8g |
| Agua | 50g | 50g | 50g | 50 g | 50g |
| Vel.Agitación (rpm) | 3.000 | 3.000 | 3.000 | 10.000 | 10.000 |
| Total material | 56g | 59g | 62g | 62 | 56 |
| Proporción Pol/LIM | 1:6 | 1:6 | 1:6 | 1:6 | 1:4 |

Tabla 5.12. Experimentos realizados para el incremento de la concentración de los componentes.

Como puede apreciarse, los experimentos se hicieron en 2 regímenes de agitación, para conocer el efecto del aumento de las concentraciones absolutas de los componentes en las emulsiones con gotas de distintos tamaños. Tras las modificaciones experimentales reportadas en la tabla se observaron los siguientes cambios:

La **modificación 1** mostró que aumentando la concentración de polímeros al 3% en peso y la fragancia a 9 g, no se produjo ningún cambio aparente en las dimensiones de las cápsulas.

En la **modificación 2** al aumentar la concentración de polímeros al 4% y la fragancia hasta los 12 gramos, las gotas más pequeñas de la suspensión estaban mejor estabilizadas ya que no se apreciaba coalescencia durante las primeras etapas de la síntesis. Durante el proceso de enfriamiento se produjo en este caso un aumento destacable de la viscosidad a partir de 20-25 °C. Al finalizar la síntesis la suspensión resultó ser mucho más viscosa que las obtenidas hasta el momento y al observar una fracción a través del microscopio óptico se pudo apreciar homogeneidad de la muestra y la formación de cápsulas mononucleares. Además, tras diluir la muestra con agua para poder observar las cápsulas a través del microscopio, tampoco se observó agregación. El hecho más relevante de esta síntesis fue el haber detectado la presencia de cápsulas de limoneno pequeñas ($<25\mu\text{m}$) y totalmente aisladas. Al tratarse de condiciones de emulsificación blandas (3.000 rpm) la mezcla de cápsulas en general tenía tamaño $\geq 50\mu\text{m}$ pero la presencia de una pequeña proporción de cápsulas de menor tamaño aisladas fue algo que no se había observado hasta el momento.

Este resultado fue muy importante ya que en todos los experimentos realizados anteriormente, las gotas más pequeñas generadas en la emulsión tendían a agregarse a las gotas más grandes en el

proceso de gelificación (**Figura 5.70.a**). En cambio, en este caso todas las gotas, grandes ($\geq 50 \mu\text{m}$) o pequeñas (≤ 25), tenían su propia corteza y no se produjo agregación (**Figura 5.71.b**). El aumento de concentración de los componentes se reveló muy importante para la estabilización de las gotas durante todo el proceso de síntesis de las cápsulas, también en las de tamaño inferior.

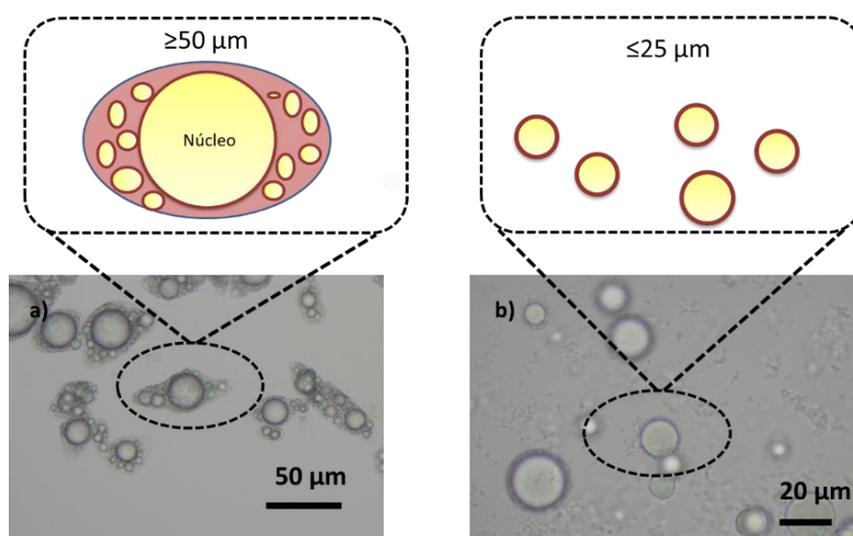


Figura 5.71. Imágenes de microscopio óptico de: a) Cápsulas de limoneno donde se observa la agregación de gotas pequeñas alrededor de las gotas de más grandes en concentraciones de 2%p/p en polímeros; b) presencia de cápsulas pequeñas aisladas obtenidas con concentraciones de 4%p/pp de polímeros.

Tras los resultados observados, en la **modificación 3** se decidió incrementar la velocidad de emulsificación (10.000 rpm) para obtener gotas de menor tamaño manteniendo esta nueva concentración de los componentes (4% polímeros y proporción 1:6). De la misma manera que en la anterior síntesis, no se observó la agregación de las gotas de fragancia en las fases iniciales de la coacervación. No obstante, el problema se produjo al alcanzar la temperatura de gelificación. El aumento de la viscosidad fue tal que bloqueó la agitación magnética y el sistema se volvió un gel imposible de redispersar.

La explicación para esto fue que el aumento del área superficial generada por las gotas de fragancia y la gran cantidad de polímero favoreció la gelificación del polímero entre gotas, no permitiendo la formación de cápsulas aisladas y correctamente formadas.

Finalmente, para solucionar la tendencia a la gelificación de toda la mezcla y favorecer la formación de gotas pequeñas estables y aisladas en la **modificación 4** se redujo la cantidad de fragancia hasta los 8 gramos, estableciendo una proporción 1:4 de polímero/fragancia.

La síntesis de cápsulas bajo estas nuevas condiciones de concentración dio lugar a cápsulas mononucleares, aisladas y de tamaño inferior a $20 \mu\text{m}$ (**Figura 5.72**).

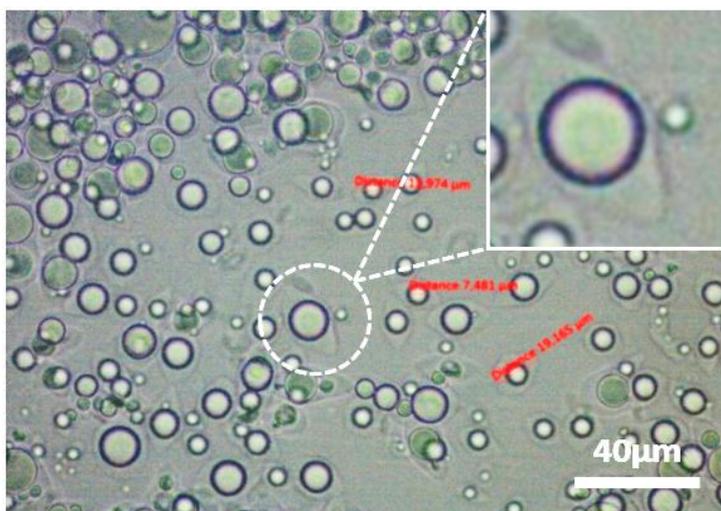


Figura 5.72. Imagen de microscopio óptico de cápsulas de limoneno de tamaño reducido preparadas según la **modificación 4**.

Estas condiciones se aplicaron también para la encapsulación del aceite Miglyol para comprobar la reproducibilidad de este nuevo comportamiento y el resultado fue nuevamente la obtención de cápsulas aisladas de tamaño de $<20 \mu\text{m}$.

Se realizó también un análisis de distribución de tamaño por difracción láser para determinar el grado de disminución de tamaño alcanzado. En las reacciones más reproducibles con el limoneno, los tamaños oscilaron desde 1 a 50 micras, siendo la media alrededor de 10-12 μm (**Figura 5.73**). Esta medida confirmó que se pudo reducir prácticamente un orden de magnitud los tamaños en las nuevas cápsulas.

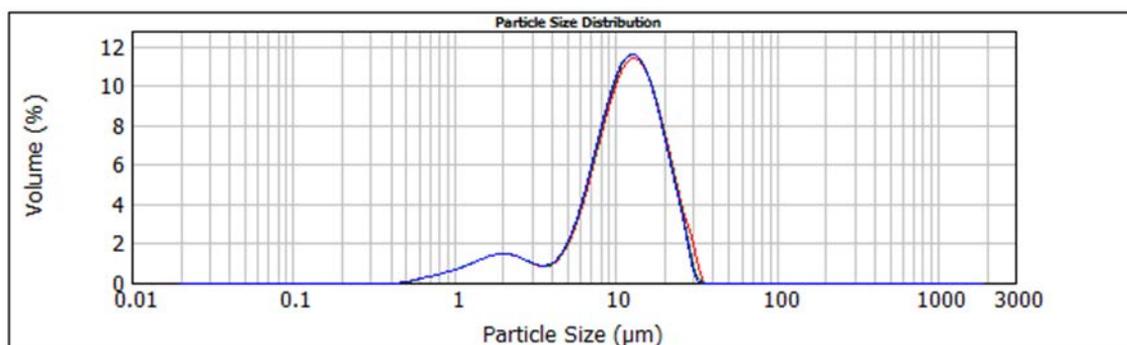


Figura 5.73. Distribución de tamaño de cápsulas de limoneno preparadas según la **modificación 4**.

Una fracción de la muestra se liofilizó para su análisis posterior por $^1\text{H-RMN}$, pero a diferencia de las cápsulas de mayor tamaño de limoneno ($>50 \mu\text{m}$), en este caso no fue posible obtener un polvo fino tras la liofilización sino que la apariencia era de un sólido agregado, probablemente debido a una mayor tendencia a la agregación al secarse, como se pudo también apreciar por SEM (**Figura 5.74**).

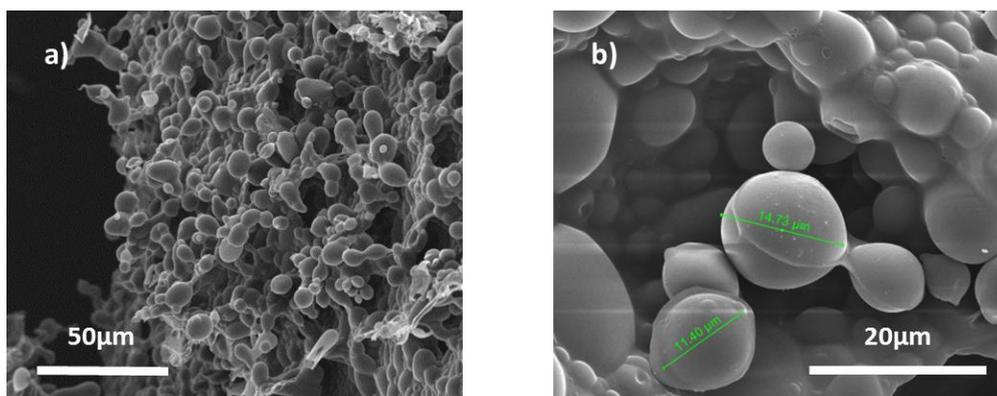


Figura 5.74. Imágenes SEM de: a) Sólido liofilizado agregado de cápsulas de limoneno; b) grupo de cápsulas aisladas dentro del agregado.

Tras la caracterización morfológica de este sólido, se determinó la carga con el método descrito para las cápsulas mononucleares de mayor tamaño. El resultado obtenido se comparó con los valores obtenidos en los otros tipos de cápsulas obtenidas por coacervación durante el proyecto (**Tabla 5.13**).

| Tipo de cápsulas obtenidas por coacervación compleja | Rango de carga útil determinada | Proporción polímero/fragancia |
|--|---------------------------------|-------------------------------|
| Cápsulas mononucleares (>50 μm) | 70-85% | 1:6 |
| Cápsulas multinucleares | 50-60% | 1:2 |
| Cápsulas mononucleares (<50 μm) | 45-50% | 1:4 |

Tabla 5.13. Comparativa de cargas de cápsulas optimizadas de limoneno.

Las cápsulas obtenidas en este caso ofrecen una carga inferior de limoneno que las de mayor tamaño. Parte de esa disminución puede ser debido a que al reducir el tamaño, la fragancia se encuentra en menor proporción.

Tras estos resultados se pudieron establecer unas condiciones de partida para la encapsulación de aceites y fragancias simples para dar lugar a cápsulas de tamaño inferior a 50 μm. Estas síntesis vienen detalladas en el **Protocolo CO.3** y en la **Tabla 5.14**.

| Condiciones | Valores escala laboratorio (50 g) |
|---|---|
| Solución gelatina (GEL _{sol}) | 25 g (4%) MilliQ® |
| Cantidad de gelatina (GEL) | 1 g |
| Solución goma arábica(GA _{sol}) | 25 g (4%) MilliQ® |
| Cantidad de goma arábica(GA) | 1g |
| Temperatura | 50°C |
| pH | 4.21 (Ajustado con ácido acético 10 %p/p) |
| Cantidad de fragancia/aceite | 8 g |
| Emulsificación | 8.000 rpm (Ultra-Turrax® T25) |
| Enfriamiento | 50-25°C, 30 min/25 - 5°C, 30 min |
| Tiempo de emulsificación | 5 min |
| Agitación mecánica | 1000 rpm antes de gelificación, 750 rpm tras gelificación |

Tabla 5.14. Condiciones de síntesis de cápsulas de tamaño reducido para limoneno y Miglyol

5.5. Encapsulación de fragancia compleja

Tras optimizar la síntesis de microcápsulas de Miglyol y limoneno con el método de coacervación, se realizó la encapsulación de la fragancia compleja Tropical Fruit P780765 (TROPICAL) previamente encapsulada con las otras técnicas. Para la encapsulación se escogieron las últimas condiciones establecidas para la síntesis de cápsulas mononucleares de tamaño reducido (<25µm) **Tabla 5.14**.

Tras aplicar estas condiciones la síntesis se llevó a cabo con éxito obteniéndose microcápsulas de TROPICAL de tamaño ≈20 µm mononucleares. Morfológicamente, estas microcápsulas no presentaban forma alargada. Esto se atribuyó a la mayor viscosidad del medio, que impidió un mayor movimiento del coacervado lábil. Para comprobar que no se producía evaporación del núcleo, como en el caso de la fragancia APPLE, se dejó reposar la suspensión durante 24 horas y transcurrido este tiempo se volvió a visualizar por microscopía óptica donde se verificó una correcta retención de la fragancia (**Figura 5.75**).

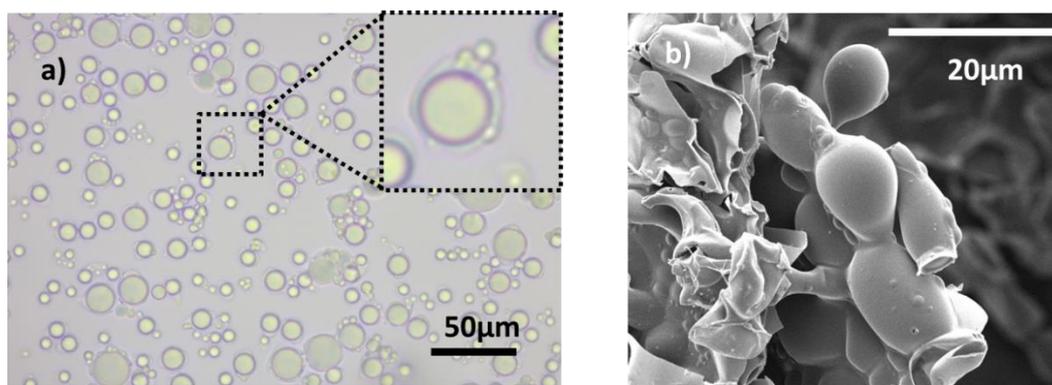


Figura 5.75. a) Imagen de microscopio óptico de cápsulas TROPICAL obtenidas por coacervación tras 24 h; b) Imagen de SEM de cápsulas liofilizadas de TROPICAL.

Una fracción de la muestra liofilizada se analizó a continuación con la técnica de ^1H -RMN, cuyo espectro se comparó con la fragancia original usando DMF como patrón interno. Mediante la comparación del espectro de las cápsulas liofilizadas y el de la fragancia libre, se pudo apreciar un alto grado de similitud entre los dos espectros, indicación que la mayoría de los compuestos fueron encapsulados y retenidos con éxito (**Figura 5.76**).

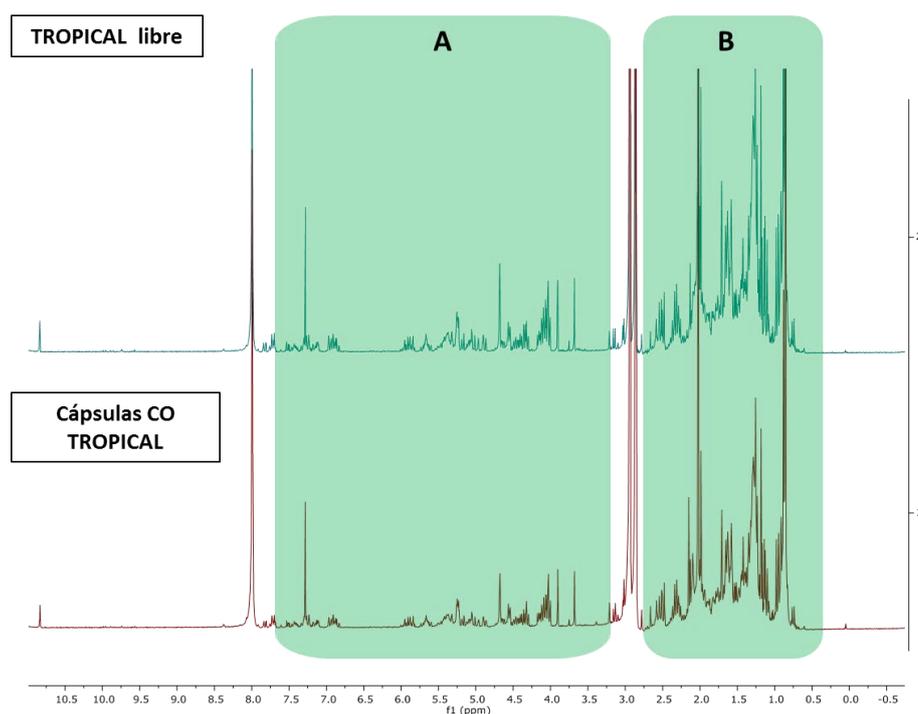


Figura 5.76. Espectros ^1H -RMN de la fragancia TROPICAL libre y encapsulada por coacervación compleja. En verde se marcan las regiones donde se localizan los picos correspondientes a la fragancia.

Mediante la comparativa de ambos espectros y tomando como referencia la DMF, se pudo estimar una carga útil aproximada de un **60%** (**Tabla 5.15**).

| Muestra | Patrón añadido | Cantidad de muestra añadida | Integrales de fragancia |
|-----------------|----------------|-----------------------------|-------------------------|
| Fragancia libre | 15 µl | 30 µl | A= 3.14 / B= 14.77 |
| Cápsulas | 15 µl | 30 mg | A= 1.94/ B= 8.57 |

Tabla 5.15. Valores de carga útil mediante la comparación de los espectros de ¹H-RMN.

Para determinar la proporción de cada compuesto de la fragancia en el interior de las cápsulas se realizó el correspondiente análisis por cromatografía de gases, con previa ruptura de las cápsulas con acetona. El cromatograma correspondiente a las muestras liofilizadas se muestra a continuación (Figura 5.77).

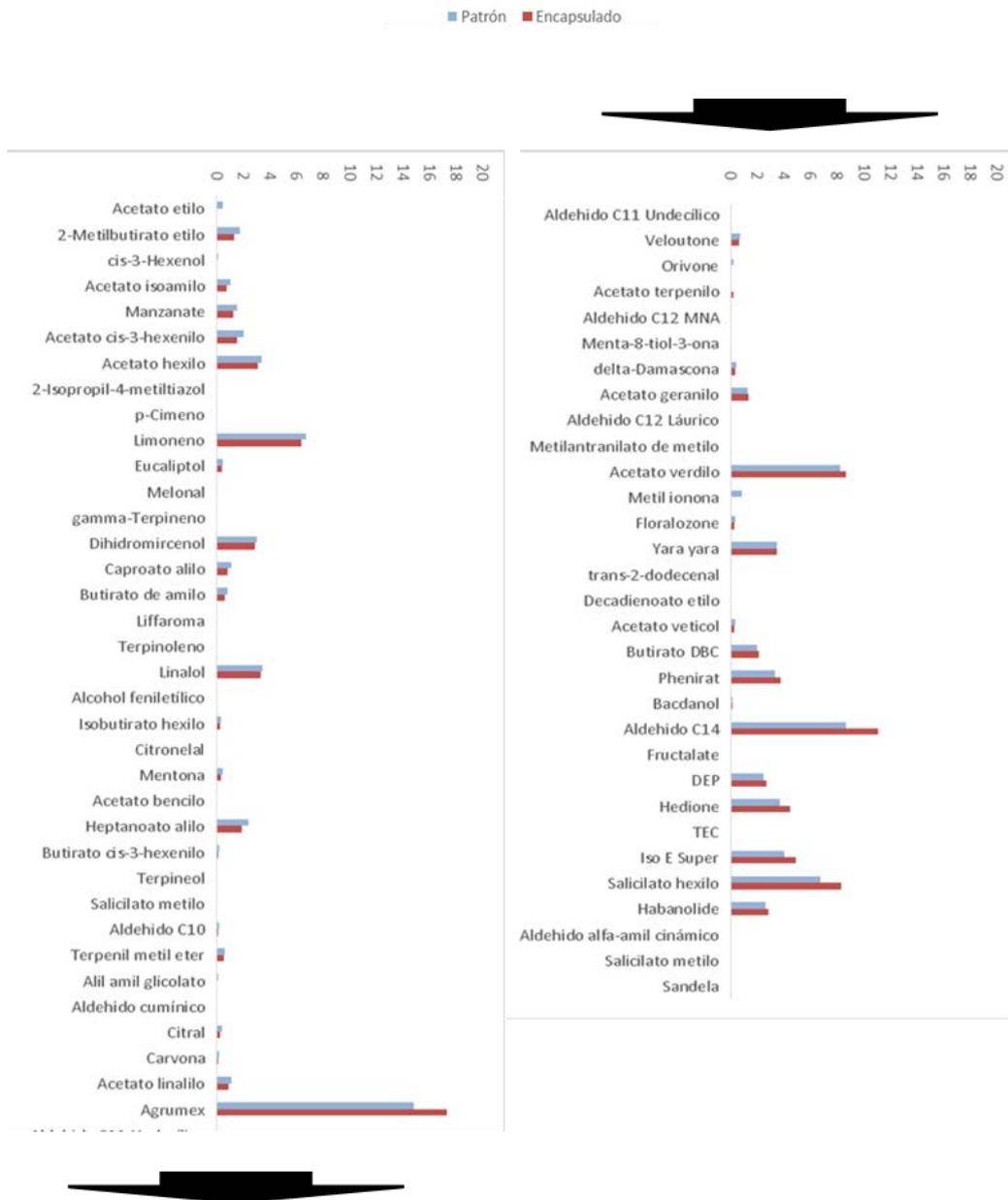


Figura 5.77. Resultados GC-MS de las cápsulas de fragancia TROPICAL en comparación con la formulación de la fragancia libre.

Mediante cromatografía de gases se pudo confirmar que la mayoría de los compuestos detectados en la fragancia libre se encontraron también en las cápsulas liofilizadas. En el caso de los primeros componentes que aparecen en el cromatograma, es decir, los más volátiles, la proporción se vio disminuida. Esto es indicación de que en este tipo de cápsulas los compuestos más volátiles no se retuvieron de igual manera que los menos volátiles. Parte de esta pérdida podría ser debida a la posible porosidad de la corteza de las cápsulas a pesar de tener una alta rigidez tras el liofilizado.

5.6. Conclusiones y futuro trabajo

Los logros alcanzados en el desarrollo de este capítulo se resumen de la siguiente manera:

- Se ha encapsulado de manera satisfactoria Miglyol®812, limoneno y la fragancia Tropical Fruit P780765 por coacervación compleja usando goma arábica y gelatina como materiales de corteza.
- Se han desarrollado cápsulas con distintas estructuras internas (mono- y multinucleares) y de distintos tamaños desde 200 hasta 15 μm .
- El máximo valor de carga útil obtenido se situó en 80% para cápsulas de Miglyol, 70% para cápsulas de limoneno y 60% para cápsulas de la fragancia Tropical Fruit P780765.
- Se han realizado pruebas preliminares de entrecruzamiento con ácido tánico observándose una ligera mejora en el valor de carga útil de la cápsula (+3%).

El futuro trabajo dedicado en este tipo de metodología de encapsulación debería ir enfocado en las siguientes líneas de investigación:

- Optimización del proceso de entrecruzamiento con ácido tánico.
- Encapsulación de nuevas formulaciones complejas por coacervación compleja.
- Estudios de TGA y DSC para determinar la estabilidad de las cápsulas y su resistencia térmica.
- Estudios de biodegradabilidad y biocompatibilidad de las microcápsulas sintetizadas.

5.7. Referencias

- [1] de Kruif, C. G.; Weinbreck, F.; de Vries, R. Complex Coacervation of Proteins and Anionic Polysaccharides. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2004**, *9* (5), 340–349.
- [2] Lusson, A. Collagen...Miracle or Mit, <http://aimeelusson.com/2017/06/08/collagen-miracle-or-myth/> (última visita 29 de enero de 2019).
- [3] Duconseille, A.; Astruc, T.; Quintana, N.; Meersman, F.; Sante-Lhoutellier, V. Review. *Food Hydrocoll.* **2015**, *43* (Complete), 360–376.
- [4] T Bloom, O. Machine for testing jelly strength of glues, gelatins, and the like. US1540979, April 11, 1923.
- [5] Muller, D.; Okoro, C. *Production and Marketing of Gum Arabic*. NGARA Publication Series 2, September, 2004.
- [6] Rahim, A. H.; Van Ierland, E. C.; Weikard, H. P. Competition in the Gum Arabic Market: A Game Theoretic Modelling Approach. *Q. J. Int. Agric.* **2010**, *49* (1), 1–24.
- [7] Jayme, M. L.; Dunstan, D. E.; Gee, M. L. Zeta Potentials of Gum Arabic Stabilized Oil in Water Emulsions. *Food Hydrocoll.* **1999**, *13*, 459–465.
- [8] Lv, Y.; Zhang, X.; Abbas, S.; Karangwa, E. Simplified Optimization for Microcapsule Preparation by Complex Coacervation Based on the Correlation between Coacervates and the Corresponding Microcapsule. *J. Food Eng.* **2012**, *111* (2), 225–233.
- [9] Chollakup, R.; Smitthipong, W.; Eisenbach, C. D.; Tirrell, M. Phase Behavior and Coacervation of Aqueous Poly (acrylic acid) – Poly (allylamine) Solutions. *Macromolecules* **2010**, *43* (5), 2518–2528.
- [10] Olde Damink, L. H. H.; Dijkstra, P. J.; Van Luyn, M. J. A.; Van Wachem, P. B.; Nieuwenhuis, P.; Feijen, J. Glutaraldehyde as a Crosslinking Agent for Collagen-Based Biomaterials. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1995**, *6* (8), 460–472.

- [11] Hirakawa, H.; Kamiya, N.; Tanaka, T.; Nagamune, T. Intramolecular Electron Transfer in a Cytochrome P450cam System with a Site-Specific Branched Structure. *Protein Eng. Des. Sel.* **2007**, *20* (9), 453–459.
- [12] Strauss, G.; Gibson, S. M. Plant Phenolics as Cross-Linkers of Gelatin Gels and Gelatin-Based Coacervates for Use as Food Ingredients. *Food Hydrocoll.* **2004**, *18* (1), 81–89.
- [13] Mi, F.-L.; Sung, H.-W.; Shyu, S.-S.; Su, C.-C.; Peng, C.-K. Synthesis and Characterization of Biodegradable TPP/genipin Co-Crosslinked Chitosan Gel Beads. *Polymer (Guildf)*. **2003**, *44* (21), 6521–6530.
- [14] G., L. C. Y.; M., M. F.; J., Z. N. Control of the Morphology and the Size of Complex Coacervate Microcapsules during Scale-up. *AIChE J.* **2009**, *55* (6), 1487–1496.
- [15] Yeo, Y.; Bellas, E.; Firestone, W.; Langer, R.; Kohane, D. S. Complex Coacervates for Thermally Sensitive Controlled Release of Flavor Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (19), 7518–7525.
- [16] Palmieri, G. F.; Lauri, D.; Martelli, S.; Wehrle, P. Methoxybutropate Microencapsulation by Gelatin-Acacia Complex Coacervation. *Drug Dev Ind Pharm* **1999**, *25* (4), 399–407.
- [17] Siow, L.-F. Effect of pH on Garlic Oil Encapsulation by Complex Coacervation. *J. Food Process. Technol.* **2012**, *4* (1), 1–5.

Capítulo 6.

Escalado de los Métodos de Encapsulación

6.1. Introducción

Para todos los productos con potencial salida comercial, su fabricación debe ser escalable. Esto se aplica también para las microcápsulas de fragancias obtenidas a lo largo de esta tesis, cuya optimización ha sido llevada a cabo a escala laboratorio (50-150 g de suspensión por síntesis).

Desde un punto de vista económico, las síntesis de las cápsulas descritas en los capítulos anteriores se han desarrollado con materiales de partida de alta disponibilidad comercial que garantiza precios competitivos y que no encarecen excesivamente la encapsulación de las fragancias formuladas por la compañía. No obstante, es posible que adaptar las síntesis de escala laboratorio a mayor volúmenes requiera no sólo aumentar proporcionalmente las cantidades de material a usar sino también la adaptación de los métodos de agitación, de calentamiento-enfriamiento o de procesos de adición y purificación. Esta fase del proyecto por lo tanto ha servido para comprobar la factibilidad de las síntesis de cápsulas a escalas mayores (0.8-3 Kg).

En algunos casos la optimización del proceso de escalado ha requerido diferentes etapas en que se han usado reactores de tamaño intermedio (0.25-1 L). Además, para la optimización de los escalados ha sido importante hacer una previsión de los gastos de materiales a usar ya que en algunos casos se han utilizado hasta 50 veces las cantidades usadas a escala laboratorio. En la **Tabla 6.1** se resume todo el equipamiento utilizado para estas pruebas.

| Reactores (L) | Homogenizadores | Agitadores |
|---|---|---|
| 0.25 / 0.5 / 1 / 2 / 5 | IKA®Ultra-Turrax®T25 / T50 | IKA®RW 20 Digital / 28 Basic |
| Encamisados, con sumidero inferior y tapa | Homogenizadores de potencias y vástagos variables | Agitadores mecánicos de potencia variable en combinación con palas de diferentes formas |

Tabla 6.1. Listado del material disponible para los escalados de los procesos.

Todos los reactores estaban dotados de camisas rellenables para líquidos refrigerantes y conectados con un sistema de recirculación que permite el control de la temperatura del líquido y del medio de síntesis. En la mayoría de los casos el líquido usado ha sido una disolución acuosa con etilenglicol al 20%p/p que permite un control de la temperatura entre 0 °C y 100 °C sin riesgo de evaporación o solidificación.

Todos los reactores están dotados de una válvula de salida o sumidero en la parte inferior, que permite la recuperación o el trasvase del líquido contenido. Los homogenizadores Ultra-Turrax®T25/T50 se emplean para realizar las emulsiones, mientras que la agitación magnética usada a escala laboratorio

se sustituyó por un sistema de motor/varillas agitadoras que permite agitar grandes volúmenes y líquidos de viscosidades elevadas. En la **Figura 6.1** se muestran los tres tipos de varillas agitadoras utilizadas para los experimentos. Las **Varillas 1 y 2** són de tipo hélice con tres palas pero de distintos diámetros. La **varilla 1** fue utilizada principalmente para el reactor de 2 L mientras que la **varilla 2** para el reactor de 5L. La **varilla 3** es de tipo ancla y se utilizó únicamente en el escalado de la polimerización *in-situ*. El tipo de agitación que ofrecen el tipo ancla y el tipo hélice son ligeramente diferentes. Las hélices generan mayores vórtices y son más energéticas, en cambio las de tipo ancla son adecuadas par arrastrar el material más cercano a las paredes del reactor y para procesos no tan energéticos.



Figura 6.1. Fotografía de las 3 varillas agitadoras usadas en las reacciones de escalado.

Todos los escalados se realizaron además en en el interior de una campana de extracción de pie que permite entrar físicamente para la manipulación de los reactores y el intercambio de equipos de agitación/emulsión.

La optimización del escalado se llevó a cabo para los tres métodos de encapsulación (coacervación, polimerización interfacial y polimerización *in-situ*). Cada sistema de escalado inicialmente se ha estudiado con Miglyol y posteriormente con la fragancia objetivo TROPICAL, siguiendo el mismo modelo de optimización usado a escala laboratorio. Los resultados que se muestran a continuación son únicamente los correspondientes a la encapsulación de la fragancia TROPICAL y como punto de partida para los escalados se usaron las condiciones optimizadas a escala laboratorio

6.2. Escalado del método de polimerización *in-situ*

Las condiciones usadas en la síntesis a escala laboratorio y escalado se reflejan **Tabla 6.2**.

| Condiciones | Escala laboratorio (120 g) | Escalado (1.2 Kg) | |
|----------------------|---|--|--|
| | | Reactor 2 L | |
| Fase acuosa | 70 g | 700 g | |
| Estabilizante | Poly-SMA (3%) | Poly-SMA (3%) | |
| Solución prepolímero | 20 g (3g Melamina + 5g Formaldehído 37 %p/p+ 10g Agua +TEA) | 200 g (30g Melamina + 50g Formadehído 37 %p/p+ 100g Agua +TEA) | |
| | | | |
| Fase aceite | 30 g TROPICAL | 300 g TROPICAL | |
| pH | De 8 a 5 (Ácido acético 10%p/p) | De 8 a 5 (Ácido acético 10%p/p) | |
| Temperatura | 30-85 °C | 30-85 °C | |
| Emulsionador | 5.000 rpm Ultra-Turrax®T25 (15min) | 3.000 rpm Ultra-Turrax®T50 (35 min) | |
| Agitación | 800-900 rpm | 250-300 rpm (Varilla 3) | |

Tabla 6.2. Condiciones para el escalado de cápsulas MF con fragancia TROPICAL.

Para la agitación en este escalado se utilizó el reactor de 2 L encamisado. En el reactor se introdujo un sistema de homogenización (Ultra-Turrax®T50) y agitación con motor provisto con una varilla tipo ancla (**Varilla 3**). Dado que la formación del polímero MF alrededor de las gotas de fragancia es lenta, las varillas de tipo hélice (**varillas 1 y 2**) podrían agitar con demasiada energía e inducir a la ruptura de cápsulas durante las primeras etapas de formación, momento en que las gotas poseen una fina capa de polímero y baja rigidez.

Para este caso, la preparación de la solución de prepolímero se realizó en un balón de vidrio de 250 mL (200 g de prepolímero) debido a que la cantidad a preparar no requería un reactor. Para la generación de la emulsión se preparó una disolución acuosa al 3% de poly-SMA, se añadió la fragancia y se llevó a cabo la emulsión durante 30 minutos con el Ultra-Turrax®T50 y el agitador trabajando a la vez para fomentar un mayor movimiento del material en el reactor. A continuación. Cuando la emulsión estuvo lista se retiró el homogenizador y se añadió la solución de prepolímero para inducir la deposición de la resina sobre la superficie de las gotas. Tras la adición se continuó homogenizando la mezcla entre 10-15 minutos para asegurar la máxima difusión del polímero. Pasado este tiempo se añadió la solución de ácido acético a través de un embudo de adición para disminuir el pH (**Figura 6.2**). Para más detalles del procedimiento, consultar **Protocolo MF.5**.

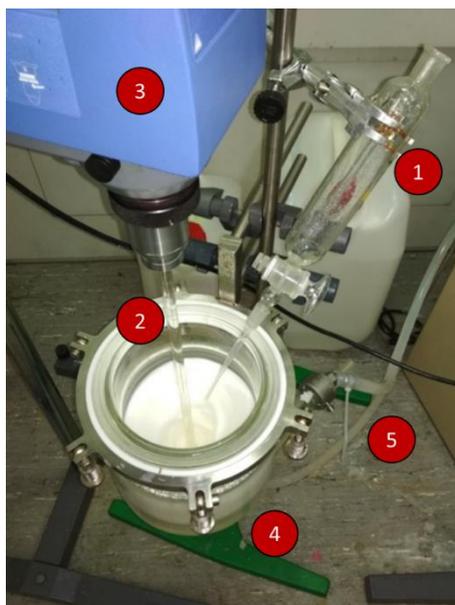


Figura 6.2. Montaje del reactor para el escalado de las cápsulas MF de TROPICAL. (1) Embudo de adición para la adición del prepolímero y de la solución de acético (2) Varilla 3 para la agitación del sistema (3) IKA® RW 20 Digital (4) Reactor encamisado de 2L (5) Sistema de recirculación para control de temperatura.

La reacción de polimerización se monitorizó extrayendo alícuotas de la mezcla y visualizándolas. La polimerización se llevó a cabo en 4 horas y la temperatura se fue incrementando de 30°C a 85 °C. Las imágenes de microscopía SEM confirmaron la formación de las cápsulas, siendo los tamaños ($\approx 15 \mu\text{m}$) y el aspecto muy similares al obtenido a escala laboratorio (**Figura 6.3**).

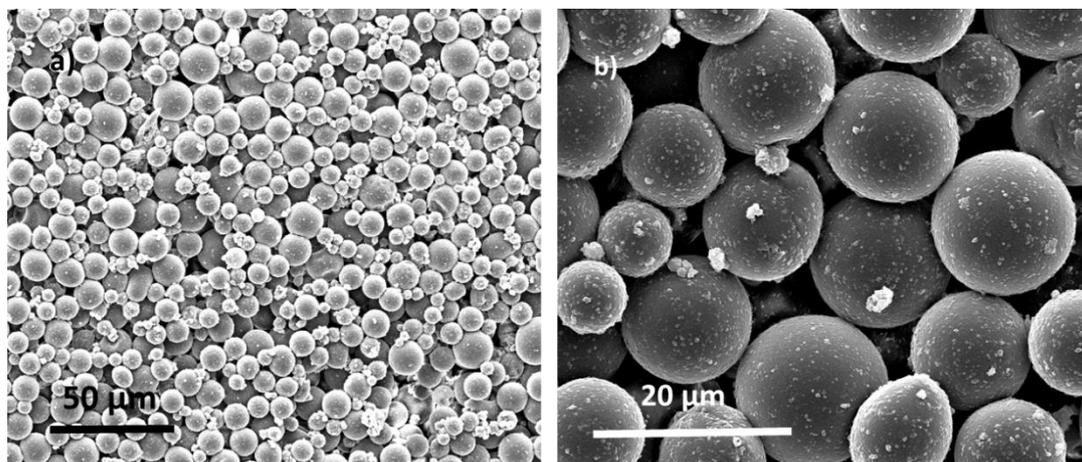


Figura 6.3. Imágenes SEM de las cápsulas TROPICAL obtenidas tras la optimización del escalado.

No obstante, se observaron fragmentos de material no estructurado (**Figura 6.4**) posiblemente debido a los cambios en la agitación desde escala laboratorio al proceso de escalado.

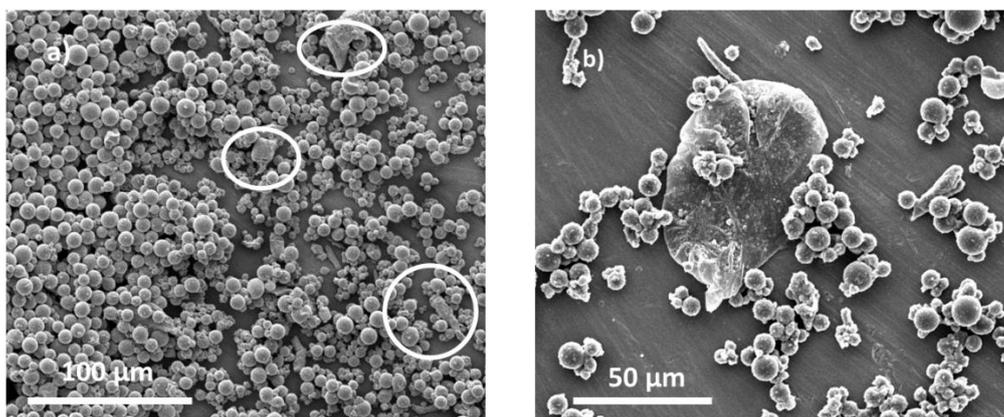


Figura 6.4. Imágenes SEM mostrando la presencia de material sin estructurar.

Las medidas de Mastersizer® de la suspensión mostraron varias distribuciones de tamaño (**Figura 6.5**). La correspondiente a las cápsulas era alrededor de 18 µm. Los otros tamaños fueron asociados a partículas de polímero (≈ 1 µm) o agregados de cápsulas y material sin estructurar (>100 µm).

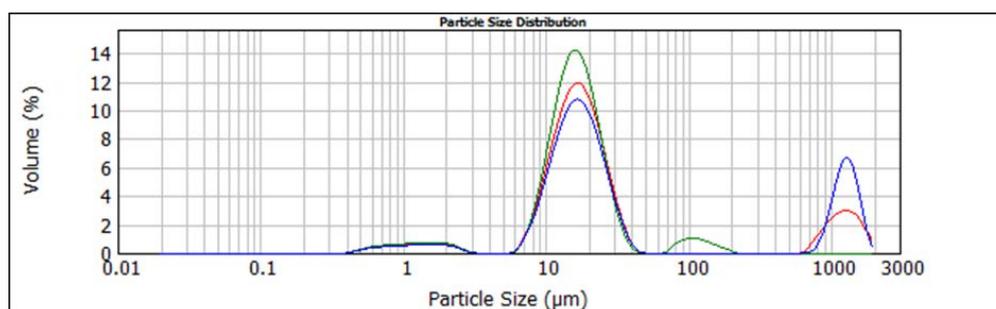


Figura 6.5. Distribución de tamaño de las cápsulas MF de TROPICAL obtenidas en el escalado.

Para el análisis cuantitativo de las cápsulas se liofilizó una parte de la suspensión que dio como producto un fino polvo altamente redispersable en agua. Este polvo fue posteriormente utilizado para la determinación de la carga útil y el rendimiento de encapsulación por método indirecto (gravimetría) (**Tabla 6.3**).

| Escala de síntesis | Cantidad cápsulas analizadas | Metodología de cuantificación | Rendimiento de encapsulación | Carga útil de fragancia |
|--------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------|
| Escalado (1.25 Kg) | 6 g | Gravimetría (indirecto) | 83.15 | 70% |
| Laboratorio (120g) | 30 mg | ^1H -RMN (directo) | N.D. | 70-80% |

Tabla 6.3. Carga útil y rendimiento de encapsulación de las cápsulas MF Tropical obtenidas en el escalado en comparación con los resultados a escala laboratorio.

El resultado de carga útil determinado fue muy similar al obtenido a escala laboratorio (70%). El rendimiento de la reacción también mostró un valor muy alto llegando casi al 90% y dentro de los valores objetivo.

Finalmente, para la determinación de la cantidad de formaldehído libre en la suspensión obtenida, se realizaron test colorimétricos con unos rápidos test de tiras (QUANTOFIX®) tal y como se muestra en la **Figura 6.6**.

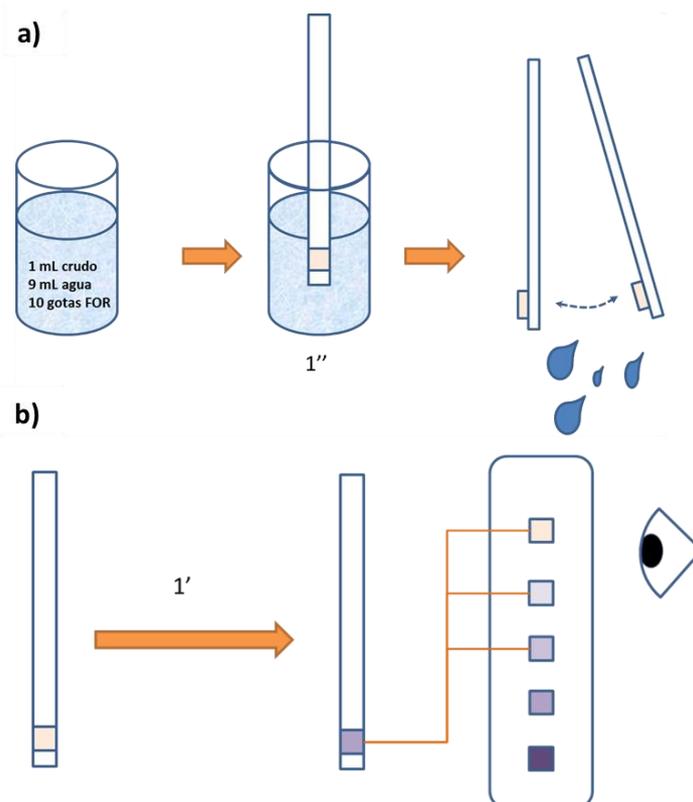


Figura 6.6. Procedimiento para la determinación de formaldehído libre. a) Inmersión de la tira indicadora en la solución a analizar con la dilución especificada; b) determinación de la concentración de formaldehído (ppm) en relación al color obtenido.

En un vial se prepara una solución de 1 mL de la suspensión, 9 mL de agua (para lograr una dilución 1:10) y 10 gotas de una solución de formaldehído proporcionada por el kit. La parte reactiva de la tira se sumerge en esta solución, se retira el exceso de agua y el color que aparece al cabo de 1 minuto se compara con una escala de colores directamente relacionada con ppm de formaldehído. Este test se realiza en unos pocos minutos por lo que es un procedimiento muy rápido para determinar el formaldehído libre. El único detalle a tener en cuenta es que siempre se debe evaluar el color transcurrido el mismo periodo de tiempo (1 minuto). La parte reactiva de la tira tiende a seguir reaccionando dando lugar a colores más intensos (en este caso violeta) en el caso de que haya formaldehído presente. Es por ello que es muy importante controlar el tiempo para realizar

evaluaciones y comparativas lo más reproducibles posible. Con este test se analizó el crudo de reacción del escalado dando lugar al siguiente resultado.

| Muestra analizada | Cantidad determinada | Cantidad extrapolada al crudo |
|--|----------------------|-------------------------------|
| 1 g de muestra en 10 g totales (dilución 10%) | 100-200 ppm | 1000-2000 ppm |

Tabla 6.4. Resultados obtenidos de la cantidad de formaldehído libre determinada.

Como se puede ver en la **Tabla 6.4**, el contenido de formaldehído libre detectado fue bastante alto. De hecho, esta suspensión no estaría permitida aplicarla directamente porque superaría los niveles legales en la mayoría de los casos (**apartado 3.1.2**)

Para reducir la cantidad de formaldehído se añadió una cantidad de disolución de amoníaco sobre 10 mL de suspensión (1% p/p NH₃) y se agitó suavemente durante 2 h a pH=8. Tras tratamiento se pudo observar el descenso de las concentraciones mediante el método colorimétrico con el kit de tiras (**Figura 6.7, Tabla 6.5**).

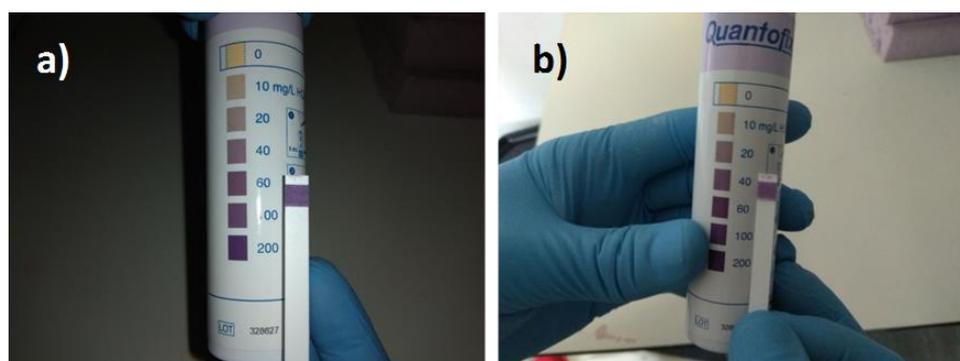


Figura 6.7. Determinación colorimétrica del formaldehído libre en la suspensión de microcápsulas obtenidas en el escalado: a) antes de tratar b) tras el tratamiento con NH₃ (1%p/p).

| Muestra analizada | Cantidad determinada | Cantidad en el crudo |
|----------------------|----------------------|----------------------|
| Sin amoníaco | 100-200 ppm | 1000-2000 ppm |
| 10 mL Amoníaco 1%p/p | 40 ppm | 400 ppm |

Tabla 6.5. Valores determinados de formaldehído libre con muestras tratadas con amoníaco y sin tratar.

La cantidad de formaldehído se pudo reducir a la mitad tras este tratamiento con el amoníaco como atrapador. Tanto la cantidad de amoníaco como las condiciones del tratamiento podrían ser optimizadas para una reducción de los niveles más efectiva. No obstante este análisis tiene un factor de subjetividad al tratarse de una interpretación de los colores. Pequeñas variaciones en la tonalidad resultan en cambios de $\pm 200-400$ ppm de formaldehído. Por ello en el futuro se investigarán otras

técnicas más exactas para determinar el contenido de formaldehído como podría ser espectroscopia UV-VIS (mediante aditivos que cambien de color al reaccionar con formaldehído) o por GC-MS.

6.3. Escalado del método de polimerización interfacial

El escalado de la síntesis de microcápsulas de TROPICAL por polimerización interfacial (poliamida) ha requerido de un proceso de optimización ya que el simple incremento de las cantidades de los monómeros no proporcionó los mismos resultados que a escala laboratorio. En este sistema, como se mostrará a continuación, los métodos de agitación, de emulsión y de adición de reactivos se han tenido que reoptimizar respecto a los establecidos a escala laboratorio.

6.3.1. Optimización del proceso de escalado

El montaje para la encapsulación por polimerización interfacial (**Figura 6.8**) consta de un sistema de agitación (motor con **Varilla 1**) y un homogenizador Ultra-Turrax® T50. El sistema de agitación es necesario para transportar el material cerca del homogenizador, dando la posibilidad de emulsionar volúmenes más grandes en menos tiempo. El termostato y sistema de recirculación se usaron para mantener el reactor a una temperatura constante durante la reacción (exotérmica) de policondensación.

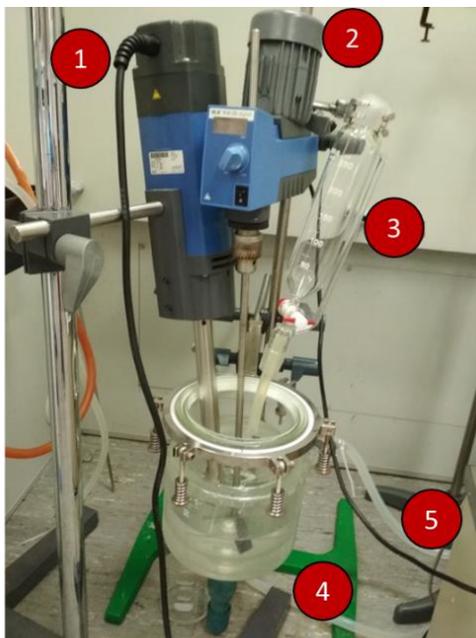


Figura 6.8. Montaje realizado para la síntesis de cápsulas de poliamida con sus diferentes elementos. **(1)** Homogenizador Ultra-Turrax® T50, **(2)** Agitador IKA RW Basic 20 Digital con **Varilla 1**, **(3)** Embudo de adición, **(4)** Reactor de 2 L encamisado con sumidero, **(5)** Sistema de recirculación con control de temperatura.

Inicialmente se disolvió el cloruro de tereftaloilo (TR) en la fragancia. Sucesivamente se añadió la disolución acuosa de PVA y se homogenizó la mezcla con el sistema descrito. Con este montaje, se consiguió obtener una emulsión homogénea con un tamaño de gota de 3-10 μm observado por microscopio óptico. El homogenizador Ultra-Turrax® se mantuvo encendido durante la etapa posterior de polimerización siguiendo la manera establecida a escala laboratorio. No obstante, al añadir la disolución de amina mediante un embudo de adición de manera controlada (5 mL/min) se produjo un aumento sustancial de la viscosidad y se generaron agregados.

Aunque se incrementó la velocidad de agitación para inhibir la formación de estos agregados, se observó que la agregación ocurrida era irreversible. Como se puede comprobar en las imágenes de SEM y microscopio óptico (**Figura 6.9**), las cápsulas se habían formado, pero se encontraban agregadas, confirmando la observación macroscópica de la formación de agregados.

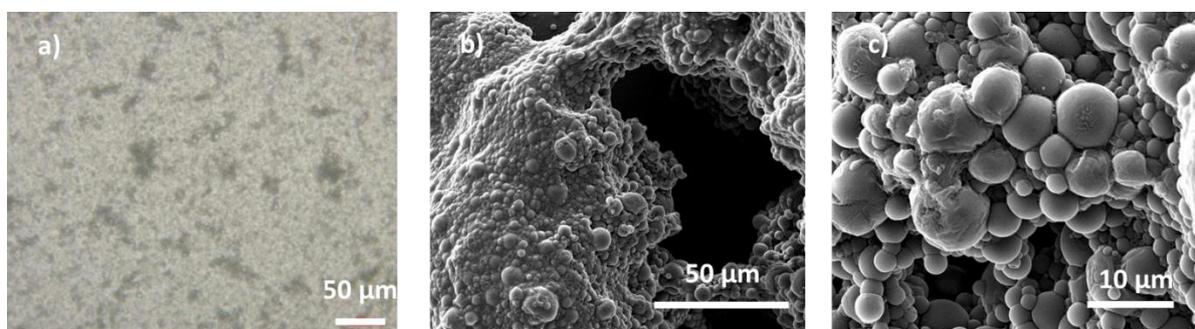


Figura 6.9. a) Imagen de microscopio óptico de los agregados de cápsulas PA de TROPICAL; b,c) imágenes SEM de estos agregados.

Para evitar esta agregación se propusieron cambios de las condiciones experimentales, sobretodo incidiendo en los siguientes puntos:

- Incremento de la cantidad de PVA para estabilizar las gotas*.
- Apagado del homogenizador en el momento de la polimerización*.
- Reducción de la cantidad de dietilentriamina (DETA) añadida*.
- Aumento de la cantidad de cloruro de terftaloilo (TR) disuelto en la fragancia*.
- Aumento de la agitación mecánica del sistema.
- Disminución dela temperatura para ralentizar la reactividad.
- Evitar el uso de NaOH para la solución de DETA.

Concretamente las modificaciones en los apartados marcados con asterisco fueron las que permitieron superar el problema de agregación observado. Las pruebas previamente se realizaron a

escala laboratorio (50 g) hasta comprobar el éxito de la síntesis y posteriormente se adaptaron a las condiciones a una escala de 1.2g (reactor 2L). Los cambios principales fueron los siguientes:

- Incremento de PVA

Se aumentó la concentración de PVA en la fase acuosa hasta un 3% en peso que permitió estabilizar de manera más eficiente la emulsión de la fragancia para tamaños de gota tan pequeños ($<10\ \mu\text{m}$).

- Incremento cantidad de cloruro de ácido

Se incrementó la cantidad de cloruro de ácido ya que las cápsulas obtenidas presentaban poca resistencia al secado, lo que se podría explicar por la presencia una corteza muy fina. Probablemente esto fuera debido a la falta de monómero en la fragancia que provocaba la terminación prematura de la polimerización (**Figura 6.10**)

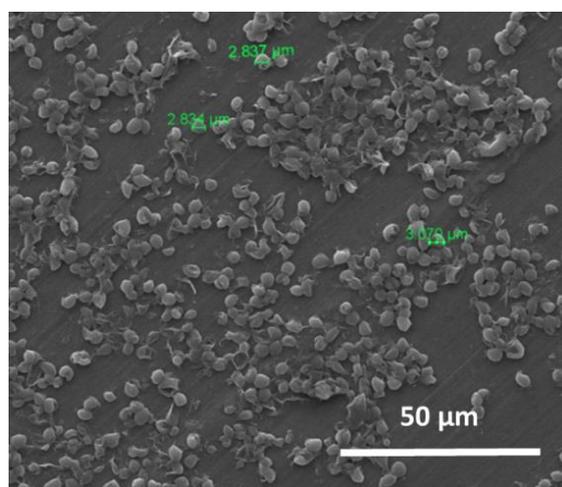


Figura 6.10. Imagen SEM de cápsulas de poliamida con un déficit de TR.

- Parada del homogenizador en la polimerización

Se decidió proceder a la parada del homogenizador durante la adición de la amina y el comienzo de la polimerización para evitar posibles rupturas de cápsulas durante su formación debido a la gran energía aplicada por el homogenizador (**Figura 6.11**).

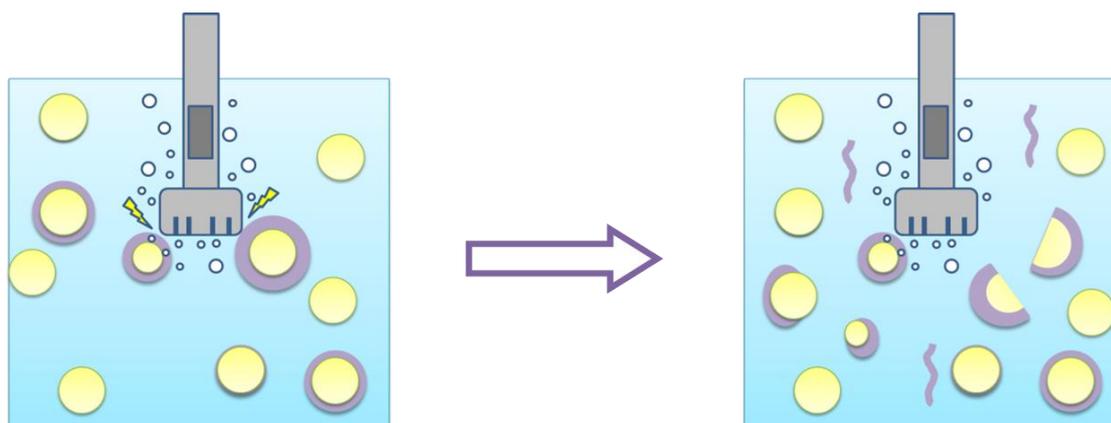


Figura 6.11. Posibles efectos del homogenizador Ultra-Turrax® durante la polimerización interfacial.

- Reducción de la DETA y dilución de la solución acuosa B (solución de DETA)

Finalmente, se decidió reducir la concentración de la DETA en la fase acuosa B. Cuando se añadieron pocas gotas de la fase acuosa B sobre la emulsión se empezó a evidenciar el proceso de agregación, señal de que la polimerización se producía demasiado rápido. Además, la polimerización se producía localmente en el punto de adición ya que la amina reaccionaba antes de poder difundir al resto de la emulsión. Otra iniciativa para minimizar esa velocidad de reacción fue no basificar la fase acuosa B con NaOH ya que la reactividad sigue manteniéndose sin la presencia de esta base.

En la **Tabla 6.6** se muestra de manera resumida los cambios realizados a escala laboratorio para la correcta encapsulación de la fragancia.

| Modificación | Inicial | | Optimización |
|-----------------------------------|---|------|---------------------------------|
| Concentración estabilizante | 2% | +1% | 3% |
| Cantidad cloruro | 12.5 g | +30% | 16.6 |
| Sistema agitación | Homogenizador y agitación todo el proceso | | Sólo agitador tras la emulsión |
| Solución de amina (Fase acuosa B) | 70 g amina en 250 de solución NaOH | -43% | 40 g en 250 de solución de agua |

Tabla 6.6. Tabla resumen de las modificaciones realizadas para la correcta encapsulación de la fragancia TROPICAL en el proceso de escalado.

En la **Figura 6.12** se muestra el aspecto a través de SEM de las cápsulas de TROPICAL tras realizar estas modificaciones, donde se aprecia la morfología esférica resistente al vacío y sin agregación.

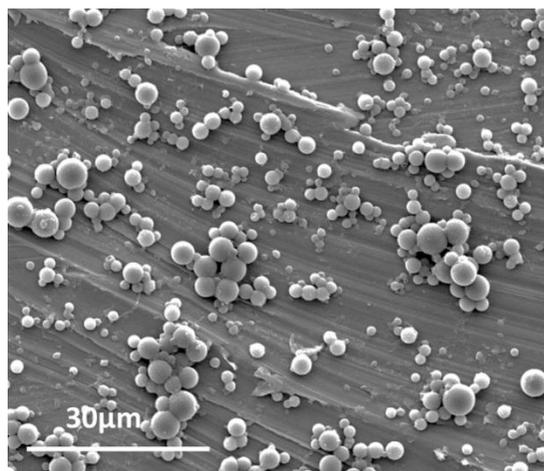


Figura 6.12. Imagen SEM de cápsulas de poliamida con TROPICAL tras las modificaciones realizadas para la mejora del escalado.

Las condiciones para ambas escalas se recogen en **Tabla 6.7** así como también en el **Protocolos PA.4** (escala laboratorio) y el **Protocolo PA.5** (proceso de escalado).

| Condiciones | Escala laboratorio (50 g) | Escalado (1.25 Kg) | |
|-----------------------------|-----------------------------|--------------------|----------------------------|
| | | Reactor 2 L | |
| Fase acuosa A | 40 g | | 1000g |
| % Estabilizante (PVA 20-98) | 3%p/p (1.2g) | | 3%p/p (30g) |
| Cantidad de fragancia | 10 g TROPICAL | | 250 g TROPICAL |
| Cloruro (TR) | 0.665 g en Fragancia | | 16.625 g en Fragancia |
| Amina (DETA) | 2 g | | 20 g x 2 |
| Fase acuosa B | 10 g (No NaOH) | | 250 g (No NaOH) |
| Emulsificación | 16.000 rpm Ultra-Turrax®T25 | | 5.000 rpm Ultra-Turrax®T50 |
| | 15min | | 15 min |
| Agitación mecánica | 400 rpm | | 600 rpm IKA®RW 28 Basic |

Tabla 6.7. Condiciones optimizadas para el escalado de cápsulas de poliamida.

6.3.2. Síntesis optimizada

Tras describir todas las modificaciones realizadas a escala laboratorio para la mejora del proceso, se llevó a cabo el escalado en el reactor de 2L según las condiciones de la **Tabla 6.7**. La única diferencia importante en el procedimiento fue que la adición de amina se llevó a cabo más lentamente para evitar la agregación. Para ello se realizaron dos adiciones de 250 mL de solución al 8% en DETA en lugar de una única al 16%.

Durante la adición de DETA se monitorizó el estado de la suspensión tomando alícuotas cada cierta cantidad añadida (**Tabla 6.8**). La velocidad de adición de la DETA se estableció en 15 mL/min aproximadamente y cada 50 g de solución añadida se sacó una alícuota para su posterior análisis por SEM.

| mmoles TR | Solución de DETA añadida (g) | DETA añadida (g) | mmoles DETA | Equivalentes DETA* |
|-----------|---------------------------------|------------------|-------------|-----------------------|
| 82 | 50 | 4 | 38.7 | 0.71 |
| 82 | 100 | 8 | 77.54 | 1.41 |
| 82 | 150 | 12 | 116.31 | 2.12 |
| 82 | 200 | 16 | 154.8 | 2.83 |
| 82 | 250 | 20 | 198.5 | 3.54 |
| 82 | 350 | 28 | 271.3 | 4.96 |
| 82 | 400 | 32 | 309.6 | 5.6 |
| 82 | 450 | 36 | 348.3 | 6.38 |
| 82 | 500 | 40 | 387 | 7.08 |

*1 equivalente: 54.6 mmol

Tabla 6.8. Cantidades añadidas de DETA durante el proceso.

A continuación en la **Figura 6.13** se muestran las imágenes obtenidas por SEM en las etapas más relevantes en función de amina añadida sobre la emulsión.

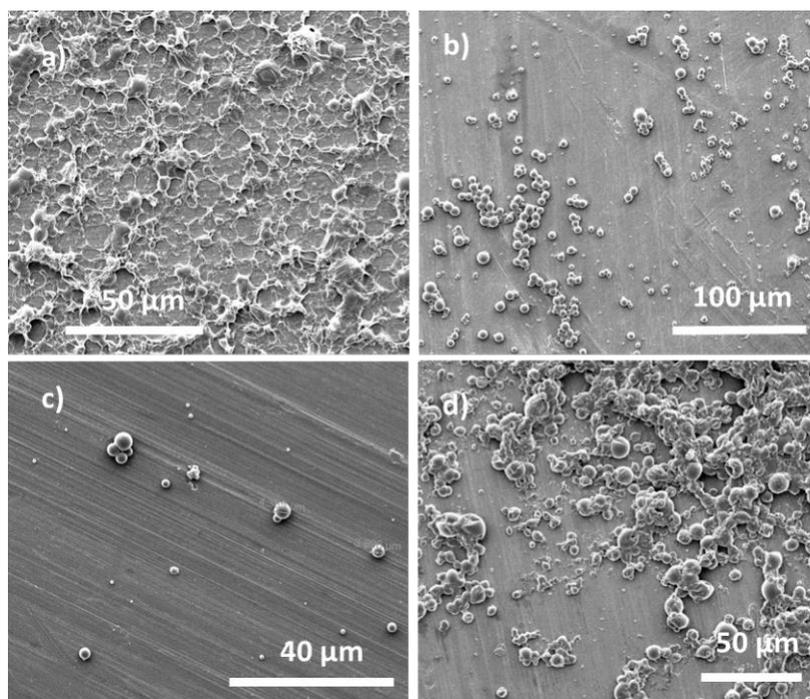


Figura 6.13. Imágenes SEM mostrando la evolución del aspecto de las cápsulas en función de la DETA añadida: a) 50 g; b) 150 g; c) 350 g; d) 500 g.

En la primera etapa (**Figura 6.13.a**) se puede apreciar como las cápsulas no se han formado todavía debido a que aún no se han alcanzado las cantidades mínimas necesarias para la formación del polímero que genere una corteza suficientemente gruesa y resistente. Tras añadir 150 y 350 g se obtuvieron cápsulas que mantenían la forma esférica durante su observación por SEM y con un tamaño comprendido entre 2 y 10 µm (**Figura 6.13.b y c**).

La distribución de tamaño analizada con Mastersizer® mostró una gran polidispersión en comparación al producto obtenido a escala laboratorio (**Figura 6.14**). Esto fue debido a que las cápsulas se agregaron irreversiblemente en el periodo de almacenamiento previo al análisis (7 días), confirmando la necesidad de añadir un estabilizante que las mantuviera separadas. El perfil de distribución de tamaños sin agregación debe ser parecido al que se muestra en el **apartado 4.3.2.3**.

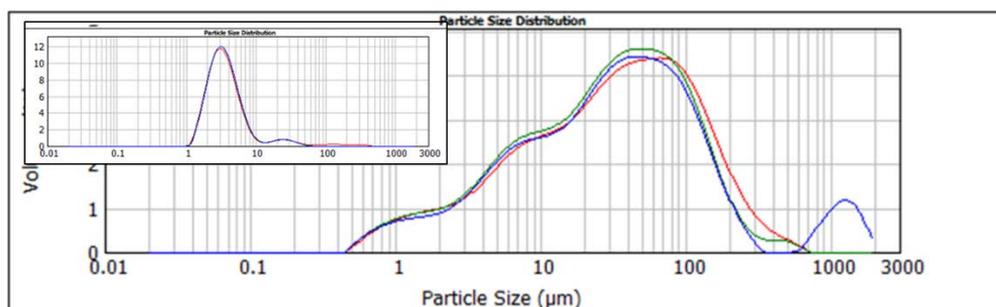


Figura 6.14. Distribución de tamaños de las cápsulas de TROPICAL obtenidas en el escalado y comparación con el perfil obtenido a escala laboratorio.

Posteriormente, parte de la suspensión se liofilizó para determinar la carga y el rendimiento de encapsulación. Las cápsulas presentes en el sólido obtenido tras la liofilización fueron complicadas de romper mediante aplicación de acetona ya que el PVA (usado como estabilizante en la emulsión) presente en la suspensión mantuvo unidas las cápsulas e hizo de barrera, impidiendo la correcta ruptura y extracción del contenido. Por ello, se decidió efectuar la ruptura de las cápsulas y extracción de la fragancia con acetona a partir de la suspensión acuosa. Tras romper las cápsulas, se filtraron y se cuantificó la carga útil y el rendimiento de encapsulación pesando el sólido recogido (material de corteza). Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 6.9**.

| Escala de síntesis | Cantidad cápsulas analizadas | Metodología de cuantificación | Rendimiento de encapsulación | Carga útil de fragancia |
|--------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------|
| Escalado (1.25 Kg) | 25 g (susp.ac) | Gravimetría (indirecto) | 83.15 | 57.2% |
| Laboratorio (50g) | 30 mg | ¹ H-RMN (directo) | N.D. | 60% |

Tabla 6.9. Tabla de resultados cuantitativos de las cápsulas de poliamida.

La carga útil determinada para estas cápsulas (57.2%) resultó ser parecida a la estimada en la síntesis a escala laboratorio (**apartado 4.4**), lo que se consideró aceptable dentro de los requisitos del proyecto y cercano a los resultados obtenidos en el proyecto MICROFRAG (80%).

6.4. Escalado del método de coacervación compleja

Las síntesis de cápsulas TROPICAL por coacervación compleja fueron realizadas inicialmente en reactores encamisados de 500 mL y 1 L para cápsulas mononucleares grandes (>50 µm) mediante el montaje que se muestra en la **Figura 6.15**.

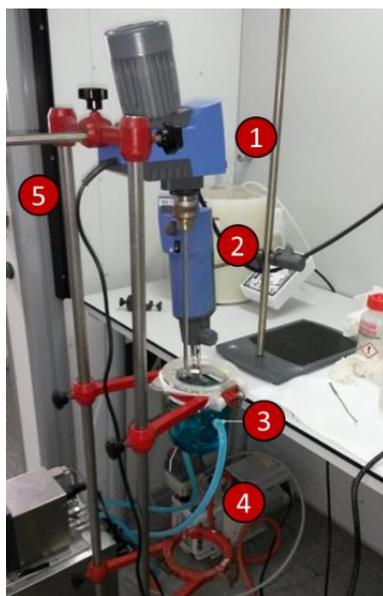


Figura 6.15. Montaje para el escalado de las síntesis por coacervación compleja en el reactor de 500 mL (1) Agitador IKA®RW 20 Digital (2) Ultra-Turrax®T25 (3) Reactor encamisado de 500 mL (4) Criotermostato para control de temperatura (5) Soporte.

Las condiciones utilizadas para estas síntesis se muestran en la **Tabla 6.10**.

| Condiciones | Escala laboratorio (54 g) | Pre-Escalado (0.44kg) Reactor 500 mL | Pre-Escalado (0.9 kg) Reactor 1L |
|---|---|--|--|
| Solución gelatina (GEL _{sol}) | 25 g (2% p/p) | 200 g (2% p/p) | 400 g (2% p/p) |
| Solución goma arábica (GA _{sol}) | 25 g (2% p/p) | 200 g (2% p/p) | 400 g (2% p/p) |
| Temperatura | 50 °C | 50 °C | 50 °C |
| pH | 4.109 | 4.21 | 4.21 |
| Fragancia | 4 g TROPICAL | 32 g TROPICAL | 64 g TROPICAL |
| Emulsificación | 3.000 rpm Ultra- Turrax®T25 | 3.000 rpm Ultra- Turrax®T25 | 3.000 rpm Ultra- Turrax®T25 |
| Enfriamiento | 50-25 °C en 30 min 25°C-5 °C en 30 min | 50-25 °C en 30 min 25°C-5 °C en 30 min | 50-25 °C en 30 min 25°C-5 °C en 30 min |
| Tiempo de emulsión | 5 min | 15 min | 15 min |
| Agitación mecánica | 750 rpm | 300 rpm (Varilla 1 , IKA®RW 20 Digital) | 400 rpm (Varilla 1 , IKA®RW 20 Digital) |

Tabla 6.10. Condiciones para las síntesis pre-escalado en los reactores de 500 mL y 1 L.

En todos los casos se obtuvieron microcápsulas mononucleares de fragancia con características muy similares a las obtenidas a escala laboratorio, tanto en tamaño (50-100 μm), morfología y en carga útil (50-65%). En la **Figura 6.16** se muestran imágenes de microscopía óptica y SEM de la síntesis en el reactor de 1L.

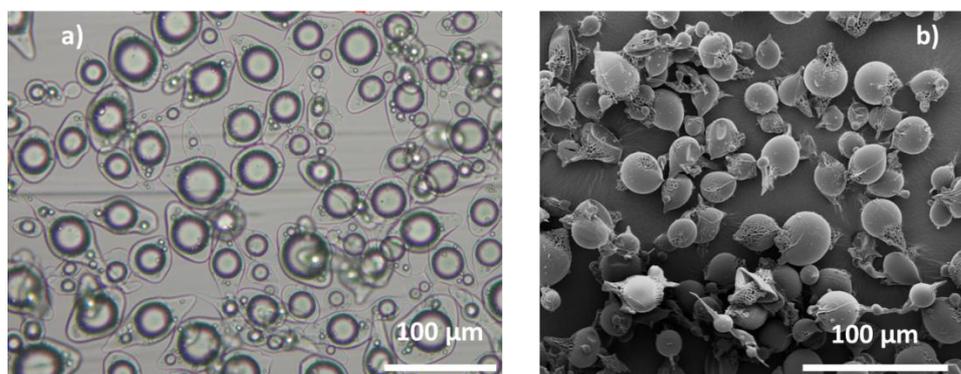


Figura 6.16 a) Imagen de microscopio óptico de cápsulas de TROPICAL mononucleares obtenidas en el reactor de 1L; b) Imagen SEM de las mismas cápsulas.

Debido al éxito de las síntesis realizadas en estos reactores intermedios, a estas alturas se decidió realizar escalados a mayores volúmenes. Los tipos de cápsulas a sintetizar y sus respectivos volúmenes se muestran en la **Tabla 6.11**.

| Tipo de cápsula | Núcleo | Volúmenes de reacción | |
|--------------------------------------|----------|-----------------------|---------|
| | | aproximados | Reactor |
| 1. Mononuclear $\geq 50 \mu\text{m}$ | Tropical | 1 L | 2L |
| 2. Mononuclear $< 50 \mu\text{m}$ | Tropical | 2.5 L | 5L |

Tabla 6.11. Resumen de los diferentes tipos de cápsulas a escalar por coacervación.

6.4.1. Escalado de cápsulas mononucleares $\geq 50 \mu\text{m}$

Aunque las cápsulas mononucleares de tamaño mayor ($\geq 50 \mu\text{m}$) no se consideraron adecuadas para el uso en suavizantes, se decidió corroborar su escalabilidad ya que, al menos a escala laboratorio, era el sistema más fácil de reproducir por coacervación. Las condiciones utilizadas para este proceso de escalado se muestran en la **Tabla 6.12** así como también en el **Protocolo CO.4**.

| Condiciones | Escala laboratorio (54 g) | Escalado (1.1 kg) |
|--|----------------------------|---|
| | | Reactor 2 L |
| Solución gelatina (GEL _{sol}) | 25 g (2% p/p) | 500 g (2% p/p) |
| Solución goma arábica (GA _{sol}) | 25 g (2% p/p) | 500 g (2% p/p) |
| Temperatura | 50 °C | 50 °C |
| pH | 4.21 | 4.21 |
| Fragancia | 4 g TROPICAL | 80 g Tropical P780765 |
| Emulsificación | 3.000 rpm Ultra-Turrax®T25 | 3.000 rpm Ultra-Turrax®T25 |
| Enfriamiento | 50-25 °C en 30 min | 50-25 °C en 30 min |
| | 25°C-5 °C en 30 min | 25°C-5 °C en 30 min |
| Tiempo de emulsión | 5 min | 15 min |
| Agitación mecánica | 750 rpm | 400 rpm-250 rpm (Varilla 2, IKA®RW 28 Basic) |

Tabla 6.12. Condiciones para el escalado de cápsulas mononucleares TROPICAL en el reactor de 2L.

Como puede apreciarse en la **Tabla 6.12**, las cantidades de los componentes (núcleo, polímeros) fueron 20 veces más que las utilizadas a escala laboratorio.

La temperatura y el pH, la velocidad de emulsificación y la proporción en polímero/fragancia (1:4) se mantuvieron iguales al proceso en escala laboratorio. El tiempo de emulsificación se aumentó a 15 minutos debido al mayor volumen a emulsionar. La agitación continuada de la mezcla durante las distintas etapas se llevó a cabo mediante un sistema de motor y varillas.

La síntesis optimizada a escala laboratorio consta de una etapa de emulsificación con Ultra-Turrax® seguida por otra de agitación constante durante la gelificación. Esto se realizaba añadiendo el imán agitador previamente o inmediatamente después de la emulsificación y encendiendo la placa agitadora ya situada bajo el vaso de reacción.

A escalas mayores la agitación magnética se sustituye por varillas mecánicas accionadas por un motor, por lo que el cambio de emulsificación a agitación requiere de un cambio de equipamiento. Éste debe realizarse sin detener en ningún momento la agitación del medio, ya que supondría la pérdida de la homogeneidad de la emulsión.

Para evitar esto, previo a esta síntesis se realizó un intento de escalado usando únicamente el motor de agitación también para la generación de la emulsión. El objetivo era simplificar el montaje y evitar

el cambio de equipo (sin usar homogenizador en paralelo), no obstante, la menor energía aportada por la varilla, y el poco poder emulsionante de la gelatina, no permitió conseguir una emulsión estable ni por lo tanto cápsulas.

El reactor de 2 L usado tiene la anchura y el volumen adecuado para poner al mismo tiempo el homogenizador y la varilla de agitación. Con este montaje, inicialmente se activa el homogenizador para la formación de la emulsión O/W y la agitación para mover de manera homogénea todo el contenido del reactor. Tras la obtención de la emulsión se puede retirar el homogenizador sin entorpecer el funcionamiento del agitador. En la **Figura 6.17** se muestra el montaje descrito.

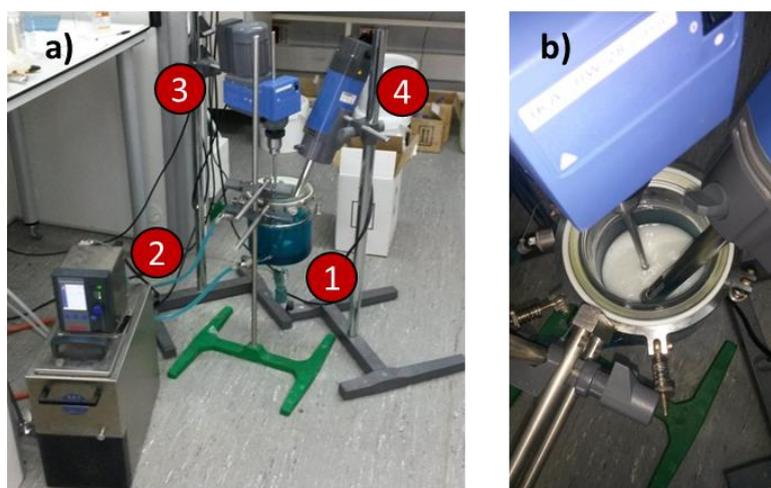


Figura 6.17. a) Montaje realizado para la síntesis de cápsulas por coacervación en el reactor de 2 L **(1)** Reactor encamisado de 2 L **(2)** Sistema de recirculación para control de temperatura **(3)** Agitador IKA®RW 28 Basic **(4)** IKA®Ultra-Turrax®T50; b) Emulsión con los sistemas de agitación y homogenización acoplados a la vez.

La síntesis optimizada se realizó finalmente con el homogenizador Ultra-Turrax®T25, el mismo usado a escala laboratorio, ya que el Ultra-Turrax®T50 demostró tener demasiada potencia, obteniéndose tamaños de gota demasiado pequeños incluso a rpm menores.

El resultado de la síntesis fue la formación de cápsulas mononucleares de aspecto y tamaño muy similar al obtenido en síntesis de laboratorio, aunque se observó una mayor cantidad material de corteza. Esta mayor cantidad de polímero se apreció tanto en microscopía óptica como electrónica, donde las cápsulas liofilizadas mostraban una gran rugosidad en la mayor parte de la corteza (**Figura 6.18**).

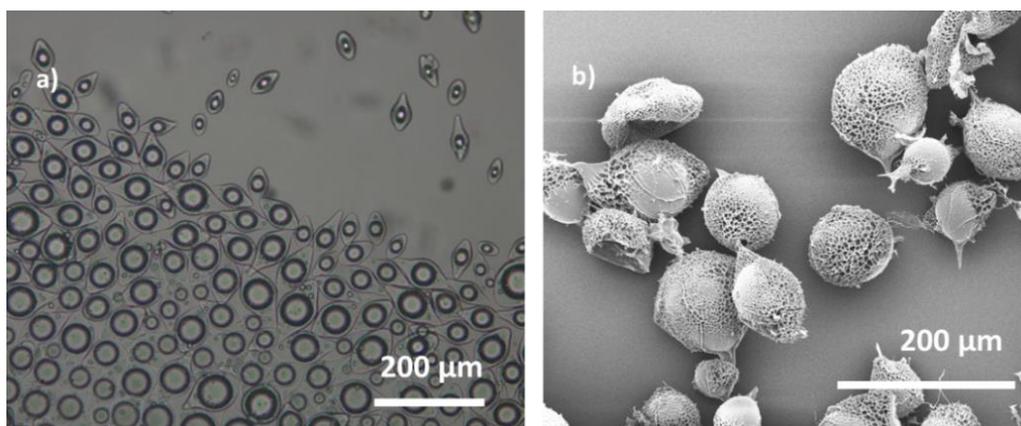


Figura 6.18. a) Imagen de microscopio óptico de las cápsulas TROPICAL obtenidas en el escalado; b) Imagen SEM de las mismas cápsulas.

El análisis de distribución de tamaño (**Figura 6.19**) mostró una baja polidispersión, siendo la mayoría de las cápsulas de un tamaño parecido superior a $>50 \mu\text{m}$ y el mayor volumen alrededor de $100 \mu\text{m}$.

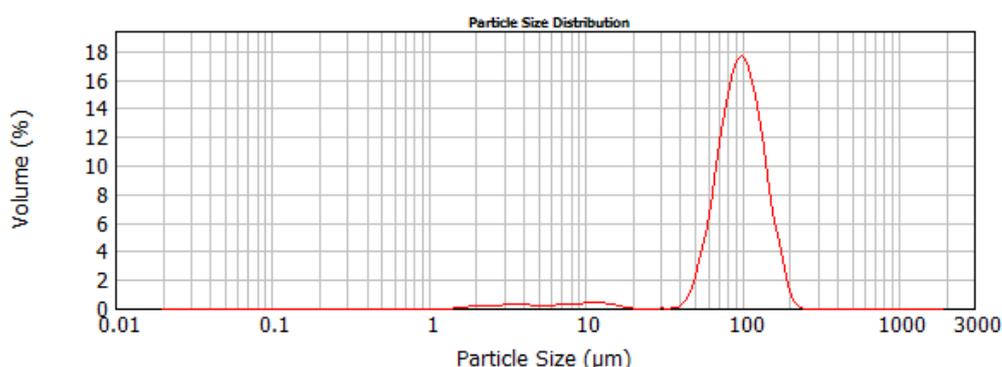


Figura 6.19. Distribución de tamaños de las cápsulas TROPICAL obtenidas por coacervación compleja ($>50 \mu\text{m}$) en el reactor de 2L.

Tras la finalización de la reacción se extrajo una fracción representativa de la suspensión, se liofilizó y posteriormente se determinó la carga útil y rendimiento de encapsulación correspondientes mediante el método gravimétrico. Los datos extraídos de este procedimiento se muestran en la **Tabla 6.13**.

| Escala | Métodología de cuantificación | Carga útil (%) | Rendimiento de encapsulación |
|--------|-------------------------------|----------------|------------------------------|
| 50 g | $^1\text{H-RMN}$ (directa) | $\approx 55\%$ | $\approx 60\%$ |
| 1 kg | Gravimetría (Indirecta) | $\approx 65\%$ | $\approx 50\%$ |

Tabla 6.13. Carga útil y rendimiento de encapsulación de cápsulas mononucleares de TROPICAL a escala de 1 kg y 50 g.

Tanto la carga útil como el rendimiento de encapsulación fueron parecidos en las dos síntesis, confirmando la escalabilidad del proceso.

6.4.2. Escalado de cápsulas mononucleares < 50 μm

El problema principal advertido en la síntesis de cápsulas mononucleares de <50 μm a escala laboratorio fue el gran incremento de la viscosidad durante la gelificación. El uso del sistema motor/varillas en el escalado asegura una agitación homogénea también en sistemas más viscosos.

Para este escalado se decidió trabajar con una mezcla total de síntesis de 2.9 kg (50 veces la cantidad a escala laboratorio), lo cual hizo necesario usar el reactor de 5 L. Las condiciones de la síntesis están resumidas en la **Tabla 6.14** y en el **Protocolo CO.5**.

| Condiciones | Escala laboratorio (58 g) | Escalado (2.9kg) |
|--|--------------------------------|--|
| | | Reactor 5L |
| Solución gelatina (GEL _{sol}) | 25 g (4%p/p) | 1250 g (4% p/p) |
| Solución goma arábica (GA _{sol}) | 25 g (4% p/p) | 1250 g (4% p/p) |
| Temperatura | 50 °C | 50 °C |
| pH | 4.21 | 4.21 |
| Fase aceite | 8 g TROPICAL | 400 g TROPICAL |
| Emulsificación | 8.000 rpm Ultra-Turrax® T25 | 2.000 rpm Ultra-Turrax®T50 |
| Gradiente de enfriamiento | 50-25 °C en 30 min | 50-25 °C en 50 min |
| | 25°C-5 °C en 30 min | 25°C-5 °C en 30 min |
| Tiempo de emulsión | 5 min | 15 min |
| Agitación mecánica | 800-900 rpm | 350 rpm (Varilla con 2 IKA®RW 28 Basic y Varilla 1 con IKA®RW 20 Digital) |

Tabla 6.14. Condiciones para el escalado de cápsulas mononucleares de <50 μm .

Todas las fases (incluso la disolución de los polímeros) han requerido el uso de dos reactores encamisados.

Para el reactor de 5L (destinado a la síntesis de las microcápsulas) no fue posible realizar el montaje anterior de Ultra-Turrax® y motor de agitación debido a su boca estrecha (**Figura 6.20.a**). Por esta razón, en el reactor de 2L de boca ancha provisto de un motor de agitación con la **Varilla 1** se preparó la emulsión de la fragancia en la disolución de gelatina. La anchura del reactor permite introducir el vástago del homogenizador (en este caso el Ultra-Turrax T50®) hasta la mezcla junto al motor de agitación sin impedimento. Así pues, se emulsiona la mezcla con el homogenizador mientras se agita

con el motor para asegurar la máxima homogenización (como se realizó en las síntesis de cápsulas >50 μm).

Cuando la emulsión estuvo preparada se transfirió al reactor de 5L mediante un tubo de silicona conectado desde el sumidero del reactor de 2L hasta la boca del reactor de 5L. El tiempo empleado para la transferencia (2-3 minutos) fue más breve que si se tuviera que realizar un cambio de equipamiento, con las correspondientes paradas en la agitación. Una vez que toda la emulsión se transfirió al reactor de 5L se añadió la disolución de goma arábica. La **Figura 6.20.b** muestra el momento de la transferencia de la emulsión de un reactor a otro.

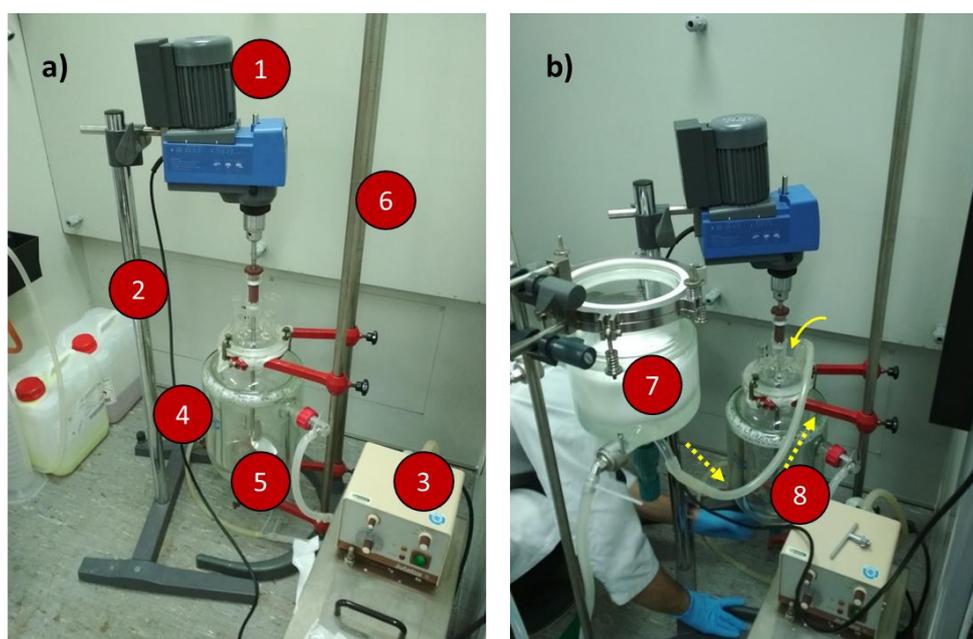


Figura 6.20. a) Montaje diseñado para reacción de coacervación con sus diferentes elementos; (1): Agitador IKA®RW Basic 20, (2) Soporte del agitador, (3) Sistema de recirculación con control de temperatura (4). Reactor encamisado de 5 L con sumidero, (5) Varilla 2, (6) Soporte reactor; b) Transferencia de la emulsión desde el reactor de 2 L al de 5 L (7) Reactor de 2 L con la emulsión de fragancia en la solución de gelatina, (8) Tubo de silicona usado para la transferencia por gravedad.

A continuación se agitó la mezcla durante 5 minutos y se ajustó a pH 4.21 mediante una solución de acético al 10%p/p para inducir a la coacervación. La medición de pH se realizó mediante un pHmetro sumergido en la mezcla. La agitación con la hélice permitió mover eficientemente todo el volumen del reactor, aunque se aplicó una agitación suave para evitar posibles rupturas de las cápsulas. El descenso de la temperatura para inducir a la gelificación se realizó más lentamente ($-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) para poder controlar mejor los grandes cambios de viscosidad que se generan. En el momento de bajar la temperatura hasta los $25\text{-}20^{\circ}\text{C}$ se observó un aumento de viscosidad aunque la agitación con hélice permitió mantener una agitación constante.

A nivel macroscópico la suspensión obtenida tenía un aspecto muy homogéneo. Al analizar la muestra en el microscopio óptico y SEM se pudo confirmar la formación de microcápsulas de tamaño inferior a 50 μm (20-30 μm) (**Figura 6.21**).

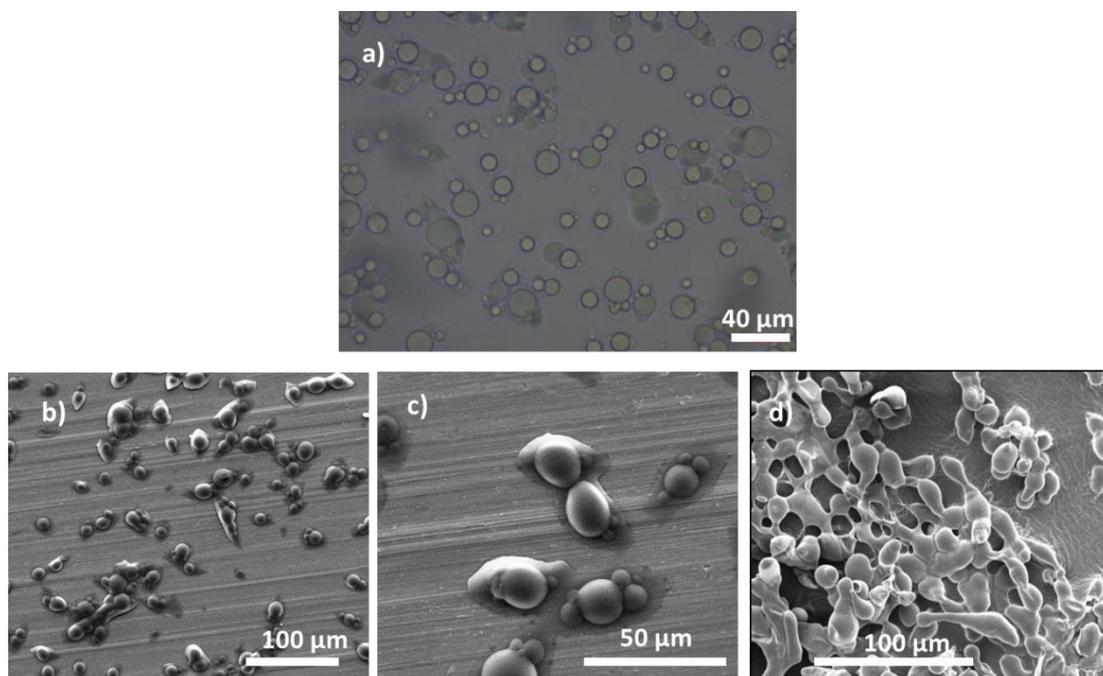


Figura 6.21. a) Imagen de microscopio óptico de las cápsulas TROPICAL; b,c) imágenes SEM de las cápsulas secadas al aire; d) Imagen SEM de las cápsulas tras la liofilización.

Tras la síntesis, se analizó la suspensión obtenida por Mastersizer[®], que mostró un tamaño de cápsulas en torno a 40-45 μm (**Figura 6.22**).

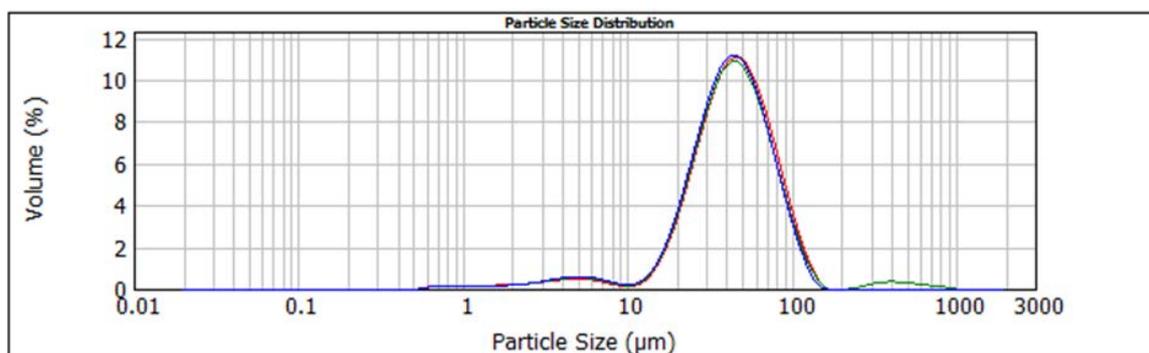


Figura 6.22. Distribución de tamaños de las cápsulas TROPICAL por coacervación compleja (<50 μm).

El tamaño esperado inicialmente para estas cápsulas era 10-20 μm , ya que era el tamaño de gota obtenido en la emulsión, aunque probablemente la formación de estructuras multinucleares provocó un ligero incremento de los diámetros. Posteriormente parte de la suspensión fue liofilizada para su caracterización. El SEM mostró que las cápsulas mantuvieron su estructura tras ser secadas por liofilización con una ligera agregación entre ellas (**Figura 6.21.d**).

Para determinar la carga útil y el rendimiento de encapsulación de las cápsulas se recogió una alícuota del crudo (20g) de reacción y se liofilizó. Como en el escalado se disponía de mayor cantidad de suspensión de cápsulas, se decidió realizar el método de cuantificación por gravimetría (**apartado 5.3.5.1**). Para ello, el sólido recogido se trató con acetona bajo fuerte agitación y a continuación se filtró. Los valores cuantitativos obtenidos mediante este procedimiento se muestran en la **Tabla 6.15**.

| Escala de síntesis | Cantidad cápsulas analizadas | Metodología de cuantificación | Rendimiento de encapsulación | Carga útil de fragancia |
|-----------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------|
| Escalado (2.5 Kg) | 3.43 g | Gravimetría | N.D. | 57.1% |
| Laboratorio (50-60 g) | 30 mg | ¹ H-RMN | 50-60% | 60% |

Tabla 6.15. Parámetros cuantitativos de las cápsulas de coacervación de Tropical (<50 μm) en comparación con los obtenidos a escala laboratorio.

El rendimiento de encapsulación no se calculó debido a que para esta síntesis no se realizó un proceso de lavado, por lo que en solución podría haber polímero disuelto a pesar de haber trabajado en un pH óptimo. La carga útil determinada resultó ser similar al valor obtenido en la síntesis a escala laboratorio por lo que se consideró aceptable.

6.5. Observaciones técnico-económicas de los procesos de encapsulación

A continuación, en la **Tabla 6.16** se muestra una comparativa de diferentes aspectos técnico-económicos de los tres procesos de encapsulación escalados.

| Técnica | Coac. Compleja | Pol. Interfacial | Pol. In-situ |
|-------------------------------|----------------|------------------|---------------|
| Tiempo por síntesis | 3-4h (24h*) | 1-2 h | 5-6 h |
| Uso de energía | Moderado | Bajo | Alto |
| Dependencia de los parámetros | Moderada | Moderada | Alta |
| Carga útil | 60-65% | 57% | 70-80% |
| Concentraciones** | 15-20% | 15-25% | 25-30% |
| Toxicidad producto | Muy Baja | Baja-Moderada | Moderada-Alta |
| Precio/Kg susp*** | 7.13 €/Kg | 4.04 €/Kg | 4.41 €/Kg |

* Con proceso de *cross-linking*

** Concentración en cápsulas del crudo de reacción (%p/p)

*** Precios Sigma-Aldrich® para los reactivos + precio de la fragancia TROPICAL (9.3 €/Kg)

Tabla 6.16. Comparativa de los diferentes procesos escalados de encapsulación.

➤ Aspectos técnicos

Cada uno de los procesos tiene diferentes comportamientos a los cambios más relevantes como son la temperatura, el pH o agitación. Por ejemplo, los procesos de coacervación compleja y polimerización *in-situ* requieren altas temperaturas y largos tiempos de síntesis por lo que el gasto de energía es considerable en comparación con la técnica de polimerización interfacial. La sensibilidad a cambios de pH, temperatura o concentración de reactivos se ve manifestada en mayor medida en las técnicas químicas, marcando claramente la diferencia entre cápsulas correctamente formadas o no.

➤ Suspensiones obtenidas

Las condiciones optimizadas de las síntesis de cápsulas permiten obtener suspensiones acuosas con una concentración de 15-30% en peso de cápsulas. Considerando que en el mercado se comercializan suspensiones entre 30-40%, unos de los trabajos futuros sería alcanzar concentraciones más altas.

➤ Toxicidad

Respecto a la toxicidad, es evidente que las cápsulas más biocompatibles son las obtenidas con biopolímeros mientras que la suspensión más tóxica es la obtenida mediante polimerización *in-situ* por la presencia del formaldehído.

➤ Aspectos económicos

Por último, y no menos importante, es la comparativa del precio de las cápsulas obtenidas donde se aprecian diferencias de precio sobretodo por los precios de los materiales de corteza. Por supuesto, en el precio mostrado de las suspensiones de microcápsulas no se incluyen los gastos relacionados a la energía, personal o los estabilizantes. Estos factores elevarían lógicamente el precio final del producto, no obstante, el precio de los reactivos se reduce notablemente si se compran en grandes cantidades a mayoristas. Por ejemplo, para la técnica de coacervación, el hecho de adquirir los biopolímeros a escala industrial (toneladas) abarataría el valor de la suspensión hasta en un 70%. Esta reducción en los precios también se podría alcanzar en los materiales de corteza para cápsulas de MF y PA.

El continuo contacto con clientes dentro del ámbito de la perfumería y la cosmética a nivel estatal ha ofrecido una visión global de los precios de mercado de distintas suspensiones de microcápsulas. Según los datos recogidos, el rango de precios oscila entre 15-50 €/Kg que abarcan desde precios de maquila a precios de venta directa y distintos tipos de núcleos encapsulado. Teniendo en cuenta estos datos, se puede apreciar como la síntesis de cápsulas por parte de CARINSA podría competir a nivel económico con productos basados en suspensiones acuosas de microcápsulas.

➤ Equipamiento para la industrialización

En relación al equipamiento para las distintas encapsulaciones, sería necesario un reactor que cumpliera con las siguientes características:

- Sistema de agitación con motor
- Homogenizador
- Control de temperatura y sistemas de refrigeración/calentamiento controlado
- Sensor de pH
- Diferentes tipos de entradas para la adición de reactivos
- Salida para toma de muestras
- Sumidero inferior
- Tapa superior hermética

Finalmente, para concluir este capítulo, es importante remarcar que el escalado de todos los procesos ha supuesto un enorme reto pero a la vez ha proporcionado mucho conocimiento sobre cómo afectan todas las variables en la síntesis en estas proporciones y que no se pueden detectar de manera tan evidente a escala laboratorio.

6.6. Conclusiones

Del trabajo realizado en los escalados de los tres métodos de encapsulación se sacó las siguientes conclusiones:

- Se ha encapsulado la fragancia TROPICAL por polimerización in-situ mediante un escalado de la reacción optimizada (1.2 Kg totales). La carga útil obtenida fue similar a escala laboratorio ($\approx 70\%$) y con un tamaño aproximado de partícula de $18 \mu\text{m}$.
- Se ha reducido la cantidad de formaldehído libre en las suspensiones de cápsulas MF mediante el uso de NH_3 como atrapador.
- Se ha tenido que reoptimizar el proceso de escalado para la encapsulación de la fragancia TROPICAL por polimerización interfacial. Se aumentó la cantidad de PVA, la cantidad de TR, y se redujo la cantidad de amina. Además, se realizaron modificaciones en el sistema de agitación/emulsión.
- Se ha encapsulado la fragancia TROPICAL por polimerización interfacial mediante un escalado de la reacción optimizada (1.5 Kg totales). La carga útil obtenida fue similar a escala

laboratorio ($\approx 57\%$) y el tamaño observado por microscopía fue similar (2-10 μm), no obstante la determinación por difracción laser no proporcionó datos concluyentes.

- Se ha encapsulado la fragancia TROPICAL por coacervación compleja mediante un escalado de la reacciones para la obtención de cápsulas monucleares de tamaños $>50\ \mu\text{m}$ y $<50\ \mu\text{m}$ optimizadas (1 y 2.9 Kg respectivamente). La carga útil obtenida fue similar a escala laboratorio ($\approx 55\%$ para las cápsulas de mayor tamaño y $\approx 57\%$ para las de menor tamaño). El tamaño medio determinado para los dos tipos de cápsulas fue de 50-100 μm y 10-20 μm respectivamente
- Los escalados de las cápsulas por coacervación compleja para la obtención de los distintos tamaños se han llevado a cabo con la fragancia TROPICAL sin necesitar una reoptimización de la síntesis (como fue necesario en poliamida), demostrando que el proceso es fácilmente escalable también para fragancias complejas de interés para CARINSA.

Capítulo 7

Aplicaciones

7.1. Introducción

El principal propósito del desarrollo de cápsulas con fragancias durante este proyecto es para su uso en productos de detergencia, sobre todo para suavizantes. La idea general es que tras el lavado de las prendas, las cápsulas del suavizante queden atrapadas entre las fibras del tejido y que liberen las fragancias tras su ruptura por fricción. De esta manera se cumplen una serie de conceptos:

- La fragancia sólo se liberaría en el momento que se lleve la prenda, mientras que quedaría atrapada durante el almacenamiento.
- Se producirían picos de liberación intensos y perceptibles de la fragancia.
- Aumenta la duración de la fragancia en la prenda.
- Se podrían formular sistemas duales de cápsulas de fragancias de una formulación con fragancia libre de otra composición para producir sensaciones olfativas distintas.

7.2. Estabilización de cápsulas para su uso en detergencia

7.2.1. Estabilidad y resistencia de las cápsulas al pH

Para poder utilizar las cápsulas en productos de limpieza, como suavizantes y detergentes se tienen que tener en cuenta la complejidad de estos productos por la gran variedad compuestos que se incluyen como pueden ser espesantes, enzimas, fijadores, blanqueantes, y fragancias.

Uno de los parámetros más importantes a tener en cuenta en las suspensiones de microcápsulas, es su comportamiento en diferentes pH. Por ejemplo, en el caso de los detergentes, los pH se sitúan en un rango alcalino (8-10), mientras que el de los suavizantes se encuentra en un rango ácido (3.5-5).

Estos pH no son muy extremos, no obstante pueden ser el factor responsable de la inestabilidad química y física de las microcápsulas. Por ejemplo, en una corteza donde haya grupos amino o carboxilo puede verse alterada su carga superficial y por lo tanto el comportamiento de la cápsula. Por este motivo, se creyó conveniente realizar inicialmente un estudio de estabilidad de las microcápsulas a diferentes pH.

Para este estudio se prepararon disoluciones acuosas a pH 2, 4, 8 y 10 con ácido sulfúrico e hidróxido sódico y posteriormente se añadió una cantidad igual de microcápsulas en todos los casos. Las cápsulas se dejaron reposar durante un período de 7 días y se analizaron tanto a nivel macroscópico como microscópico. El resultado para las diferentes cápsulas se muestra a continuación.

➤ Cápsulas GEL/GA

Según el pH, las cápsulas preparadas por coacervación mostraron un aspecto diferente tanto a nivel macroscópico como a través del óptico como se puede observar en la **Figura 7.1**.

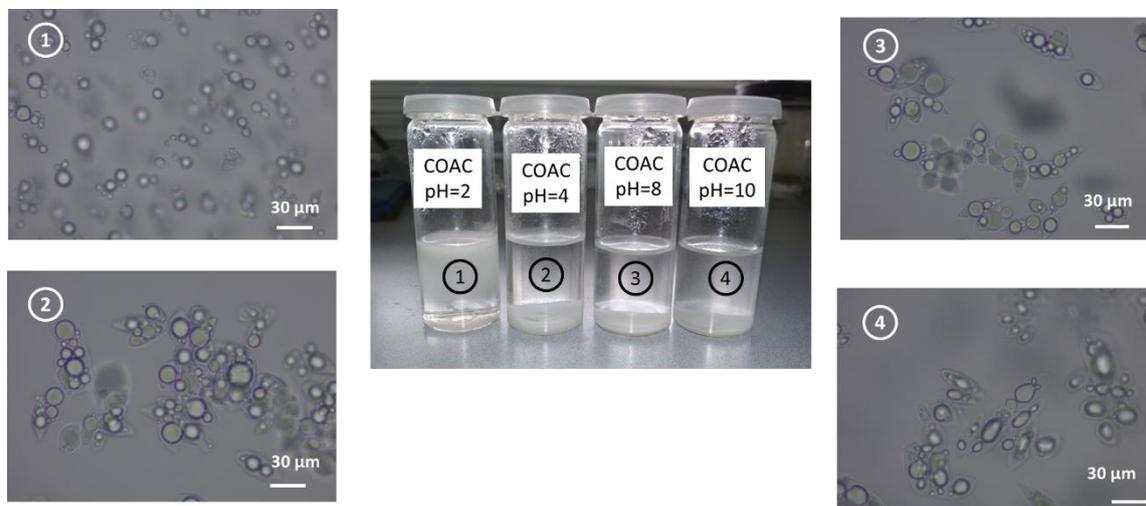


Figura 7.1. Aspecto macro- y microscópico de las cápsulas de GEL/GA con TROPICAL a diferentes pH.

La muestra 1 (pH=2) mostraba una mayor dispersión de cápsulas en la fase acuosa mientras en las otras se observaba sedimentación. En el microscopio se observó como la corteza de las cápsulas de la suspensión 1 era extremadamente fina o incluso ausente, habiéndose quedado las gotas de fragancia en forma de emulsión. Esto podría ser debido a la pérdida de la carga negativa de la goma arábica y por lo tanto, a la pérdida de la interacción electroestática entre las cadenas poliméricas de la corteza. Esta hipótesis se corroboró por SEM, observándose sólo polímero desestructurado (**Figura 7.2**).

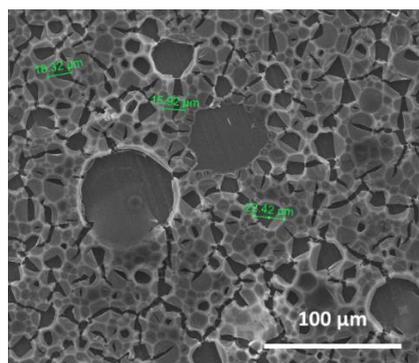


Figura 7.2. Imagen SEM de la muestra 1 tras 7 días a pH=2.

Las muestras a pH=4 y pH=8 no mostraron ninguna alteración perceptible, observándose en el microscopio óptico la estructura núcleo-corteza original.

Por último la muestra a pH =10 mostró unas cápsulas con aspecto deformado aunque con la fragancia en el interior. Este efecto ya se observó en experimentos donde se tuvo que aplicar un proceso de entrecruzamiento a pH básicos. La explicación sobre este efecto no se acabó de definir del todo.

➤ Cápsulas de poliamida

Todas las suspensiones de cápsulas poliamida se acumularon en la parte superior de la suspensión al cabo de una semana. No obstante en el microscopio óptico se detectaron algunas diferencias (**Figura 7.3**).

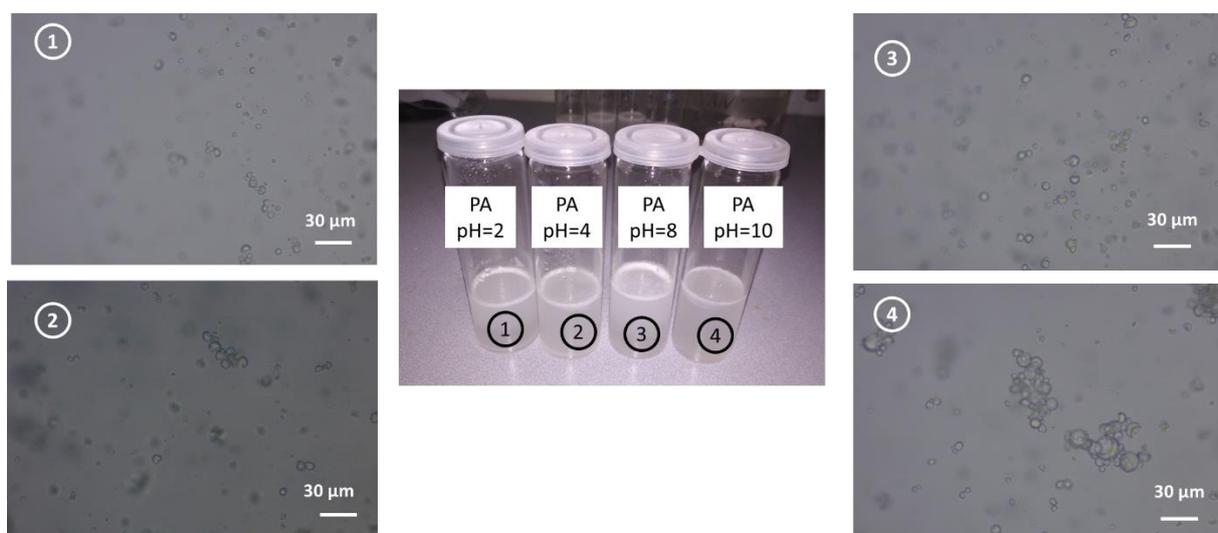


Figura 7.3. Aspecto macro- y microscópico de las cápsulas PA con TROPICAL a diferentes pH.

A pH ácidos, las cápsulas se encuentran bien aisladas entre sí, aunque la fragancia ocupa una región específica del núcleo, formando un aspecto de media luna. Esto puede ser debido a la entrada de agua al interior de la cápsula por su mayor permeabilidad, efecto que se explica en el **Capítulo 4**.

A pH neutros o básicos, este efecto de intrusión de agua no es tan evidente pero se observa una mayor agregación. Esto puede deberse a que a estos pH la cápsula no es tan permeable al no protonarse las aminas terminales y esta falta de carga superficial permite una mayor floculación.

➤ Cápsulas MF

A nivel macroscópico todas las muestras a pH entre 4 y 10 se acumularon en la parte superior de la suspensión mientras que la muestra a pH=2 presentaba un aspecto distinto como se puede comprobar en la **Figura 7.4**.

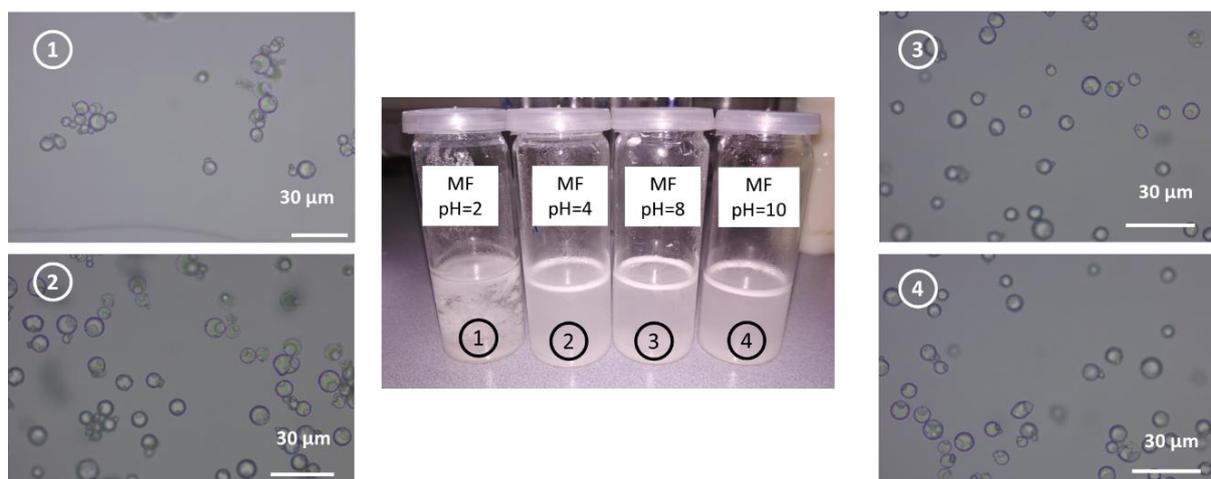


Figura 7.4. Aspecto macro- y microscópico de las cápsulas MF con TROPICAL a diferentes pH.

El análisis por microscopía óptica mostró que la muestra a pH=2 presentaba una agregación de las cápsulas mientras que el resto se encontraban aisladas entre si. La explicación ante esto podría ser que el poly-MA ($pK_{a1} \approx 6$, $pK_{a2} \approx 10$) [1], estabilizante aniónico en un amplio rango de pH, tuviera protonados los grupos carboxilo, y por lo tanto, disminuyera su eficiencia para mantener las partículas separadas.

7.2.2. Estabilización de las suspensiones en combinación con polielectrolitos y modificadores reológicos

La estabilización física de las suspensiones de cápsulas frente a procesos de floculación, sedimentación y agregación es sumamente importante para las aplicaciones finales así como también para mantener la estructura de las cápsulas en su almacenamiento y no perder carga útil, como se comprobó en algunas síntesis realizadas. Una manera de reducir esta tendencia es controlar la composición química de las cápsulas para ajustar densidad, tamaño y carga superficial. De todos modos, tras haber definido la fragancia a encapsular, la corteza y el diámetro de las suspensiones, no quedan parámetros a modificar para evitar procesos de desestabilización coloidal. Para evitar procesos de agregación, floculación y/o sedimentación es necesario la combinación con aditivos incluidos en la suspensión de microcápsulas. Los propuestos para mejorar la estabilidad coloidal son:

1. Uso de polielectrolitos para evitar la agregación mediante cargas.
2. Uso de modificadores reológicos para disminuir la tendencia a la floculación/sedimentación.

En el proyecto de MICROFRAG se definió una formulación estabilizante para las cápsulas de poliamida tanto para modificar las propiedades reológicas cómo para mantener a las cápsulas separadas entre sí mediante la acumulación de cargas positivas que generaran fuerzas repulsivas entre sí.

La formulación que se estableció fue:

- 0.2%p/p de goma de xantano (XG, modificador reológico o de viscosidad)
- 1%p/p de Poly (diallyl methyl ammonium chloride) o PolyAmCl, un polielectrolito de carga negativa.

Para definir los aditivos necesarios para estabilizar las cápsulas sintetizadas en el marco de este proyecto se hizo un estudio previo del efecto de polielectrolitos y modificadores de viscosidad de las suspensiones

7.2.2.1. Estudio del efecto de la presencia de polielectrolitos en la estabilidad de las cápsulas

Como punto de partida se analizó el comportamiento de cápsulas de MF aplicadas a medios cargados. Los medios seleccionados fueron:

- Medio acuoso con predominio cargas positivas (emulando a un suavizante)
- Medio acuoso con predominio cargas negativas (emulando a un detergente)

La elección de usar cápsulas MF para estudiar estos efectos de floculación/sedimentación fue por la mayor resistencia de las cortezas y evitar así rupturas y agregaciones por otras vías.

Las cápsulas, con buena dispersión a causa del poly-SMA presente en la suspensión, fueron limpiadas para retirar la mayor cantidad del estabilizante aniónico. Tras la limpieza, las cápsulas se agregaron ligeramente, señal de que se había perdido la capacidad estabilizante del poly-SMA por la disminución de su presencia (**Figura 7.5**).

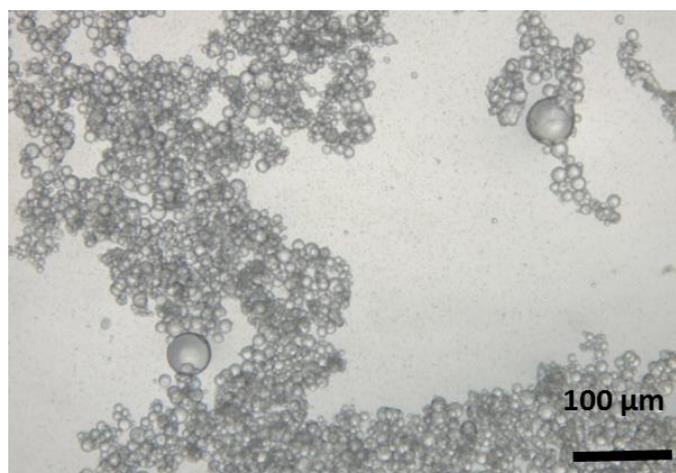


Figura 7.5. Imagen de microscopio óptico de microcápsulas MF TROPICAL mostrando floculación tras la eliminación de la mayor parte del poly-SMA en disolución.

Tras esta observación, se separó la muestra en dos suspensiones de las cuales una fue estabilizada con un polianión (Poly-SMA) y la otra con un polication (PolyAmCl. Tras esta mezcla se apreció rápidamente la desagregación por la generación de cargas repulsivas entre las microcápsulas. A partir de estas suspensiones preparadas se realizó un estudio donde se introdujeron en matrices cargadas positiva y negativamente.

➤ **Estudio de estabilidad coloidal de cápsulas en una matriz de carga positiva (Esterquat)**

Las microcápsulas estabilizadas con los correspondientes polielectrolitos se introdujeron en una solución al 1%p/p de tensioactivo catiónico (esterquat). En el caso de las cápsulas estabilizadas con un polielectrolito negativo, éstas se agregaron entre sí, hasta tal punto que algunas se llegaron a deformar. Por otro lado, las cápsulas estabilizadas con el polication, se dispersaron sin ningún problema por toda la matriz (**Figura 7.6**).

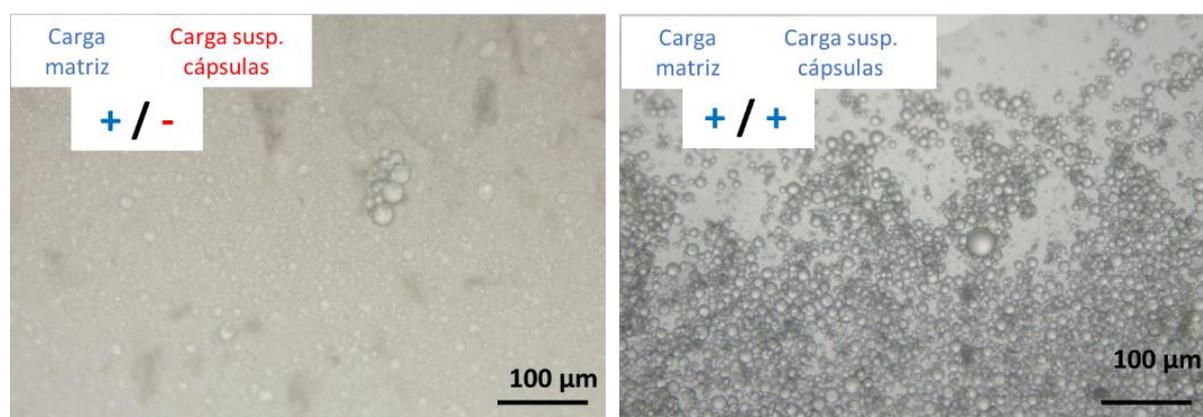


Figura 7.6. Imágenes de microscopio óptico de la estabilidad coloidal observada de cápsulas MF estabilizadas con polielectrolitos e introducidas en una matriz de carga positiva (esterquat).

➤ **Estudio de estabilidad coloidal de cápsulas en una matriz de carga negativa (Poly-SSA)**

El otro medio donde las cápsulas fueron dispersas aplicadas fue uno con *poly-4-styrene sulfonic acid* (Poly-SSA) al 1%p/p. Este polielectrolito pertenece a la familia de los polialquilsulfonatos y son usados ampliamente en formulaciones detergentes.

En el caso de las cápsulas estabilizadas con carga negativas, las cápsulas se dispersaron correctamente, por la similitud de cargas. En cambio en el caso de las cápsulas estabilizadas positivamente, tendieron a agregarse. El efecto fue parecido al ocurrido en el caso de la solución catiónica, donde algunas cápsulas floccularon entre sí (**Figura 7.7**).

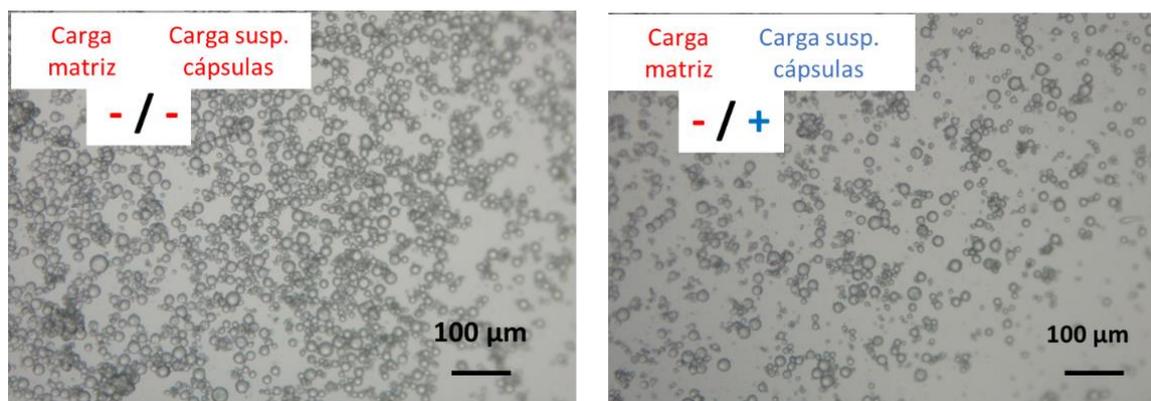


Figura 7.7. Imágenes de microscopio óptico de la estabilidad coloidal observada de cápsulas MF estabilizadas con polielectrolitos e introducidas en una matriz de carga negativa (PSSA).

De manera esquemática, los resultados observados tanto macroscópicamente como microscópicamente vienen respresentados en la **Tabla 7.1**.

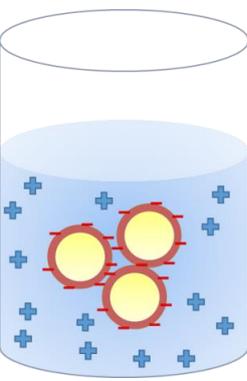
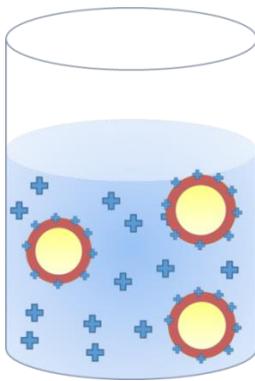
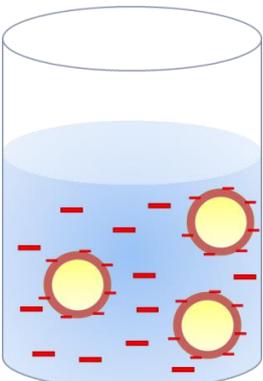
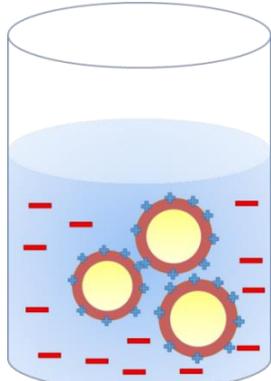
| | Cápsulas estabilizadas con Poly-SMA (-)  | Cápsulas estabilizadas con PolyAmCl (+)  |
|---|--|--|
| Matriz: Esterquat (+)  |  |  |
| Matriz: PSSA (-)  |  |  |

Tabla 7.1. Resumen esquemático de las interacciones entre las microcápsulas estabilizadas con polielectrolitos y las distintas matrices donde se incorporaron.

7.2.2.2. Estabilidad mediante el uso de modificadores de viscosidad

El propósito de este estudio preliminar fue lograr nuevas formulaciones con propiedades reológicas adecuadas con el objetivo de lograr suspensiones de microcápsulas estables en el tiempo. El sistema optimizado en MICROFRAG usa un biopolímero, la goma de xantano, pero se requiere también el uso de un polielectrolito de origen sintético (PolyAmCl).

En este caso se quiso investigar de manera preliminar la capacidad de estabilización de las suspensiones de cápsulas con el uso de otros compuestos de origen natural. La lista de polímeros usados se lista a continuación:

- Goma de xantano: la goma de xantano es un polisacárido obtenido por secreciones de un tipo concreto de bacterias. A bajas concentraciones es capaz de incrementar la viscosidad de manera importante, y también tiene la propiedad de ser un polielectrolito negativo a un rango muy amplio de pH, parecido a a goma arábica.
- Goma arábica: su uso como estabilizante de emulsiones es ampliamente conocido, además de su carácter aniónico en solución.
- Gelatina: la gelatina a bajas concentraciones es capaz de incrementar la viscosidad del medio, incrementándose esta al disminuir la temperatura
- Celulosa microfibrilada (MFC): este tipo de celulosa se obtiene mediante un proceso de fibrilación obteniendo como resultado una suspensión de fibras de pocos nanómetros de diámetro. Estas suspensiones tienen alta capacidad de retención de agua y un gran poder espesante entre otras características.
- Alcohol polivinílico (PVA): estabilizante coloidal de carga neutra que dependiendo del grado de hidrólisis y el peso molecular, muestra unas viscosidades concretas.
- Quitosano: polisacárido obtenido a partir de la quitina de los caparzones de los crustáceos. Es soluble a pH ácidos, actuando como polielectrolito positivo y mostrando alta viscosidad a bajas concentraciones

Para su aplicación en las microcápsulas se usaron diferentes concentraciones, abarcando un rango desde 2% hasta 0.5% en peso, siendo ésta última concentración la óptima para realizar los estudios de seguimiento. La idea inicial fue la de usar la misma concentración de cada estabilizante para realizar comparativas adecuadas.

En la imagen inferior se muestra la evolución de una suspensión de microcápsulas de poliamida con la fragancia TROPICAL y su evolución a nivel macroscópico en 7 días (**Figura 7.8**)

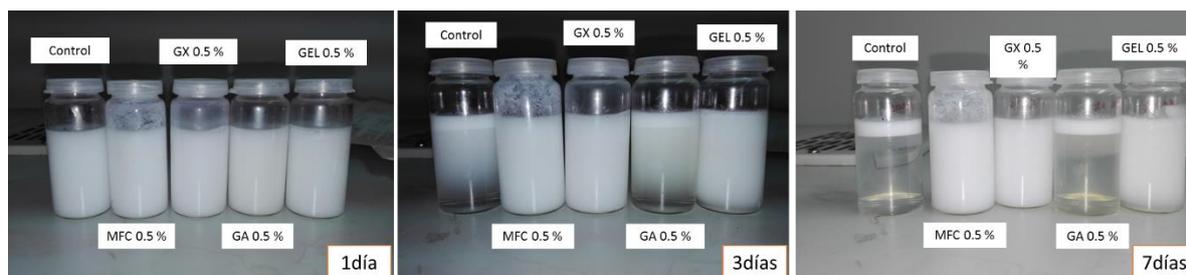


Figura 7.8. Fotografías mostrando el aspecto de las suspensiones de microcápsulas de poliamida con TROPICAL en un periodo de 7 días en combinación con los diferentes polímeros estabilizantes.

Como puede comprobarse, en el caso de no incorporar ningún modificador de la viscosidad, las cápsulas acaban flotando completamente al cabo de unos días. Con la goma arábica, la flotación se retrasa, pero pasados 7 días el aspecto acaba siendo igual que la muestra control. Por otro lado, la gelatina, la goma de xantano y la celulosa sí que mostraron capacidad para estabilizar las suspensiones de microcápsulas durante un largo periodo de tiempo. No obstante, la muestra de gelatina, finalmente demostró no ser útil ya que se produjo un gel. Este producto sólo sería redispersable tras la aplicación de temperatura para revertir la gelificación (**Figura 7.9**)



Figura 7.9. Suspensión de microcápsulas tras 7 días con el uso de gelatina como estabilizante.

Las muestras con PVA y el quitosano no se muestran ya que las pocas pruebas realizadas con estos polímeros no fueron del todo satisfactorias y se descartaron. Para el caso del quitosano, éste precipitó al mezclarlo con las microcápsulas y en el caso del PVA hubo flotación, generándose una capa compacta de sólido en la parte superior difícilmente redispersable.

Este estudio por lo tanto, merece especial atención y un desarrollo más profundo en el futuro, utilizando diferentes concentraciones y la posibilidad de mezclar algunos de estos polímeros para dotar a las suspensiones de la mayor estabilidad posible y que a la vez no afecte a su integridad estructural.

7.3. Aplicación de microcápsulas en tejidos

Como se mostró en la introducción, hace ya varios años que muchos productos de detergencia, sobretodo suavizantes, incorporan en su formulación un porcentaje de fragancia encapsulada para proporcionar un olor duradero tras su aplicación en la ropa. Esta percepción sensorial de buen olor tras varios días es muy agradecida por el consumidor ya que lo atribuye a ropa limpia y buena higiene en general.

Por todo esto uno de los objetivos de este proyecto es el de estudiar la adherencia de las cápsulas en tejidos y para ello se evaluaron los tres tipos de cápsulas desarrollados con la formulación Tropical Fruit 780765 (TROPICAL). Para ello, se establecieron una serie de pautas para realizar una comparativa correcta. Esto es muy importante ya que en caso de no establecer las concentraciones más adecuadas (orden de magnitud similar al que se establece en el tambor de la lavadora), se pueden obtener resultados aparentemente muy positivos de adherencia debido a un exceso de microcápsulas en el tratamiento. Un ejemplo de ello se muestra en la **Figura 7.10**, donde se aplicaron microcápsulas a una concentración demasiado alta. A nivel visual es muy impactante ya que permite observar cómo se adhieren las cápsulas a la superficie del tejido y además a nivel olfativo la liberación es más que evidente ya que como bien se ha dicho, las cantidades superan de una manera excesiva lo que realmente aplica un consumidor en su ropa.

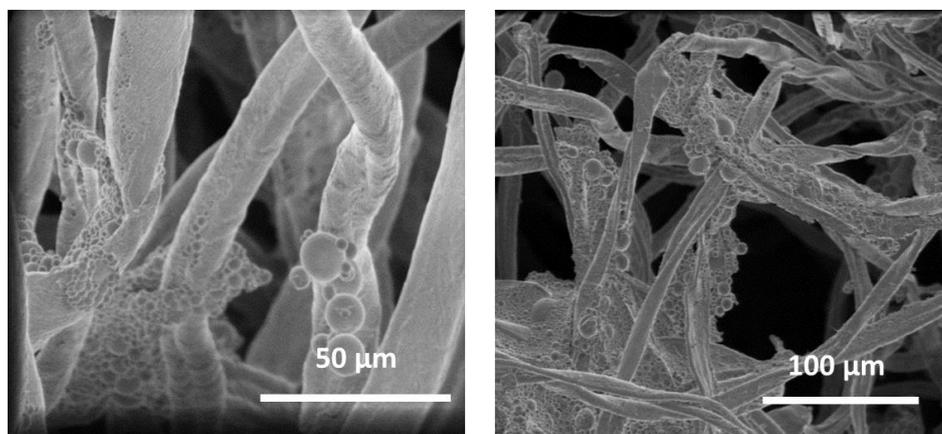


Figura 7.10. Imágenes SEM de tejidos de algodón impregnados con un exceso de microcápsulas.

Las concentraciones habituales de fragancia en los suavizantes es alrededor de un 1%p/p por lo que teniendo en cuenta la dilución en el tambor, la concentración disminuye entre 1 y 2 órdenes de magnitud.

7.3.1. Aplicaciones en baños de agua

Previo a la aplicación de una mezcla de las cápsulas con una base de suavizante, se quiso estudiar la interacción de los diferentes tipos de cápsulas con los tejidos. Para esto se propuso como tejido modelo una toalla de algodón de gramaje grande y una camiseta de algodón, tejido muy usado en diferentes tipos de ropa. Para el estudio de adhesión se escogieron suspensiones de todos los tipos de cápsulas desarrolladas con la fragancia objetivo sin estabilizantes añadidos (**Tabla 7.2**).

| Características muestra | PA | GEL/GA | MF |
|---|-------|--------|-------|
| Concentración inicial de cápsulas | 15% | 15% | 30% |
| Cantidad de suspensión usada | 4g | 4 g | 2 g |
| Masa total suspensión para impregnación | 400 g | 400 g | 400 g |
| Concentración final de cápsulas | 0.15% | 0.15% | 0.15% |

Tabla 7.2. Condiciones establecidas para la impregnación de tejidos con los diferentes tipos de microcápsulas.

La concentración de cápsulas en las suspensiones se controló de manera tal que la concentración final de fragancia fuera la misma en los tres sistemas para poder comparar todos los análisis posteriores (0.15%p/p). Esta concentración es un orden de magnitud mayor que lo que se obtiene en el tambor de la lavadora, pero se creyó conveniente incrementarlo para asegurar la visualización de las microcápsulas por microscopía.

Respecto a la impregnación de tejidos, existen diferentes estrategias para la incorporación de microcápsulas funcionales [2-6]. En este caso, las pruebas se realizaron mediante dos procedimientos diseñados para una escala laboratorio. Los dos métodos se basan en la impregnación de un trozo de tejido de unas dimensiones establecidas (5x5cm) mediante un proceso de inmersión o *dip coating* y otro basado en un proceso de agitación. Con el primer método se hace una estimación de la adhesión de las cápsulas con los tejidos mientras que con el segundo se simula las condiciones del tejido durante un proceso en la lavadora. Estos procesos vienen representados esquemáticamente en la **Figura 7.11**. Para más detalles del procedimiento consultar **Protocolo IMP.1**.

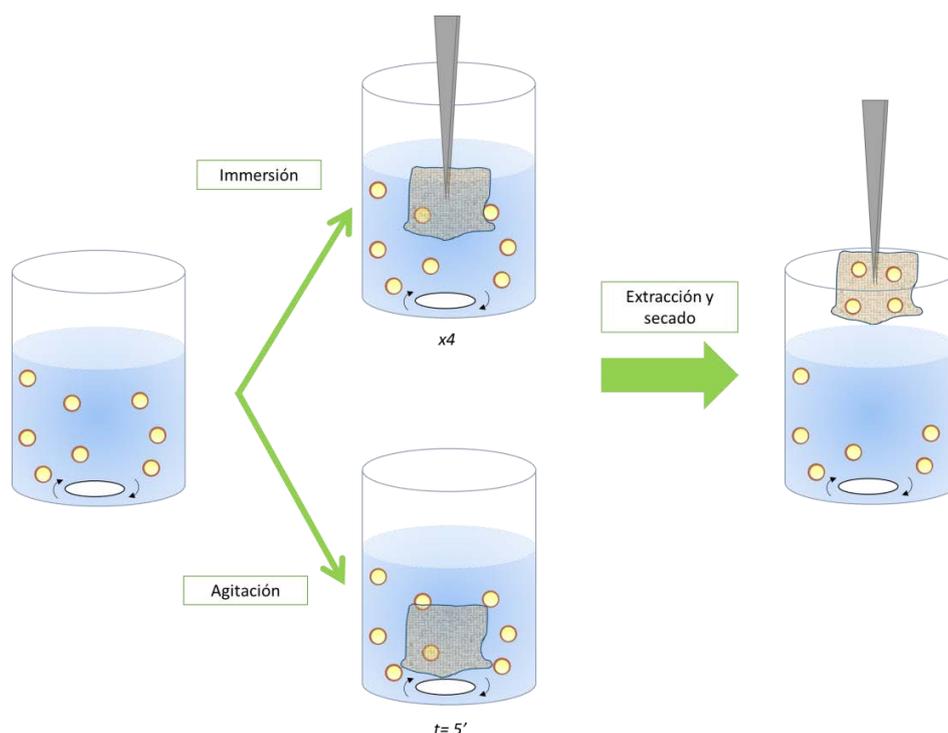


Figura 7.11. Representación gráfica mostrando los dos procesos de impregnación de tejidos realizados con las suspensiones de microcápsulas.

A continuación se muestran los resultados de impregnación obtenidos por los diferentes procesos con las suspensiones de cápsulas de fragancia TROPICAL de menor tamaño.

➤ Cápsulas GE/GA

La naturaleza de tipo gelatinoso del polímero de la corteza, hace prever que la interacción con un tejido de algodón proporcionará una mayor adherencia. Además, la presencia de grupos funcionales en la corteza con capacidad de generar puentes de hidrógeno con el sustrato, debería mejorar la interacción con los tejidos.

Para este estudio se usaron suspensiones de cápsulas de 10-25 μm sin estabilizantes añadidos y con cargas útiles de $\approx 50\%$. Las muestras de tejido se impregnaron con ambos procedimientos y posteriormente se dejaron secar al aire. Tras el secado, los tejidos produjeron un olor a la fragancia TROPICAL tras el frotamiento manual. No obstante, la respuesta olfativa se esperaba que fuera más intensa. Esto se podría atribuir a una baja cantidad de microcápsulas depositadas o a una posible ruptura tras el secado.

Para verificar esto se realizó un análisis de una pequeña porción del tejido por SEM. La visualización de este tipo de cápsulas resultó ser más complicada que con los otros tipos de cápsulas por su capacidad de elongación y para quedarse agarradas a las fibras, hecho que provoca que no se observen

cápsulas esféricas sino protuberancias en las propias fibras. La detección de cápsulas es factible en muchos casos por cambios detectados en el contraste por la interacción del haz de electrones con los polímeros de corteza. En las imágenes de la **Figura 7.12** se muestran las zonas donde se localizaron cápsulas marcadas con flechas. Debido a esta dificultad para la visualización de cápsulas, no se pudo comprobar con precisión el grado de penetración de estas cápsulas en las fibras más internas.

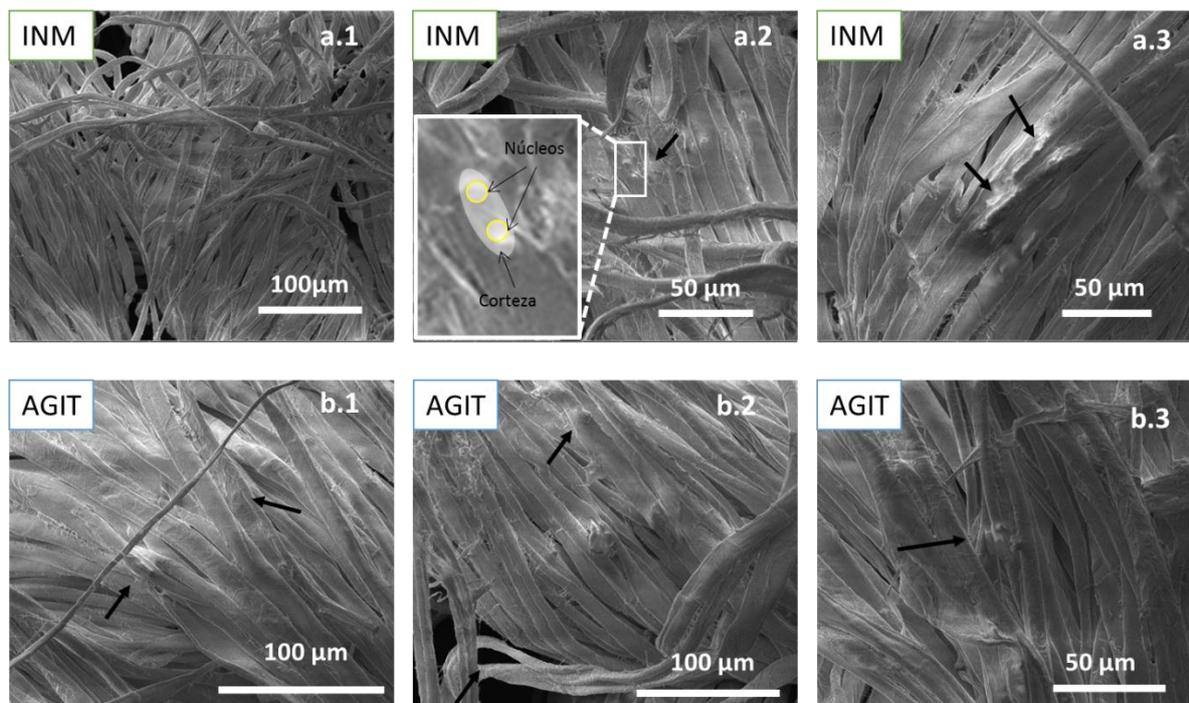


Figura 7.12. Imágenes de SEM de los tejidos de algodón impregnados con cápsulas de TROPICAL por coacervación mediante ambas metodologías de impregnación (AGIT=agitación, INM= inmersión).

En cuanto a los diferentes métodos de impregnación, no se observaron cambios relevantes. La mayoría de las cápsulas observadas se localizaron en las fibras exteriores. Esto podría deberse a que, aun aplicando un procedo de agitación, las cápsulas ya quedan fijadas en las primeras fibras con las que entran en contacto.

➤ Cápsulas PA

Para el estudio de fijación a tejido de las cápsulas de poliamida se utilizaron las de tamaños entre 3 y 10 μm . Estas cápsulas se espera que se integren mejor en las fibras por su tamaño reducido así como también por fuerzas de tipo enlace de hidrógeno entre las aminas de las cortezas poliméricas y los grupos hidroxilo del tejido.

Los tejidos impregnados con cápsulas de poliamida, también mostraron una respuesta inmediata a nivel olfativo tras su frotamiento. No obstante, el olor percibido presentaba variaciones respecto a las

notas de salida originales de la fragancia. Esto podría ser debido a la alteración química de la formulación en el proceso de síntesis, o la pérdida de volátiles provocada por el efecto de inflamamiento observado.

Las imágenes obtenidas por SEM (**Figura 7.13**) mostraron la deposición de grandes cantidades de microcápsulas sobre las fibras. Las cápsulas mantenían su morfología esférica con una ligera elongación y en algunas regiones se observaron agregados de cápsulas. Se confirmó además que el uso de cápsulas de estos tamaños además la introducción de cápsulas en fibras situadas en regiones más internas y en recovecos de las mismas.

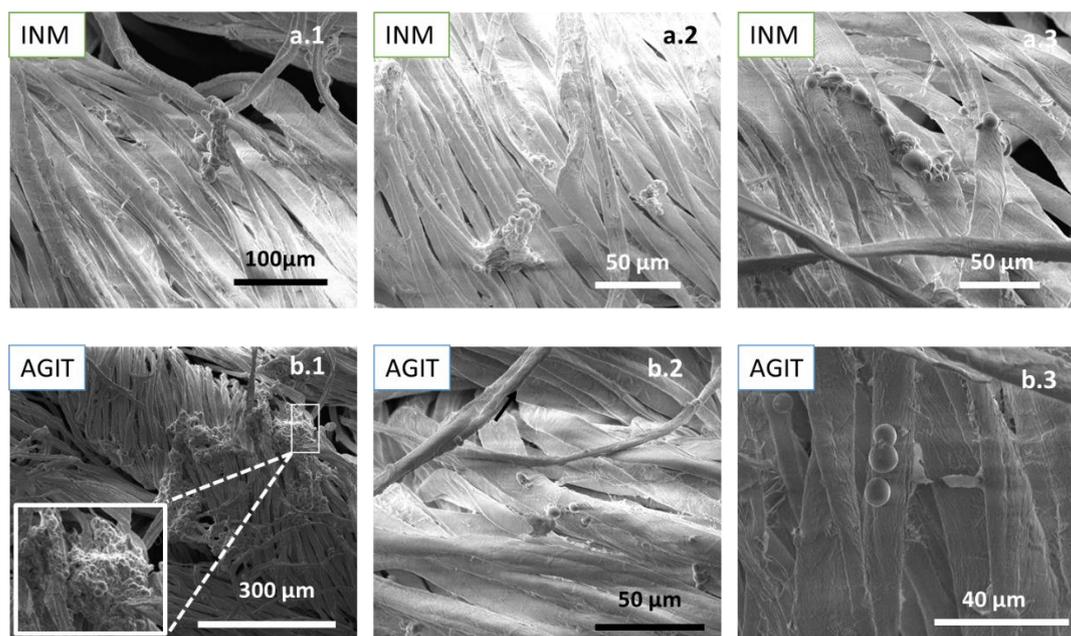


Figura 7.13. Imágenes de SEM de los tejidos de algodón impregnados con cápsulas de TROPICAL por polimerización interfacial mediante ambas metodologías de impregnación (AGIT=agitación, INM= inmersión).

La posible diferencia de los métodos de impregnación se comprobó también mediante la cantidad de cápsulas localizadas en diferentes regiones de los tejidos. En general la presencia de microcápsulas fue más o menos parecida en ambos sistemas, aunque en el caso de la agitación sí que se observó deposición de cápsulas aisladas en recovecos más internos del tejido.

➤ Cápsulas MF

Por último se impregnaron los tejidos con cápsulas de melamina donde se espera que también se produzcan interacciones de tipo puente de hidrógeno entre la corteza polimérica y las fibras de algodón. Tras la impregnación y su secado se apreció una buena respuesta olfativa tras el frotamiento. El olor percibido no mostró grandes diferencias respecto a la suspensión de cápsulas original, lo que confirma la presencia de cápsulas estables en las fibras del tejido.

Las imágenes de SEM mostraron una gran cantidad de microcápsulas repartidas de manera bastante homogénea por el tejido (**Figura 7.14**). En este caso, las cápsulas no mostraron ninguna elongación debido a la rigidez de la corteza. En las partes más internas de los tejidos no se observaron cápsulas y la mayoría reposaban sobre las fibras o quedaban atrapadas entre estas.

Comparando el método de impregnación, no se observó diferencias significativas en cantidad de cápsulas ni tampoco en las zonas de deposición.

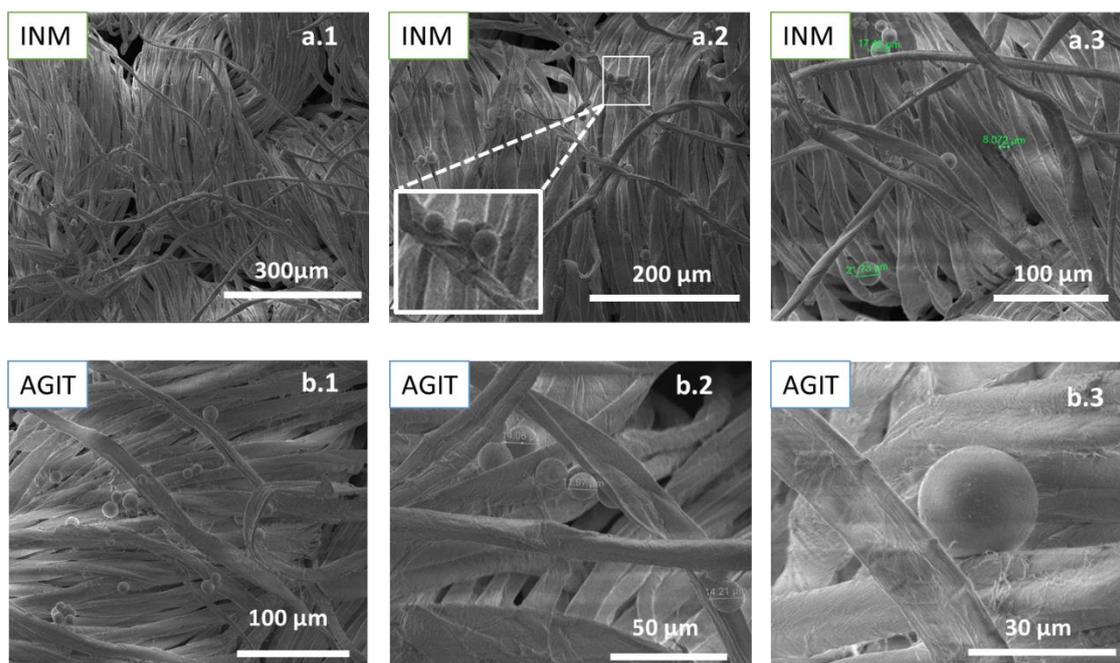


Figura 7.14. SEM de los tejidos de algodón impregnados con cápsulas de TROPICAL por polimerización in-situ mediante ambas metodologías de impregnación (AGIT=agitación, INM= inmersión).

De manera resumida, en la **Tabla 7.3** se muestran los diferentes aspectos observados en la impregnación de los tejidos.

| Capsulas | Adhesión observada Inmersión/agitación | Intensidad olfativa | Observaciones |
|----------|---|------------------------|------------------------------------|
| GEL/GA | *** / ** | ** | |
| PA | *** / *** | *** | Variaciones en las notas de salida |
| MF | *** / ** | *** | |

* Baja
** Moderada
*** Alta

Tabla 7.3. Resumen de los parámetros cualitativos observados tras la impregnación de tejidos.

Para la determinación olfativa, se colaboró con los expertos perfumistas de CARINSA mediante el rascado de porciones de tejido tratado con las microcápsulas y el posterior análisis sensorial. En este

caso, al tratarse de un análisis preliminar, la evaluación fue muy simplificada. En próximos estudios se valora realizar un estudio más complejo con la colaboración de todos los perfumistas y personal de la compañía.

Además, se plantean una serie de estudios más exhaustivos para la determinación de la deposición de microcápsulas como, por ejemplo, mediante la determinación de diferencia de peso de los tejidos antes y después de los tratamientos o tras realizar procesos de aclarado, sumergiendo el tejido tratado en agua limpia y volver a analizar la retención.

Otro factor a tener en cuenta es que la mayoría de las microcápsulas presentes en las aguas no se adhieren a las prendas. Para mejorar la fijación se propone en el futuro el uso de fijadores o *binders*. Los fijadores son polímeros formadores de películas que tienen el propósito de enganchar de forma efectiva las microcápsulas sobre las fibras de tejidos. Procesos como el aclarado, o simplemente el movimiento, puede hacer caer las microcápsulas y por lo tanto perder su funcionalidad. Con el uso de estos compuestos, se retrasan estos procesos antes mencionados (**Figura 7.15**).

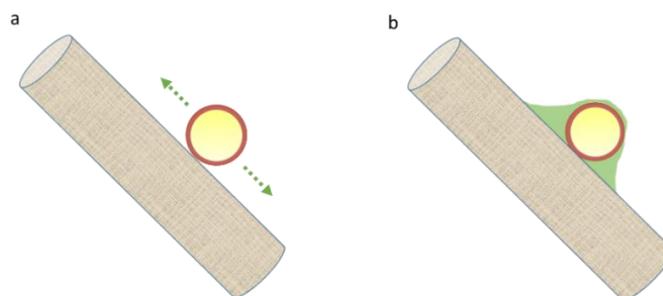


Figura 7.15. Representación gráfica de la deposición de una microcápsulas sobre una fibra sin fijador (**a**) y con la presencia de un fijador (**b**).

Es importante no confundir estos fijadores o *binders* con los aceites empleados para la retención de fragancias, también denominados fijadores en español. En este caso, los compuestos más comunes usados como *binders* de microcápsulas son resinas de tipo acrílico, tipo poliuretano o basados en siliconas. No obstante también se está investigando sobre el uso de polímeros biodegradables hidrosolubles que tengan este comportamiento. Por supuesto, estos compuestos deben ser compatibles con la superficie de las microcápsulas y del tejido para crear la mayor adhesión posible.

7.3.2. Estudios para una aplicación por pulverización

Otra vía de aplicación de las microcápsulas sobre tejidos es un proceso de pulverizado. Esta metodología es más directa que la aplicada en procesos de lavado, depositándose prácticamente la totalidad de las microcápsulas sobre el tejido (**Figura 7.16**).

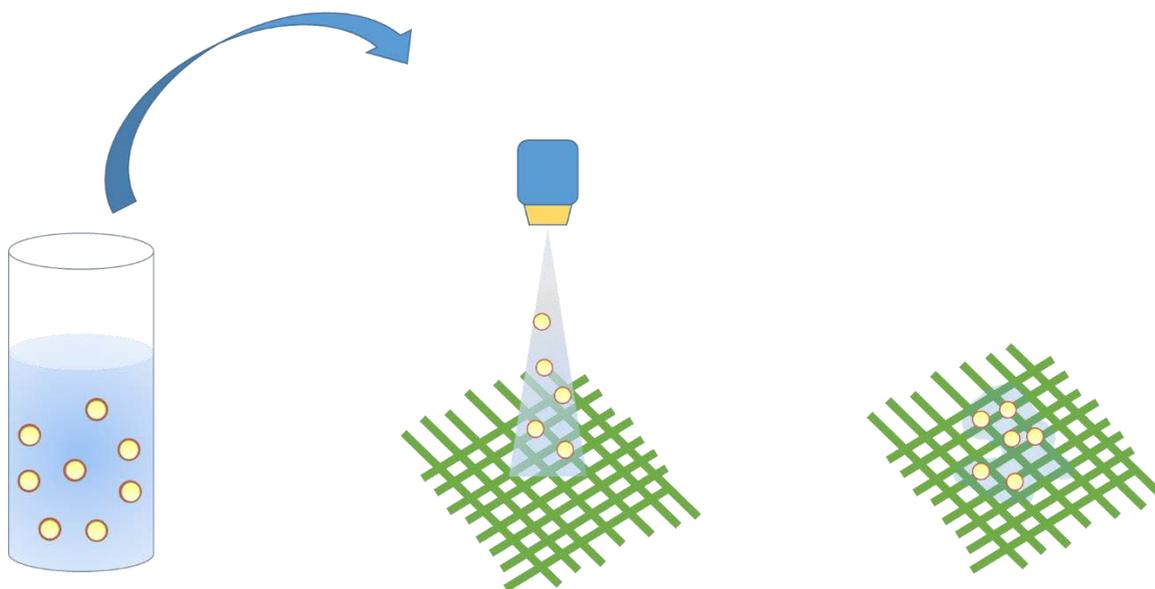


Figura 7.16. Esquema de un proceso de pulverizado de una suspensión de cápsulas sobre un tejido.

Dos de los factores más relevantes a tener en cuenta en este tipo de aplicación es la resistencia de las cápsulas a través del dispositivo de pulverización y la resistencia tras el impacto.

En el proceso de pulverizado el grado de penetración de las cápsulas en un tejido puede no ser tan elevado como en un proceso de lavado donde las fibras se mueven libremente, no obstante, el porcentaje de atrapamiento de microcápsulas es mucho mayor que en un proceso de lavado y por lo tanto puede dar lugar a un mayor impacto olfativo por la mayor cantidad de cápsulas. Por supuesto, el grado de fijación dependerá de muchos más factores como puede ser el tipo de la trama del tejido y la afinidad de las microcápsulas con éste, la distancia de aplicación o la adición de fijadores.

Como prueba de concepto, se quiso realizar una serie de pruebas preliminares de aplicación de las suspensiones acuosas de microcápsulas de fragancia en los tejidos. En los experimentos se quiso investigar inicialmente la resistencia de las cápsulas al pasar por el orificio del pulverizador y al impactar contra una superficie. Se usó un pulverizador convencional usado en productos de limpieza cuyo tubo de recogida se sumergió directamente en las suspensiones de cápsulas. Las muestras fueron

pulverizadas sobre una superficie dura y lisa recubierta con papel de aluminio de una superficie de 900 cm² (30cmx30cm).

Con los tres tipos de microcápsulas se realizaron una serie de tres pulverizaciones a 20 cm de distancia (distancia normalmente usada para aplicar productos pulverizados) con suspensiones 0.5% en peso de microcápsulas, concentración que se creyó suficiente para este propósito. A continuación se dejó evaporar el agua al aire y se recortó una fracción central de 1cm² para su análisis por microscopía SEM.

En los tres casos (GEL/GA, PA y MF) las cápsulas parecieron resistir el pulverizado y su posterior impacto contra la superficie ya que se encontraron cápsulas que mantuvieron su estructura en todas las muestras analizadas (**Figura 7.17**).

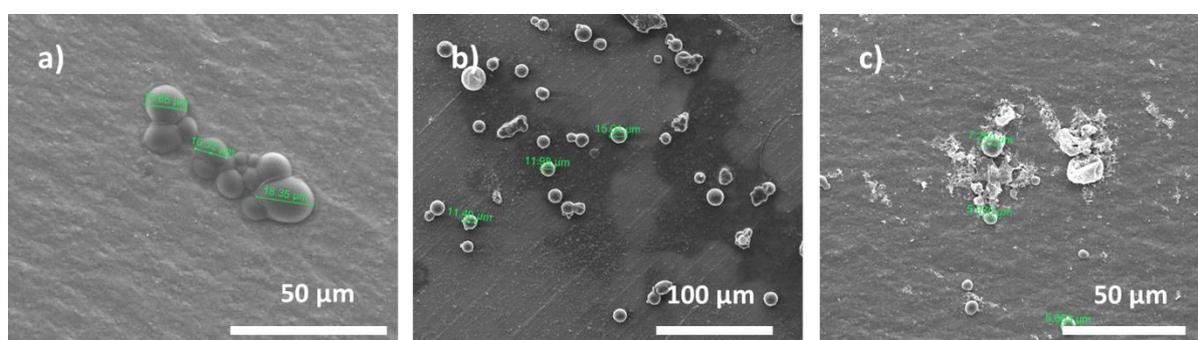


Figura 7.17. Imágenes de SEM de las diferentes cápsulas tras su pulverización sobre una superficie de aluminio. A) Cápsulas GEL/GA b) Cápsulas MF y c) Cápsulas PA.

En el caso de las cápsulas de gelatina-goma arábica (**Figura 7.17.a**), no se repartieron de manera uniforme sino que tendieron a crear agregados de 5-20 cápsulas al secarse. Esto podría deberse sencillamente a la la tendencia de estas cápsulas a juntarse cuando el agua se evapora.

Las cápsulas de melamina-formaldehído se repartieron de una manera más uniforme por la superficie estando separadas las unas de las otras (**Figura 7.17.b**). En algunos casos se observó un halo oscuro, señal de que alguna cápsula liberó el contenido ya fuera en el paso a través del pulverizador o al impactar.

Por último, en el caso de la poliamida, se observó una gran cantidad de residuo junto a las cápsulas localizadas que se atribuyó a restos de PVA o algunas cápsulas rotas (**Figura 7.17.c**).

Tras observar estos primeros resultados, se confirmó el hecho de que prácticamente todas las microcápsulas soportaron el pulverizado y el impacto posterior sobre la superficie ya que la proporción de cápsulas rotas fue muy baja. Además, se realizó una fricción sobre otra sección de la superficie pulverizada y se detectó el olor de la fragancia liberada más acentuado que el obtenido en el caso de tejidos lavados, resultado que confirmó la presencia de cápsulas. El paso posterior de este

experimento de pulverización consistirá en aplicar estas microcápsulas sobre un tejido, donde debería tener más afinidad y el impacto debería ser menor al ser ésta una superficie menos dura.

De manera tentativa, se realizó una pulverización sobre tejido con las cápsulas de PA, para corroborar su estabilidad estructural al choque con el tejido. El resultado se muestra en la **Figura 7.18**. En este caso la presencia de cápsulas fue muy fácil de detectar al depositarse en las fibras más exteriores del tejido. Además, se confirmó la resistencia al paso por el pulverizador y en el impacto contra la fibra.

Los próximos pasos en relación a esta aplicación será la pulverización de las correspondientes suspensiones de cápsulas MF y GEL/GA para posteriormente evaluar olfativamente los tejidos y su deposición a través de microscopía SEM.

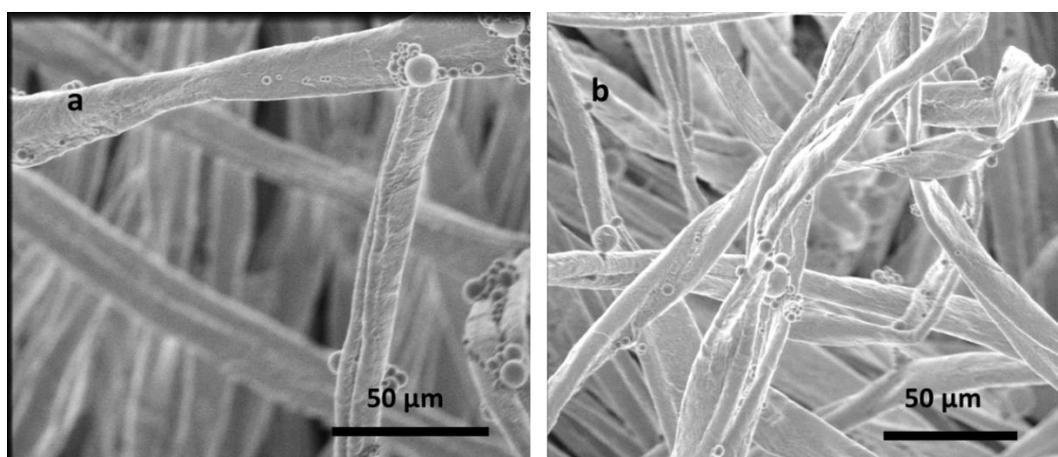


Figura 7.18. Imágenes SEM de tejidos de algodón tras la pulverización de microcápsulas de poliamida.

7.4. Conclusiones

Tras todas las pruebas preliminares realizadas con los diferentes tipos de microcápsulas de fragancia se sacaron las siguientes conclusiones.

- Se han realizado estudios de estabilidad de los diferentes tipos de cápsulas en rangos de pH que van desde ácido hasta alcalino. Cada tipo de microcápsula reacciona diferente al pH mediante procesos de agregación, deposición o disolución:
 - Las cápsulas MF presentan estabilidad coloidal en todo el rango de pH a excepción de pH=2, por la pérdida de cargas negativas procedentes del poly-SMA.
 - Las cápsulas PA aumentan su permeabilidad a pH básicos por el incremento de polaridad en su material de corteza.
 - Las cápsulas GEL/GA son estables en todo el rango de pH a excepción de pH=2 por la disolución de la corteza.

- Se realizaron estudios de estabilidad coloidal mediante el uso de suspensiones estabilizadas con polielectrolitos e incorporadas en matrices con cargas negativas y positivas. La mezcla de suspensiones y matrices de carga opuesta acaban afectando a la estabilidad coloidal de las cápsulas.
- La selección del modificador reológico también puede ser un elemento muy importante a tener en cuenta en la estabilización de las microcápsulas.
- Los tres tipos de microcápsulas desarrolladas se adhirieron a los tejidos de algodón en baños de agua aunque la percepción olfativa no fue equitativa. Todas las fragancias fueron detectables siendo las de MF las más intensas. En el caso de cápsulas de PA la percepción fue intensa pero con variaciones en algunas notas de salida. A nivel microscópico se pudieron localizar los distintos tipos de cápsulas adheridas a las fibras.
- La aplicación de pulverización por spray se validó para los tres tipos de microcápsulas resistiendo su paso por el pulverizador y su posterior impacto contra una superficie dura. Se realizó una pulverización de cápsulas de PA sobre tejido que validó los resultados obtenidos en la superficie dura.

7.5. Referencias

- [1] Dörr, J. M.; Scheidelaar, S.; Koorengel, M. C.; Dominguez, J. J.; Schäfer, M.; van Walree, C. A.; Killian, J. A. The Styrene–maleic Acid Copolymer: A Versatile Tool in Membrane Research. *Eur. Biophys. J.* **2016**, *45* (1), 3–21
- [2] Golja, B.; Šumiga, B.; Forte Tavčer, P. Fragrant Finishing of Cotton with Microcapsules: Comparison between Printing and Impregnation. *Color. Technol.* **2013**, *129* (5), 338–346.
- [3] Sánchez-Navarro, M. M.; Pérez-Limiñana, M. Á.; Arán-Ais, F.; Orgilés-Barceló, C. Scent Properties by Natural Fragrance Microencapsulation for Footwear Applications. *Polym. Int.* **2015**, *64* (10), 1458–1464.
- [4] Nelson, G. Microencapsulation in Textile Finishing. *Rev. Prog. Color. Relat. Top.* **2001**, *31* (1), 57–64.
- [5] Adamowicz, E. Microencapsulation of Active Substances and Fragrances in Textile Material Applications. **2015**, *64*, 128–132.
- [6] Alvarez, V. A.; Muñoz, V.; Gonzalez, J. S.; Martinez, M. A. Functional Textiles for Skin Care by Active Substance Encapsulation. *J. Text. Eng. Fash. Technol.* **2017**, *2* (6), 538–545.

Capítulo 8.

*Estudios de Productos
Comerciales
(‘Benchmarking’)*

En este último capítulo de la tesis se muestran estudios sobre productos comerciales, aunque el trabajo dedicado a ello se ha ido realizando durante toda la duración del proyecto. Entre estos productos se han analizado encapsulados de fragancias desarrollados por otras empresas, formulaciones con fragancias encapsuladas y otro tipo de productos con cápsulas.

Este estudio ha servido principalmente para entender el estado actual de las cápsulas comerciales y determinar qué parámetros se debían alcanzar en las cápsulas desarrolladas en este trabajo para que tuvieran prestaciones similares. Para ello, mayoritariamente se han analizado tamaños, morfologías y concentraciones.

8.1. Análisis de suspensiones de cápsulas de mercado

8.1.1. Análisis morfológico mediante microscopía

Las diferentes muestras de microcapsulas se analizaron por microscopía óptica y electrónica para determinar la distribución de tamaño, la morfología y para caracterizar la superficie de las cápsulas.

Para su visualización por microscopio óptico se tuvieron que diluir debido a la gran concentración y viscosidad que la mayoría presentan. En el microscopio óptico la mayoría de las cápsulas mostraron una estructura esférica en suspensión y también tras el secado, indicando que la corteza de estas cápsulas es impermeable y rígida.

Las suspensiones de cápsulas también fueron visualizadas a través de microscopia SEM. Mediante ésta técnica se pudo apreciar con más detalle la morfología y las posibles deformaciones que pueden sufrir las cápsulas en el proceso de secado y vacío (muy favorable si el contenido es volátil). Todas las cápsulas presentan una superficie lisa y sin presencia de grietas. La polidispersión de tamaño apreciada en la observación con el microscopio óptico también es evidente en el microscopio electrónico.

Por último también se realizaron análisis con la técnica de difracción de laser (Mastersizer®2000) para la determinación de los tamaños y polidispersión. En la **Figura 8.1** se recopila toda la información de las 4 muestras analizadas con sus imágenes de SEM y los perfiles de distribución de tamaño.

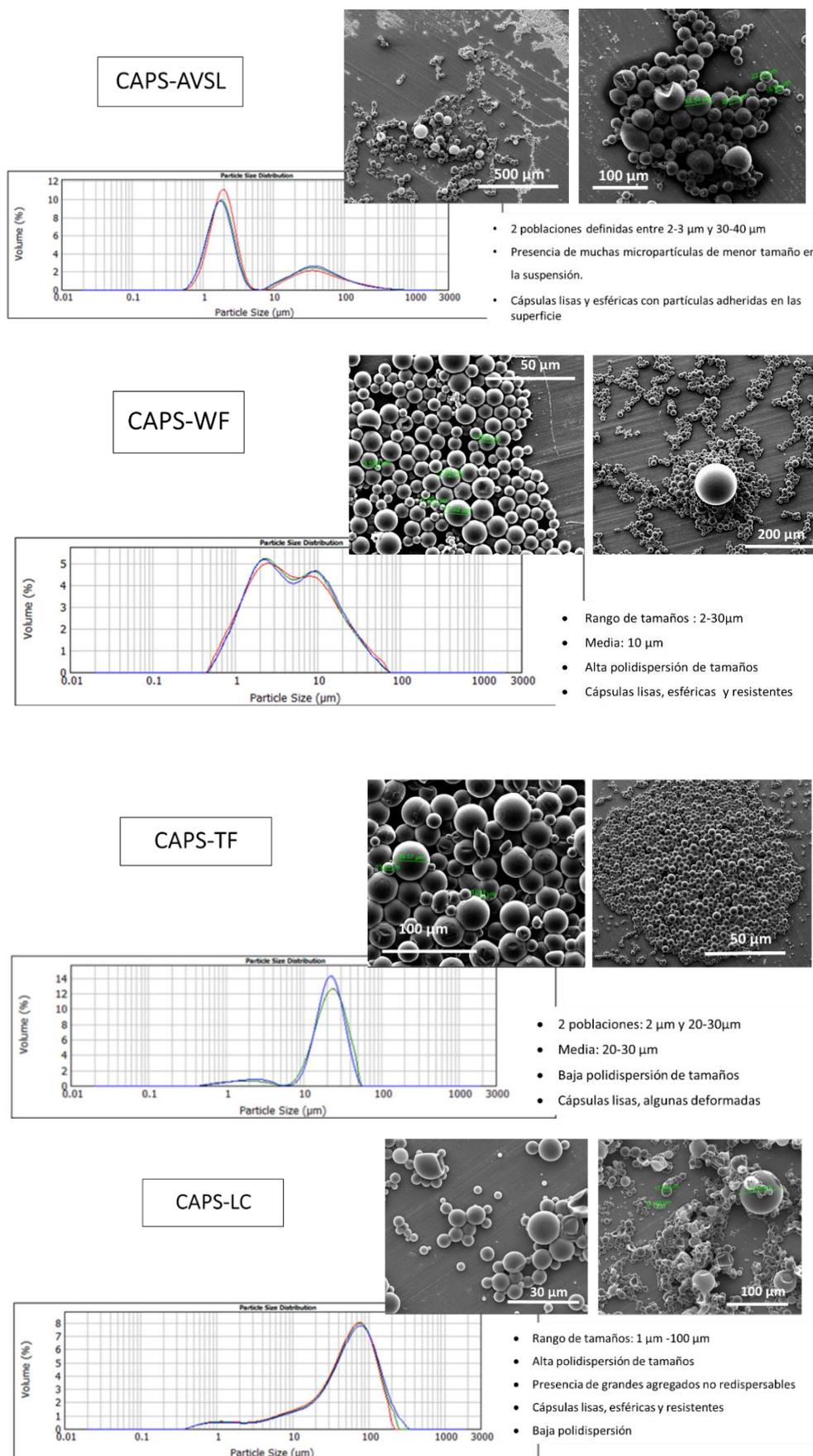


Figura 8.1. Caracterizaciones morfológicas y de distribución de tamaño de suspensiones acuosas de microcápsulas.

8.1.2. Aspecto macroscópico y concentración

A nivel macroscópico, las suspensiones parecían estables en el tiempo, sin presencia de grandes agregados y no producían separación de fases tras 4 semanas de almacenamiento. Esto verifica la adición de estabilizantes de carga y reológicos en cada una de las muestras.

La concentración de sólido en las dos muestras se determinó por liofilización de las suspensiones. El peso de cápsulas secas determinado se situó entre 35% y 30% en peso en todos los casos. Este sólido incluye las cápsulas y los posibles estabilizantes/tensioactivos utilizados para la síntesis y la estabilización.

8.2. Caracterización de suavizantes con cápsulas incorporadas

El análisis de las cápsulas de un suavizante resulta más complejo que el de las suspensiones acuosas de cápsulas debido a la concentración más baja de cápsulas (entre un 0.1 y 0.4% en peso) y la presencia de otros componentes necesarios en un suavizante (p.ej un tensioactivo catiónico). Esta composición del suavizante añade una cierta dificultad a la fase de separación, aislamiento y caracterización de las cápsulas ya que en algunos casos la presencia de otros tipos de partículas en el producto complica la identificación de las cápsulas. Además, la información respecto a las cápsulas no viene proporcionada en ninguno de los productos (material, concentración tamaño...).

En este proyecto se han analizado una serie de suavizantes comerciales con cápsulas de fragancia (Tabla 8.1).

| Muestras comerciales de suavizantes con cápsulas |
|--|
| 1. Marca 1 AZUL |
| 2. Marca 1 ROSA |
| 3. Marca 2 |
| 4. Marca 3 |

Tabla 8.1. Listado de suavizantes comerciales analizados.

Inicialmente los productos se analizaron por microscopía óptica para determinar el tamaño de las cápsulas y la concentración de éstas en el producto.

En ambos suavizantes de la **Marca 1** (Azul y Rosa) se pudieron identificar las cápsulas contenidas en el producto (**Figura 8.2**). Es fácil apreciar cómo respecto a las suspensiones mostradas en la sección anterior, la concentración de cápsulas es mucho menor. La morfología de las cápsulas es esférica y los

tamaños observados aproximados son de 20 μm . Además, aparecen bien dispersas en el producto sin formar agregados.

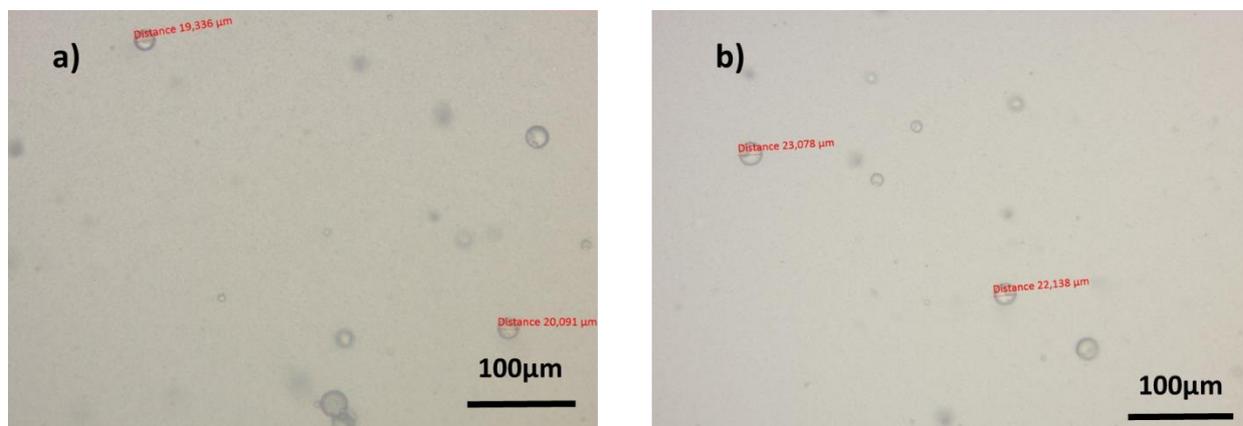


Figura 8.2. Imagen de microscopio óptico de los suavizantes Marca 1. a) AZUL; b) ROSA.

Los suavizantes de las **Marcas 2 y 3**, se muestran más viscosos que los anteriores y presentan una opacidad más elevada en el microscopio óptico debido a una elevada concentración de componentes en el producto (**Figura 8.3**). Las cápsulas de la **Marca 2** tienen un tamaño aproximado de 12 μm mientras que las de la **Marca 3** fueron las que mostraron el tamaño más reducido, situándose la mayoría de las cápsulas por debajo de 10 μm de diámetro.

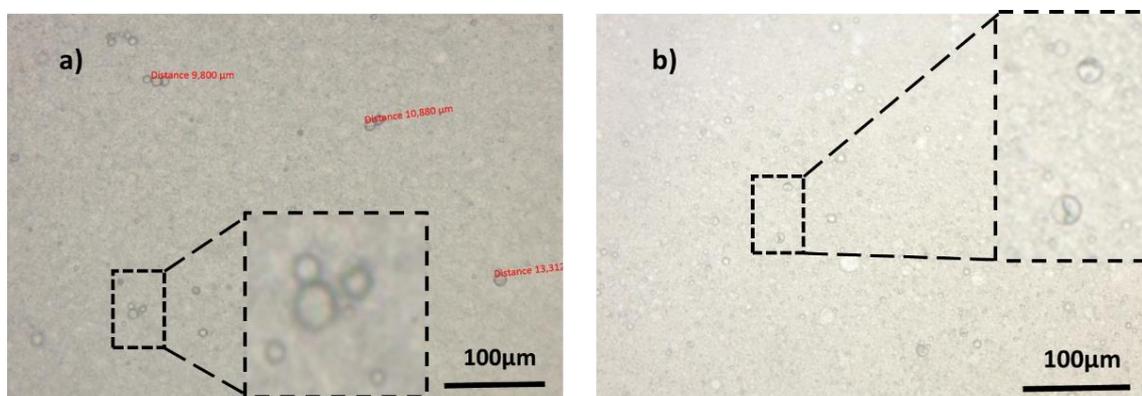


Figura 8.3. Imagen de microscopio óptico de la muestra de suavizante de la Marca 2 y Marca 3.

Para el análisis de las muestras de suavizante por SEM fue necesaria la dilución de las suspensiones en un orden de magnitud. La cantidad de material disperso es tan alta que al secarse se crea una película sobre la superficie del portamuestras, siendo imposible la identificación de las microcápsulas (**Figura 8.4**)

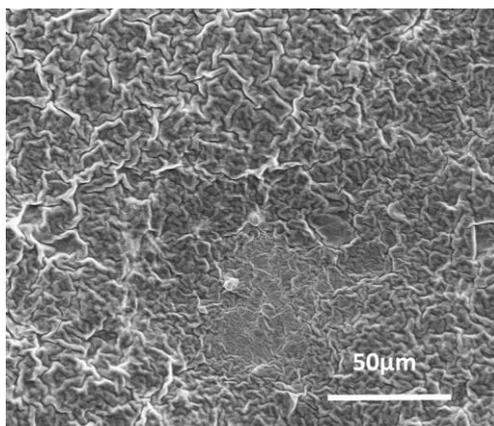


Figura 8.4. Imagen de SEM de una muestra de suavizante con microcápsulas tras el secado.

Aunque tras la dilución la dificultad para distinguir cápsulas seguía siendo alta, se pudieron apreciar algunas entre el resto del material. La diferencia de tamaños detectada por microscopía óptica entre las distintas cápsulas de los suavizantes se confirmó también por SEM. No obstante, los tamaños observados en este último caso resultaron mayores de los valores determinados por microscopio óptico, hasta el doble en algunos casos. Esto se debe principalmente al material disuelto en el producto que tras secarse crea un recubrimiento alrededor de cada cápsula (**Figura 8.5**). Las manchas oscuras observadas suelen ser a causa de fragancia o aceite liberado. En este caso, podrían ser compuestos no volátiles de la fragancia libre, cápsulas que hayan explotado u otros materiales presentes en la formulación.

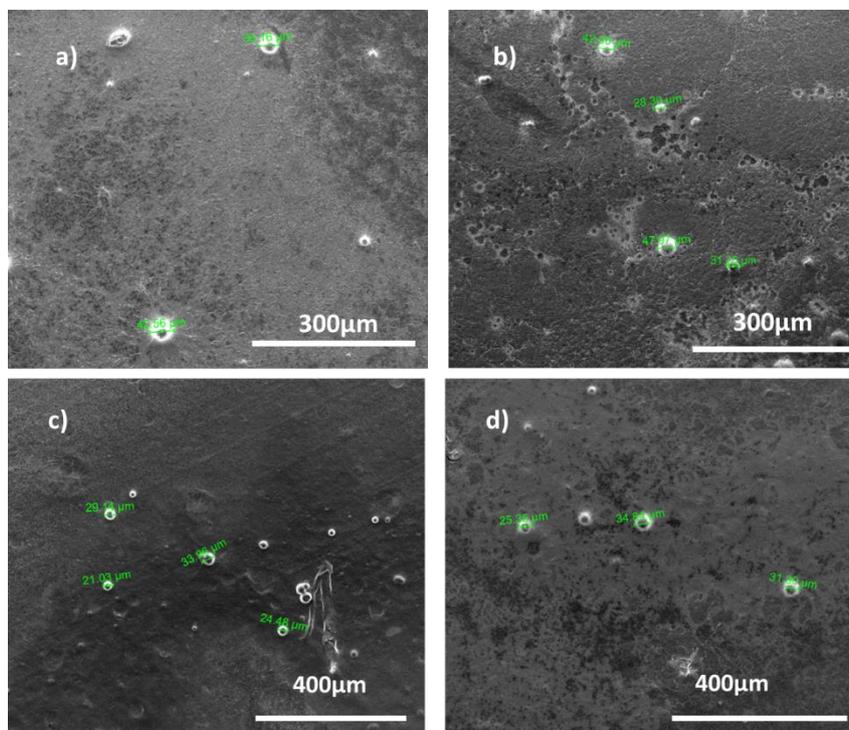


Figura 8.5. Imágenes SEM muestras de suavizante: a) Marca 1 AZUL; b) Marca 1 ROSA; c) Marca 2; d) Marca 3.

Con el uso del equipo Mastersizer®2000 se determinaron las distribuciones de tamaño de las cápsulas para confirmar los tamaños observados previamente. En la **Figura 8.6** se muestran los perfiles obtenidos.

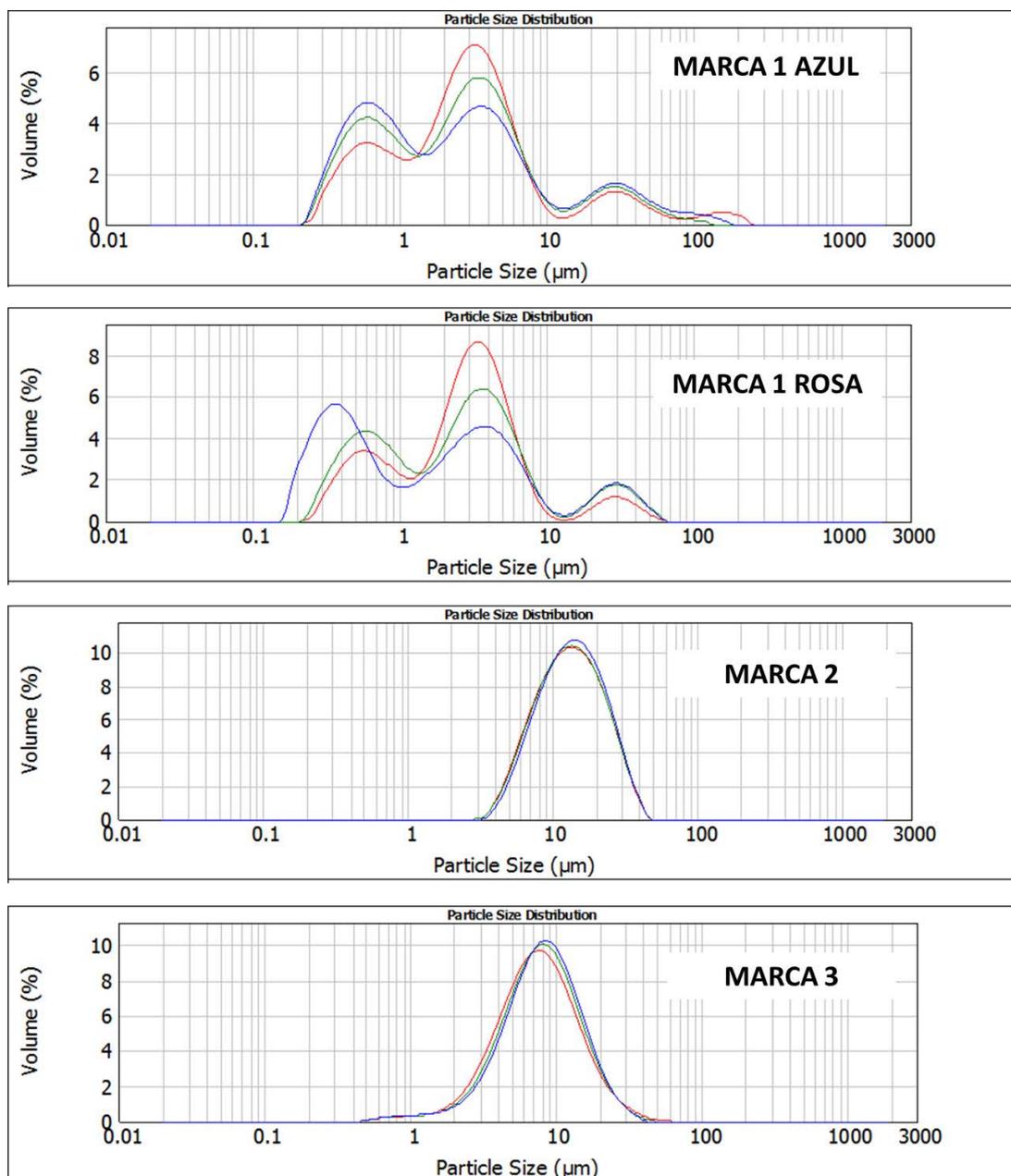


Figura 8.6. Distribuciones de tamaño observadas en muestras de suavizantes con Mastersizer®2000.

En las muestras de la **Marca 1** (Azul y Rosa) se puede observar unos perfiles de distribución muy parecidos donde además se pueden apreciar 3 poblaciones diferenciadas. Por lo observado en el microscopio óptico, el componente de mayor tamaño ($\approx 30 \mu\text{m}$) debería ser el correspondiente a las cápsulas. Los otros componentes podrían corresponder a otro tipo de partículas suspendidas (pigmentos, polímero, esterquat...) y/o fragancia emulsionada. En el caso de la **Marca 2** y **Marca 3** se

observó una sola distribución de tamaño cuyo rango encaja con los tamaños observados por microscopía óptica, siendo de menor tamaño éstas últimas. Finalmente, el suavizante correspondiente a la **Marca 3** fueron las que mostraron un tamaño menor ($\approx 8 \mu\text{m}$), siendo la distribución también bastante monodispersa.

Los tamaños observados con las diferentes técnicas se resumen en la **Tabla 8.2**.

| Suavizante | Tamaño óptico | Tamaño SEM | Tamaño Mastersizer® |
|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Marca 1 Azul | 10-30 μm | 25-45 μm | 30 μm |
| Marca 1 Rosa | 10-25 μm | 25-45 μm | 30 μm |
| Marca 2 | 10-25 μm | 25-35 μm | 15 μm |
| Marca 3 | 5-15 μm | 12-20 μm | 8 μm |

Tabla 8.2. Resumen de los tamaños determinados para las cápsulas en los distintos suavizantes.

8.3. Contaje de cápsulas con cámara Neubauer

La cámara Neubauer es un instrumento principalmente usado para el recuento celular en suspensiones acuosas. Dado que el tamaño micrométrico de las cápsulas, se creyó oportuno usar esta técnica para el recuento de las microcápsulas. En este caso, las microcápsulas son de morfología esférica, con un diámetro medio determinado, y por tanto se puede atribuir un volumen a cada una de ellas. Conociendo el número de cápsulas y el volumen medio de éstas es posible calcular el volumen de fragancia encapsulada en suspensiones de microcápsulas.

La cámara Neubauer adquirida (ZUZI® Improved) es una placa de vidrio en la cual se observan dos cavidades en el centro de la misma, que es donde se depositan las muestras a analizar. Dentro de estas cavidades se encuentran unas rejillas grabadas con distancias definidas (**Figura 8.7**).

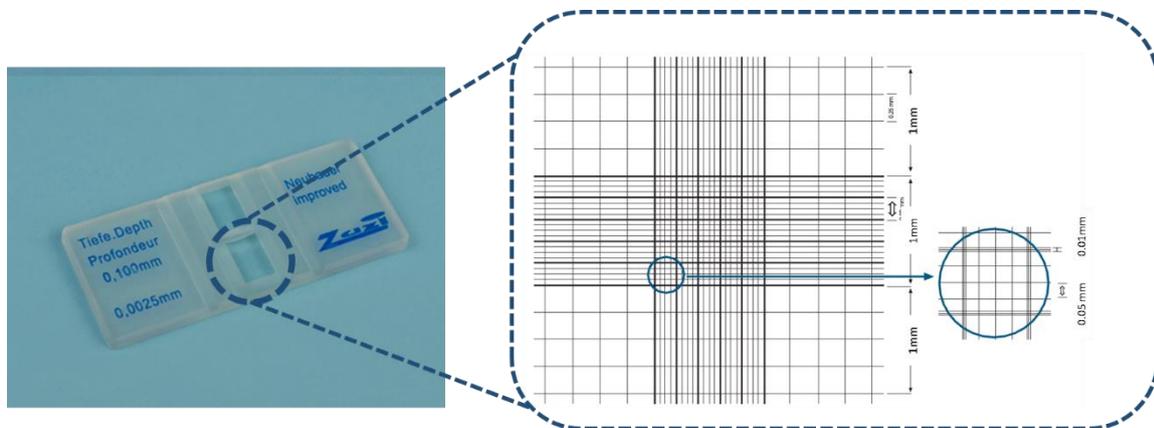


Figura 8.7. Cámara Neubauer Improved ZUZI® y detalle de la rejilla grabada en el vidrio con sus medidas correspondientes.

La cámara está hecha de vidrio, lo cual permite observar a través del microscopio óptico las líneas grabadas y las cápsulas que se puedan depositar entre estas líneas. Las muestras de suavizante se diluyeron para no generar demasiada opacidad en su visualización y para que fluyeran adecuadamente hacia la cámara por capilaridad. Para llevar a cabo la introducción de la muestra, la cámara se cubre con un cubremuestras específico y se introduce la muestra con la ayuda de una micropipeta (**Figura 8.8**)

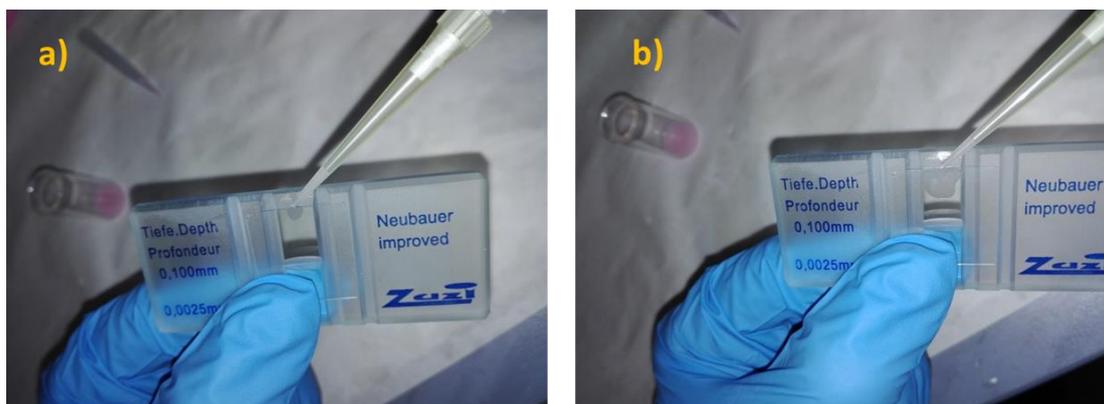


Figura 8.8. a) Inyección de la gota a analizar entre el portamuestras y la cámara Neubauer b) Transporte de la muestra a través de la cámara por capilaridad.

La cámara admite un volumen de suspensión fijado de 0.1 μL . Una vez rellenada la cámara, a través de microscopio óptico se procedió al recuento de partículas. Para ello, se analizaron un total de 9 regiones de la cámara y se hizo una media del valor obtenido de cada una. En la **Figura 8.9** se muestra el ejemplo de la muestra **Marca 1 Rosa**.

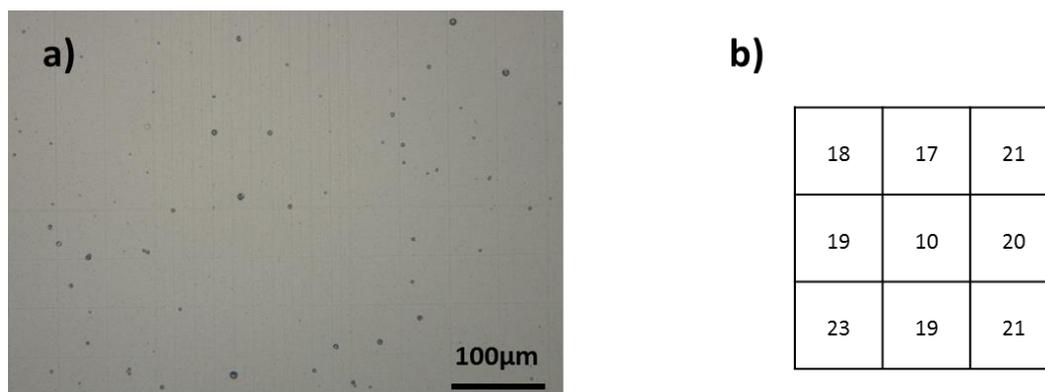


Figura 8.9. Recuento de la muestra Marca 1 Rosa. a) Imagen de microscopio óptico de las cápsulas distribuidas en distintas regiones de la cámara; b) recuento numérico de las cápsulas en cada una de ellas.

Se asume que si el volumen de las cápsulas está ocupado enteramente por la fragancia, a partir del valor del número de cápsulas por volumen unitario de la cámara, se puede estimar el porcentaje de

fragancia encapsulada en el suavizante. Para corroborar que el método fuera fiable se aplicó esta cuantificación a una muestra de suspensión de cápsulas con concentración conocida de cápsulas de 0.1% en peso y con un diámetro también determinado. En la **Tabla 8.3** se muestran los resultados obtenidos para todos los casos evaluados.

| Muestra | % v/v≈%p/p fragancia encapsulada |
|--------------|----------------------------------|
| Referencia | 0.114 |
| Marca 1 Azul | 0.343 |
| Marca 1 Rosa | 0.793 |
| Marca 2 | 0.110 |
| Marca 3 | 0.011 |

Tabla 8.3. Porcentaje calculado de fragancia encapsulada en las muestras evaluadas con cámara Neubauer®.

Las suspensiones correspondientes a la **Marca 1** mostraron valores diferentes en cuanto a cantidad de fragancia encapsulada, siendo una el doble de concentrada que la otra.

En el caso de la **Marca 2** y la **Marca 3** presentan una cantidad más baja en comparación con la **Marca 1**, especialmente la **Marca 3** que se encuentra en un grado de magnitud menor.

De todos modos, la opacidad de las muestras **Marca 2** y **Marca 3** puede afectar la precisión del conteo de las cápsulas incluso en las condiciones de dilución usadas. La presencia de otras partículas en suspensión dificultaron mucho la diferenciación de cápsulas y, sobretodo en el caso de la **Marca 3**, tal vez eso hubiera afectado al conteo (**Figura 8.10**).

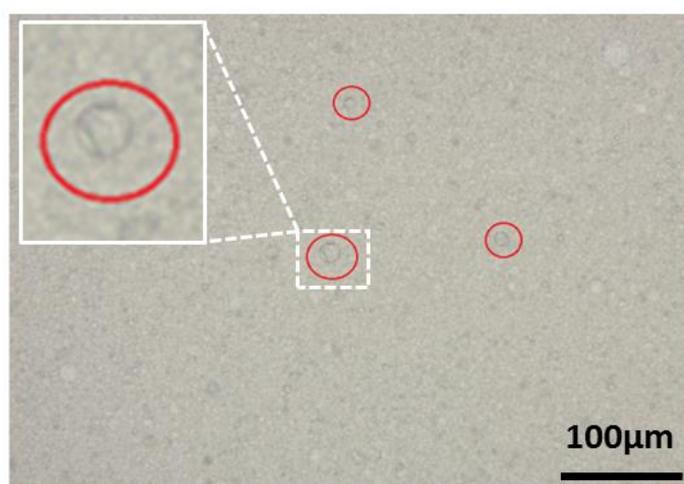


Figura 8.10. Localización de cápsulas en la cámara Neubauer® del suavizante de Marca 3.

8.4. Caracterización por SEM tras la aplicación en tejidos

En la parte final de este proyecto se realizaron aplicaciones de los correspondientes productos comerciales sobre tejidos mediante el método de impregnación por agitación SEM. Las imágenes de SEM correspondientes a los tejidos tratados con una concentración de 0.025% en cápsulas (calculado según los valores obtenidos con cámara Neubauer) se muestran en la **Figura 8.11**.

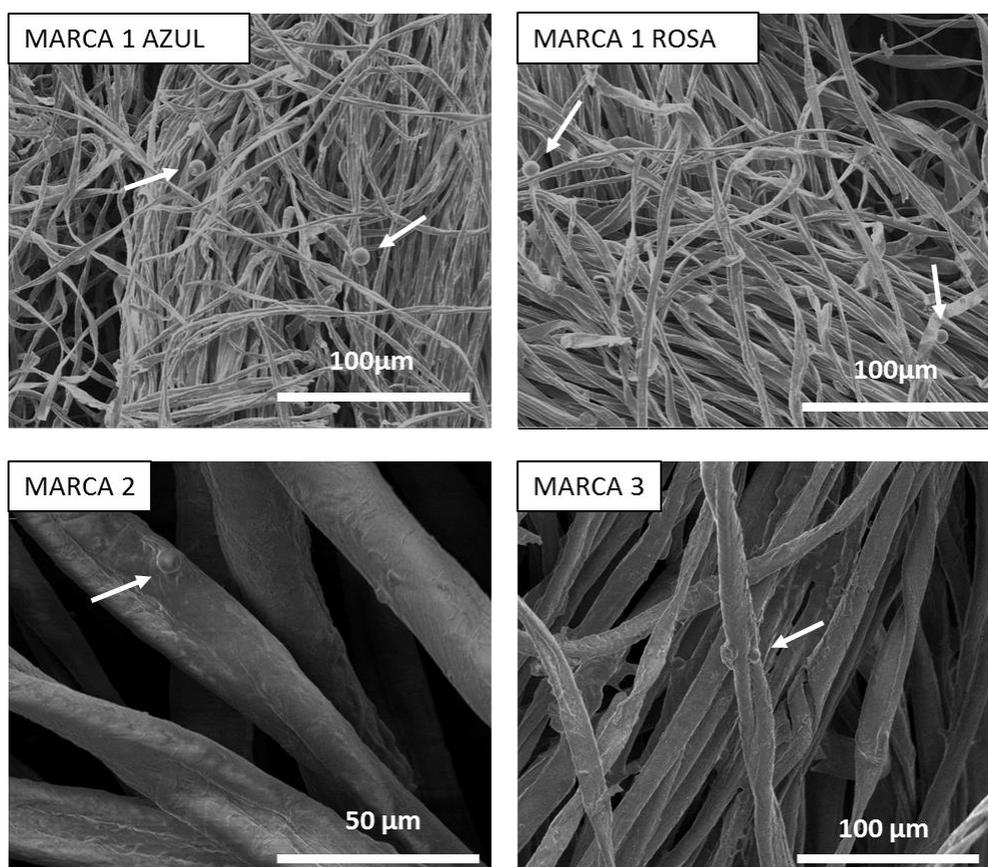


Figura 8.11. Imágenes de SEM de los tejidos impregnados con los diferentes suavizantes comerciales con cápsulas.

Las conclusiones generales que se extrajeron de las muestras analizadas fueron:

- Las cápsulas de la **Marca 1** fueron las más fáciles de detectar, principalmente por su mayor tamaño y por su presencia en las fibras más externas del tejido
- Las cápsulas de la **Marca 2** se detectaron principalmente en las fibras más interiores del tejido, aunque fue difícil localizarlas
- Las cápsulas de la **Marca 3** fueron las más difíciles de detectar, habiéndose localizado sólo 2-3 cápsulas en toda la visualización. Este resultado iría en concordancia con la baja concentración de cápsulas determinada anteriormente
- Olfactivamente la intensidad detectada tras el rascado ordenada de mayor a menor fue: **Marca 2>Marca 1 Azul>Marca 2 Rosa>Marca 3**

8.5. Conclusiones

En esta parte de la investigación, basada en la ingeniería inversa, se han logrado desarrollar metodologías útiles para la compañía y pueden ser un punto de partida para establecer protocolos en un futuro. Estos estudios se resumen a continuación:

- Comparativa de microcápsulas provenientes de diferentes fabricantes. Se caracterizaron suspensiones de microcápsulas comerciales mediante microscopía y difracción laser para la determinación de tamaño. Se detectaron diferencias entre muestras en cuanto a tamaños, agregación observada, polidispersión y morfología.
- Se investigó sobre las mejores estrategias para el estudio y la comparativa de microcápsulas incorporadas en suavizantes comerciales. La presencia de otros componentes en estas matrices dificultó su visualización por microscopía aunque a través de difracción láser se pudo extraer información en relación a los tamaños.
- Se realizaron estudios preliminares de la técnica de contaje de cápsulas mediante el uso de cámara Neubauer. Los resultados obtenidos proporcionaron unos valores aproximados de la cantidad de fragancia encapsulada en cada una de las muestras de suavizante siendo la Marca 1 Rosa la que contenía la mayor cantidad y la Marca 3 la que menos.
- Se aplicaron los suavizantes en tejidos y se caracterizaron mediante microscopía y olfativamente determinándose diferencias entre muestras.

Pese a la cantidad de información extraída, se cree oportuno realizar análisis más exhaustivos en productos comerciales. Algunos de ellos podrían ser:

- Optimización de la metodología de caracterización y elaboración de una base de datos para la recopilación de toda la información extraída.
- Uso de técnicas para la determinación de materiales de corteza (IR, análisis elemental...) y de propiedades físico-químicas (viscosidad, flotación, sedimentación, pH...)
- Desarrollar una técnica efectiva para el aislamiento de microcápsulas de una matriz compleja
- Análisis de otras muestras con microencapsulados (parches cutáneos, productos cosméticos, esprays, etc)

Capítulo 9.

Conclusiones Generales

9. Conclusiones generales

Se han desarrollado las metodologías para encapsular aceites y fragancias simples y complejas de CARINSA utilizando tres técnicas diferentes: polimerización *in-situ*, polimerización interfacial y coacervación compleja. Las características principales de las microcápsulas obtenidas con cada una de ellas se muestran de manera resumida en la siguiente tabla:

| Característica | Polimerización in situ | Polimerización interfacial | Coacervación compleja |
|--------------------------------|--|---|---|
| Núcleos encapsulados | <ul style="list-style-type: none"> Miglyol APPLE TROPICAL | <ul style="list-style-type: none"> Miglyol Fragancias simples TROPICAL | <ul style="list-style-type: none"> Miglyol Limoneno TROPICAL |
| Material de corteza | Resina MF | Poliamida | Coacervado GEL/GA |
| Carga útil máxima de fragancia | 70-80% | 60-70% | 70-75% |
| Tamaños obtenidos | 15-25 µm | 3-50 µm | 10-200 µm |
| Tipo de estructura | Mononuclear | Mononuclear | Mononuclear y polinuclear |
| Rango estabilidad (pH) | 4-10 | 8-10 | 4-8 |
| Escalado | Si | Si | Si |

Como se puede observar, las cargas útiles máximas alcanzadas fueron similares entre ellas y en todos los casos superiores al 60-70%, lo que permite una gran cantidad de fragancia retenida. Los tamaños mínimos alcanzados en todos los casos fueron también inferiores a las 25 µm, hecho que favorece la adhesión por atrapamiento entre las fibras de tejidos. Por lo que se refiere a la estabilidad al pH, mostraron diferencias entre las distintas cápsulas obtenidas, siendo las cápsulas de poliamida sensibles a pH ácidos, las de coacervación a pH extremos (<2 y >10) y de MF las que mayor resistencia mostraron.

Como se deduce de estos valores, se ha conseguido desarrollar nuevas microcápsulas para las fragancias de CARINSA de propiedades similares a las melanina-formaldehído utilizando polímeros alternativos con menos residuos tóxicos como la poliamida o incluso con biopolímeros como los utilizados para la coacervación. Además durante esta Tesis se han desarrollado estudios comparativos con otros productos del mercado (benchmarking) comprobando que son plenamente competitivas.

Por ello, y considerando que todos estos polímeros son de alta disponibilidad comercial y el proceso escalable, es factible considerar su viabilidad industrial a nivel técnico, económico y desde un punto de vista medioambiental. Para llevar esto a buen puerto se han establecido protocolos de trabajo tanto de los procesos sintéticos a escala laboratorio, como de los procesos de caracterización y escalado que serán de gran utilidad para futuras actividades de la compañía.

Finalmente, como contrapartida, se realizaron estudios preliminares de lavados de tejidos comprobando que las microcápsulas desarrolladas mediante técnicas libres de formaldehído consiguen el efecto deseado de liberación controlada aunque menor al deseado según los perfumistas de la empresa (e incluso se apreciaron cambios en las notas de salida e incluso se apreciaron cambios en las notas de salida). . Así, aunque las microcápsulas desarrolladas ya serían industrializables, todavía queda margen de mejora actuando sobre todo en la respuesta olfativa al incorporar las microcápsulas en distintas matrices detergentes o en otros tipos de productos, así como en la etapa de deposición sobre las fibras. Una de las vías de acción también sería la exploración de nuevos mercados, más allá de las fragancias, iniciada en esta Tesis Doctoral.

Anexo I.

Parte Experimental (Protocolos)

1. Polimerización *in-situ*

MF.1. Preparación prepolímero melamina-formaldehído (MF)

Para la preparación de 20 g de solución de prepolímero (24%p/p)

Materiales y equipos:

- Melamina (Sigma-Aldrich®)
- Solución acuosa formaldehído (37%p/p, Sigma-Aldrich®)
- Agua destilada
- Trietanolamina (Sigma-Aldrich®)
- Placa agitadora con control de temperatura
- Imán agitador ovalado
- Matraz redondo(250 mL)
- Vaso de precipitados (100 mL, $\varnothing = 50$ mm)
- Condensador con entrada de agua para proceso de reflujo

Procedimiento:

1. Se pesan las siguientes cantidades de reactivos en un matraz redondo provisto de un imán agitador.
 - a. Melamina : 3 g
 - b. Solución formaldehído (37%p/p): 5 g
 - c. Solución TEA (10% p/p): 0.5 g
 - d. Agua destilada: 10 g
2. A continuación se disuelven los componentes bajo agitación magnética a una temperatura de 70°C y con sistema de reflujo para evitar la evaporación de agua. Es necesario preparar la disolución bajo un sistema de extracción adecuado dada la evaporación de formaldehído.
3. Transcurrida 1 h la mezcla se vuelve completamente transparente, señal de la formación del prepolímero MF, que es soluble en agua.
4. La solución de prepolímero se retira del matraz, se vierte en un vaso de precipitados y se le añade agua destilada hasta enrasar hasta 20 g de solución, obteniendo una concentración final del 24% aproximadamente.

MF.2. Preparación de solución stock poly-SMA (poly-styrene-maleic-anhydride) hidrolizado

Para la preparación de 2 Kg de solución acuosa poly-SMA (5%p/p)

Materiales y equipos:

- Poly-SMA Xiran SZ40005 (Polyscope[®])
- NaOH (Sigma-Adrich[®])
- Agua destilada
- Reactor 5L encamisado con tapa
- Soporte para reactor de 5L
- Motor de agitación IKA[®] RW 28 Basic
- Varilla agitadora forma de ancla
- Sistema de recirculación con control de temperatura (Julabo[®]F10)
- Condensador con entrada de agua para proceso de reflujo
- Varilla de agitación en forma de hélice ($\varnothing=14$ cm)

Procedimiento:

1. Se pesan las siguientes cantidades de reactivos:
 - a. Poly-SMA: 100 g
 - b. NaOH: 50 g
 - c. Agua destilada: 1850 g
2. Se añade toda el agua destilada en el reactor junto con el NaOH el cual se disuelve con la ayuda del sistema de agitación.
3. Cuando la disolución ya sea homogénea, se procede a calentar el reactor hasta los 50 °C
4. Alcanzada la temperatura se añade gradualmente el poly-SMA al reactor bajo agitación.
5. Cuando todo el poly-SMA se haya añadido se cierra el reactor con el condensador acoplado y se incrementa la temperatura hasta 70 °C
6. La reacción se lleva a cabo durante un mínimo de 6 horas y finaliza cuando se obtiene una solución transparente, amarillenta y con un pH alrededor de 8-9.
7. Finalmente, la solución, con una concentración de 5% en peso de poly-SMA, se deja enfriar, se recoge y se almacena.

MF.3. Síntesis de cápsulas de Miglyol®812 por polimerización *in-situ*

Para la preparación de 120 g de suspensión al 28%p/p de cápsulas

Materiales y equipos:

- Solución poly-SMA Xiran SZ40005 hidrolizado (5%p/p, Polyscope ®)
- Prepolímero MF
- Agua destilada
- Disolución Ácido acético glacial (10%p/p, Sigma-Aldrich®)
- Miglyol®812 (Oxy-Med Express, S.A.)
- Matraz redondo de dos bocas (250 mL)
- Vaso alargado (250 mL, Ø=70 mm)
- Embudo de adición(100 mL)
- Imán agitador
- Homogenizador IKA®Ultra-Turrax®T25
- Placa agitadora con control de temperatura
- Condensador con entrada de agua para proceso de reflujo

Procedimiento:

1. Se prepara una disolución acuosa de 70 g al 2%p/p de poly-SMA (a partir de la solución obtenida en el **Protocolo MF.2**) en un vaso de precipitados de 250 mL y se ajusta hasta pH=7 con una disolución de ácido acético al 10 p/p.
2. A continuación se añaden 30 g de Miglyol®812 sobre la solución de poly-SMA y se emulsiona la mezcla con el homogenizador Ultra-Turrax® (6000 rpm, 15 min).
3. Al finalizar la emulsión se transfiere la mezcla al matraz redondo bajo una suave agitación magnética (450 rpm) a temperatura ambiente.
4. Se añaden 20 g de la solución de prepolímero MF al 24% a través de un embudo de adición acoplado a una de las bocas del matraz (2 mL/min).
5. Tras la adición del prepolímero, se ajusta lentamente el pH de la solución hasta un pH=5 con la solución de ácido acético 10%p/p.
6. Cuando la emulsión alcance pH=5, la temperatura se fija en 30 °C, se incrementa la velocidad de agitación magnética a 900 rpm y se acopla el sistema de reflujo.
7. La reacción de polimerización dura 2-3 h. Transcurridos 30 minutos se empieza a generar una fina capa de polímero alrededor de las gotas que puede verificarse mediante microscopía óptica. Tras 1h-1.5 h desde el inicio de la reacción las cápsulas ya están formadas pero se procede a un curado mayor del polímero incrementando la temperatura hasta los 60 °C. Tras 1 h a 60 °C la reacción de polimerización ha finalizado, no obstante, para asegurar el proceso se puede realizar un mayor curado del polímero incrementando la temperatura hasta los 85 °C durante 1 h adicional.
8. Cuando la síntesis ha finalizado se deja enfriar la mezcla a temperatura ambiente bajo una suave agitación (450 rpm).
9. El aspecto final de la suspensión debe ser blanquecino, no muy viscoso y sin presencia de agregados macroscópicos.
10. Las microcápsulas obtenidas tienen un tamaño aproximado de 20 µm y se debe observar baja polidispersión en los tamaño (rango 15-25 µm)

MF.4. Síntesis de cápsulas de Tropical Fruit P780765 por polimerización *in-situ*

Para la preparación de 120 g de suspensión al 28%p/p de cápsulas

Materiales y equipos:

- Solución poly-SMA Xiran SZ40005 hidrolizado (5%p/p, Polyscope[®])
- Prepolímero MF
- Agua destilada
- Disolución Ácido acético glacial (10% p/p, Sigma-Aldrich[®])
- Tropical Fruit P780765 (CARINSA[®])
- Vaso alargado (250 mL, Ø=70 mm)
- Embudo de adición(100 mL)
- Imán agitador
- Homogenizador IKA[®]Ultra-Turrax[®]T25
- Placa agitadora con control de temperatura
- Condensador con entrada de agua para proceso de reflujo

Procedimiento:

1. Se prepara una disolución acuosa de 70 g al 2%p/p de poly-SMA (a partir de la solución obtenida en el **Protocolo MF.2**) en un vaso de precipitados de 250 mL y se ajusta hasta pH=7 con una disolución de ácido acético al 10%p/p.
2. A continuación se añaden 30 g de Tropical Fruit P780765 sobre la solución de poly-SMA y se emulsiona la mezcla con el homogenizador Ultra-Turrax[®] (6000 rpm, 15 min).
3. Al finalizar la emulsión se transfiere la mezcla al matraz redondo bajo una suave agitación magnética (450 rpm) a temperatura ambiente.
4. Se añaden 20 g de la solución de prepolímero MF al 24% a través de un embudo de adición acoplado a una de las bocas del matraz (2 mL/min).
5. Tras la adición del prepolímero, se ajusta lentamente el pH de la solución hasta un pH=5 con la solución de ácido acético 10%p/p.
6. Cuando la emulsión alcance pH=5, la temperatura se fija en 30 °C, se incrementa la velocidad de agitación magnética a 900 rpm y se acopla el sistema de reflujo.
7. La reacción de polimerización dura 2-3 h. Transcurridos 30 minutos se empieza a generar una fina capa de polímero alrededor de las gotas que puede verificarse mediante microscopía óptica. Tras 1h-1.5 h desde el inicio de la reacción las cápsulas ya están formadas pero se procede a un curado mayor del polímero incrementando la temperatura hasta los 60 °C. Tras 1 h a 60 °C la reacción de polimerización ha finalizado, no obstante, para asegurar el proceso se puede realizar un mayor curado del polímero incrementando la temperatura hasta los 85 °C durante 1 h adicional.
8. Cuando la síntesis ha finalizado se deja enfriar la mezcla a temperatura ambiente bajo una suave agitación (450 rpm).
9. El aspecto final de la suspensión debe ser blanquecino, no muy viscoso y sin presencia de agregados macroscópicos.
10. Las microcápsulas obtenidas tienen un tamaño aproximado de 20 µm y se debe observar baja polidispersión en los tamaño (rango 15-25 µm)

MF.5. Escalado de la síntesis de cápsulas de fragancia compleja (Tropical Fruit P780765)

Para la preparación de 1.2 Kg de suspensión al 28% p/p de cápsulas

Materiales y equipos:

- Solución poly-SMA Xiran SZ40005 hidrolizado (5% p/p, Polyscope ®)
- Prepolímero MF
- Agua destilada
- Disolución Ácido acético glacial (10% p/p, Sigma-Aldrich®)
- Fragancia Tropical Fruit P780765 (CARINSA®)
- Reactor de 2L encamisado con tapa y sumidero inferior
- Soporte para reactor de 2L
- Sistema de recirculación con control de temperatura (Julabo®F10)
- Homogenizador IKA®Ultra-Turrax T®50
- Motor de agitación IKA® RW 28 Basic
- Embudo de adición (250 mL)
- Varilla agitadora en forma de ancla
- Condensador con entrada de agua para proceso de reflujo

Procedimiento:

1. En el reactor se 2L se prepara una disolución de 700 g de poly-SMA 2%p/p (a partir de la solución obtenida en el **Protocolo MF.2**) y se ajusta hasta pH=7 con una disolución de ácido acético (10%p/p).
2. Se añaden 300 g de la fragancia sobre la solución de poly-SMA y se emulsiona con el homogenizador Ultra-Turrax T®50 (3000 rpm, 30 min) a la vez que se agita el sistema con el motor de agitación con la varilla en forma de ancla (250 rpm).
3. Tras la preparación de la emulsión, se retira el homogenizador y se coloca la tapa del reactor con un condensador para mantener el proceso en reflujo.
4. Se añaden 200 g de la solución de prepolímero MF (24%p/p) a través de un embudo de adición acoplado a otra de las entradas de la tapa (2 mL/min).
5. Tras la adición del prepolímero, se ajusta el pH de la solución hasta un pH de 5 con la solución de ácido acético 10%p/p.
6. Tras el ajuste de pH, la temperatura del reactor se incrementa hasta 30 °C para iniciar el proceso de polimerización y se agita el sistema a 300 rpm.
7. Transcurridos 30 minutos, a través de microscopio óptico la formación de una fina capa de polímero.
8. La reacción de polimerización dura 2-3 h horas. Transcurridos 30 minutos se empieza a generar una fina capa de polímero alrededor de las gotas que puede verificarse mediante microscopía óptica. Tras 1h-1.5 h desde el inicio de la reacción las cápsulas ya están formadas pero se procede a un curado mayor del polímero incrementando la temperatura hasta los 60 °C. Tras 1 h a 60 °C la reacción de polimerización ha finalizado, no obstante, se puede realizar un proceso de mayor curado del polímero incrementando la temperatura hasta los 85 °C durante 1 h adicional.
9. Cuando la síntesis ha finalizado se deja enfriar la mezcla a temperatura ambiente bajo una suave agitación (100 rpm).
10. El aspecto final de la suspensión debe ser blanquecino, no muy viscoso y sin presencia de agregados macroscópicos.

11. Las microcápsulas obtenidas tienen un tamaño aproximado de 15 μm y se debe observar baja polidispersión en los tamaños (rango 10-20 μm)

2. Polimerización interfacial

PA.1. Encapsulación de Miglyol®812

Para experimentos a escala laboratorio (50-60 g)

Materiales y equipos:

- Cloruro de tereftaloilo (TR, Sigma-Aldrich®)
- Dietilentriamina (DETA, Sigma-Aldrich®)
- Tween®80 (Sigma-Aldrich®)
- Miglyol®812 (Oxy-Med Express, S.A.)
- Agua destilada
- Vaso alargado (100 mL, $\varnothing = 50$ mm)
- Jeringa (25 mL) y aguja (15 cm)
- Homogenizador IKA®Ultra-Turrax®T25
- Placa agitadora con control de temperatura

Procedimiento:

1. Se preparan por separado las diferentes disoluciones:
 - a. Fase acuosa I: solución acuosa 1%p/p Tween®80, 30 g
 - b. Fase acuosa II: solución acuosa NaOH 0.19 M + 555 μL (5.14 mmoles) DETA, 10 g
 - c. Fase aceite : Solución de 500 mg TR (2.46 mmoles) en Miglyol®812, 10 gLas disoluciones, se agitan para su completa disolución. La temperatura de la disolución de DETA aumenta ligeramente.
2. En un vaso alargado de 100 mL se introduce la fase acuosa I y la fase aceite y se genera la emulsión con el homogenizador Ultra-Turrax® (5000 rpm, 5 min)
3. Cuando la emulsión sea estable, se añade gradualmente (30 s, 0.3 mL/s) la fase acuosa II con el uso de una jeringa. La aguja de la jeringa se mantiene sumergida cercana al homogenizador durante toda la adición.
4. Tras la adición de la fase acuosa II, se detiene el Ultra-Turrax® dado que la reacción de polimerización ha finalizado. La suspensión se deja bajo una leve agitación magnética (500 rpm) durante 15 minutos para asegurar la completa difusión de la amina.
5. El aspecto final debe ser de una suspensión blanquecina sin presencia de agregados macroscópicos y con tamaños comprendidos entre 10 y 50 μm siendo la media alrededor de 25 μm .

PA.2. Encapsulación de fragancia compleja reactiva (FRESCOR AZUL)

Para experimentos a escala laboratorio (50-60 g)

Materiales y equipos:

- Cloruro de tereftaloilo (TR, Sigma-Aldrich®)
- Dietilentriamina (DETA, Sigma-Aldrich®)
- Tween®80 (Sigma-Aldrich®)
- Fragancia Frescor Azul (CARINSA®)
- Agua destilada
- Vaso alargado (100 mL, Ø =50 mm)
- Jeringa (25 mL) y aguja (15 cm)
- Homogenizador IKA®Ultra-Turrax®T25
- Placa agitadora con control de temperatura

Procedimiento:

1. Se preparan por separado las diferentes disoluciones:
 - a. Fase acuosa I: solución acuosa 1%p/p Tween®80, 30 g
 - b. Fase acuosa II: solución acuosa NaOH 0.19 M + 555 µL (5.14 mmoles) DETA, 10 g
 - c. Fase aceite : Solución de 500 mg TR (2.46 mmoles) en Miglyol®812 + Frescor Azul (30:70), 10 g *

**En el caso de la fase aceite, se mezcla inicialmente el cloruro con el Miglyol y tras su disolución se añade la fragancia y se mezcla durante pocos segundos para evitar en mayor medida la reactividad del cloruro con componentes de la fragancia.*

Las disoluciones, se agitan para su completa disolución. Se observa un incremento de la temperatura en la disolución de la DETA

2. En un vaso alargado de 100 mL se introduce la fase acuosa I y la fase aceite y se genera la emulsión con el homogenizador Ultra-Turrax® (5000 rpm, 5 min)
3. Cuando la emulsión sea estable, se añade gradualmente (30 s, 0.3 mL/s) la fase acuosa II con el uso de una jeringa. La aguja de la jeringa se mantiene sumergida cercana al homogenizador durante toda la adición.
4. Tras la adición de la fase acuosa II, se detiene el Ultra-Turrax® dado que la reacción de polimerización ha finalizado. La suspensión se deja bajo una leve agitación magnética (500 rpm) durante 15 minutos para asegurar la completa difusión de la amina.
5. El aspecto final debe ser de una suspensión blanquecina sin presencia de agregados macroscópicos y con tamaños comprendidos entre 20 y 50 µm siendo la media alrededor de 3 µm.

PA.3. Síntesis de cápsulas de poliamida (Miglyol/ APPLE TOP)_de menor tamaño (<20 µm)

Para experimentos a escala laboratorio (50-60 g)

Materiales y equipos:

- Cloruro de tereftaloilo (TR, Sigma-Aldrich®)
- Dietilentriamina (DETA, Sigma-Aldrich®)
- PVA 20-98 (Sigma-Aldrich®)
- Miglyol®812 o fragancia APPLE TOP (CARINSA®)
- Agua destilada
- Vaso alargado (100 mL, Ø =50 mm)
- Jeringa (25 mL) y aguja (15 cm)
- Homogenizador IKA®Ultra-Turrax®T25
- Placa agitadora con control de temperatura

Procedimiento:

1. Se preparan por separado las diferentes disoluciones:
 - a. Fase acuosa I: solución acuosa 2.5% PVA 20-98, 30 g
 - b. Fase acuosa II: solución acuosa NaOH 0.19 M + 2.5 mL (23.7 mmoles) DETA, 10 g
 - c. Fase aceite : Solución de 500 mg TR(2.46 mmoles) en Miglyol®812 o APPLE TOP, 10 g
2. En un vaso alargado de 100 mL se introduce la fase acuosa I y la fase aceite y se genera la emulsión con el homogenizador Ultra-Turrax® (12000 rpm, 5 min)
3. Cuando la emulsión sea estable, se retira el homogenizador y se procede a la agitación magnética (750 rpm).
4. A continuación se añade la fase acuosa II gradualmente sobre la emulsión II con el uso de una jeringa.
5. Tras la adición de la Fase acuosa II, se deja agitando unos 15 minutos la suspensión de cápsulas para asegurar la completa difusión de la amina
6. El aspecto final debe ser de una suspensión blanquecina sin presencia de agregados macroscópicos y con tamaños comprendidos entre 3 y 10 µm siendo la media alrededor de 10 µm.

PA.4. Síntesis de cápsulas de poliamida de fragancia compleja (Tropical Fruit P780765) de menor tamaño (<20 µm)

Para experimentos a escala laboratorio (50-60 g)

Materiales y equipos:

- Cloruro de tereftaloilo (TR, Sigma-Aldrich®)
- Dietilentriamina (DETA, Sigma-Aldrich®)
- PVA 20-98 (Sigma-Aldrich®)
- Fragancia Tropical Fruit P780765 (CARINSA®)
- Agua destilada

- Vaso alargado (100 mL, Ø =50 mm)
- Jeringa (25 mL) y aguja (15 cm)
- Homogenizador IKA®Ultra-Turrax®T25
- Placa agitadora con control de temperatura

Procedimiento:

1. Se preparan por separado las diferentes disoluciones:
 - a. Fase acuosa I: solución acuosa 3%p/PVA 20-98, 30 g
 - b. Fase acuosa II: solución acuosa NaOH 0.19 M + 2 mL (18.3 mmoles) DETA, 10 g
 - c. Fase aceite : Solución de 650 mg TR (3.2 mmoles) en fragancia Tropical Fruit, 10 g
2. En un vaso alargado de 100 mL se introduce la fase acuosa I y la fase aceite y se genera la emulsión con el homogenizador Ultra-Turrax® (12000 rpm, 5 min)
3. Cuando la emulsión sea estable, se retira el homogenizador y se procede a la agitación magnética (750 rpm).
4. A continuación se añade la fase acuosa II gradualmente sobre la emulsión II con el uso de una jeringa.
5. Tras la adición de la Fase acuosa II, se deja agitando unos 15 minutos la suspensión de cápsulas para asegurar la completa difusión de la amina
6. El aspecto final debe ser de una suspensión blanquecina sin presencia de agregados macroscópicos y con tamaños comprendidos entre 3 y 10 µm siendo la media alrededor de 10 µm.

PA.5. Escalado de síntesis de cápsulas de poliamida de fragancia compleja (Tropical Fruit P780765) de menor tamaño (< 20 µm)

Para la síntesis de 1.25 Kg de suspensión de microcápsulas

Materiales y equipos:

- Cloruro de tereftaloilo (TR, Sigma-Aldrich®)
- Dietilentriamina (DETA, Sigma-Aldrich®)
- PVA 20-98 (Sigma-Aldrich®)
- Fragancia Tropical Fruit P780765 (CARINSA®)
- Agua destilada
- Sistema de recirculación con control de temperatura (Julabo®F10)
- Homogenizador IKA®UltraTurrax®T50
- Motor de agitación IKA®RW 28 Basic
- Fragancia Tropical Fruit P780765 (CARINSA)
- Reactor de 2L encamisado con tapa y sumidero inferior
- Soporte para reactor de 2L
- Embudo de adición (250 ml)
- Vaso de precipitados (500 mL, Ø=90 mm)
- Varilla agitadora en forma de hélice (Ø= 8 mm)

Procedimiento:

1. Se preparan por separado las diferentes disoluciones:
 - a. Fase acuosa I : 1000 g de solución acuosa PVA 40-98 (3%p/p) en el reactor de 2L
 - b. Fase acuosa II : Solución acuosa de DETA (40 μ L, 0.37 moles): 250 g
 - c. Fase aceite : Solución de fragancia con TR (16.625 g,0.08 moles): 250 g
2. En el reactor de 2L (con una temperatura fijada de 20 °C) se adapta el sistema de agitación por varillas y el homogenizador de tal forma que ambos puedan funcionar en paralelo evitando el contacto.
3. La solución acuosa de PVA 20-98 se prepara en el reactor bajo una suave agitación diluyendo una solución más concentrada (20%p/p) preparada previamente.
4. La fase aceite se prepara en un vaso de precipitados bajo agitación magnética (500 rpm, 30 minutos)
5. Por último la solución de amina se prepara también bajo suave agitación añadiendo la amina sobre el agua. La solución incrementa su temperatura unos 10-15°C. Tras enfriarse, se introduce en un embudo de adición fijado al soporte del reactor para la adición posterior.
6. Se añade la fase aceite sobre la fase acuosa I y se prepara la emulsión con el homogenizador (15.000 rpm, 15 min) y el sistema de motor con varillas (600 rpm, 15 min)
7. Transcurrido el tiempo de emulsión, se detiene el Ultra-Turrax y a continuación se añade la disolución de amina (15 mL/min) mientras que el sistema de agitación se incrementa ligeramente (750 rpm).
8. Tras a adición de la amina, la suspensión se deja bajo agitación mecánica (600 rpm, 15 min) para asegurar la completa difusión de la amina.
9. El aspecto final debe ser de una suspensión blanquecina sin presencia de agregados macroscópicos y con tamaños comprendidos entre 3 y 10 μ m siendo la media alrededor de 10 μ m.

3. Coacervación compleja

CO.1. Síntesis de cápsulas de mononucleares de Miglyol®812 y fragancias (>50 µm)

Para experimentos a escala laboratorio (50-60 g)

Materiales y equipos:

- Goma arábica (GA, Sigma-Aldrich®)
- Gelatina de cerdo, Tipo A, Bloom 300 (GEL, Sigma-Aldrich®)
- Fase aceite (Miglyol®812 o fragancias)
- Disolución Acético glacial 10%p/p (Sigma-Aldrich®)
- Agua MilliQ® o destilada
- Vaso alargado (100 mL, Ø =50 mm)
- Homogenizador IKA®Ultra-Turrax®T25
- Placa agitadora con control de temperatura
- Imán agitador (30 mm x 5 mm)
- pHmetro o papel indicador de pH
- Hielo

Procedimiento:

1. Se preparan por separado las disoluciones de ambos polímeros, en este caso la gelatina A (GEL) y la goma arábica (GA). Para ello, 0.5 g de cada biopolímero se diluyen en 25 g de agua destilada o MilliQ® con el fin de obtener soluciones al 2%. Ambos se diluyen mediante agitación magnética y con aplicación de calor a una temperatura de 50 °C. La solución de gelatina se prepara en un vaso de precipitados alargado de 100 mL fijado a una placa agitadora con un baño de agua para su control de temperatura mientras que la de goma arábica se puede preparar fuera del baño.
2. Cuando la solución de gelatina (GEL_{sol}) sea homogénea y la temperatura haya alcanzado 50 °C, se retira el agitador mecánico y se añade la fase aceite (aceite o fragancia). La cantidad de fase aceite a encapsular puede ir entre 2 y 6 g (preferiblemente 4 g).
3. Se acopla el homogenizador Ultra-Turrax®T25 y se sumerge el vástago en la solución de gelatina para llevar a cabo la emulsión (3.000 rpm, 5 min).
4. Cuando se obtiene una emulsión estable, se retira el homogeneizador, y se añade de nuevo el agitador magnético para mantener el sistema agitado de manera constante (750 rpm).
5. Se añade la solución de goma arábica (GA_{sol}) sobre la disolución de gelatina (GEL_{sol}) gradualmente y se mezclan los componentes (5 min)
6. Se ajusta el pH de la reacción hasta 4.1 con una solución de ácido acético (10%p/p) para inducir la coacervación. Tras esto se observa claramente un incremento de la turbidez del sistema.
7. La agitación se mantiene constante (750 rpm, 15 min) y la temperatura sin modificar (50 °C).
8. Pasado este tiempo se procede al enfriamiento gradual del sistema. El descenso se diferencia en 2 etapas. Primero la gelificación (T_{final} ≈ 25°C, t≈ 60 minutos) y posteriormente una mayor reticulación (T_{final} ≈ 5°C, t≈ 60 minutos). Para este descenso es necesario la adición de hielo de forma controlada o un criotermostato. En la segunda etapa de enfriamiento se reduce ligeramente la agitación para evitar posibles rupturas de las cápsulas ya gelificadas. (500 rpm)

CO.2. Síntesis de cápsulas de multinucleares de Miglyol®812 y fragancias (>50 µm)

Para experimentos a escala laboratorio (50-60 g)

Materiales y equipos:

- Goma arábica (GA, Sigma-Aldrich®)
- Gelatina de cerdo, Tipo A, Bloom 300 (GEL, Sigma-Aldrich®)
- Fase aceite (Miglyol®812 o fragancias)
- Disolución Acético glacial 10%p/p (Sigma-Aldrich®)
- Agua MilliQ® o destilada
- Vaso alargado (100 mL, Ø =50 mm)
- Homogenizador IKA®Ultra-Turrax®T25
- Placa agitadora con control de temperatura
- Imán agitador (30 mm x 5 mm)
- pHmetro o papel indicador de pH
- Hielo

Procedimiento:

1. Se preparan por separado las disoluciones de ambos polímeros, en este caso la gelatina A (GEL) y la goma arábica (GA). Para ello, 0.25 g de cada biopolímero se diluyen en 25 g de agua destilada o MilliQ® con el fin de obtener soluciones al 1%. Ambos se diluyen mediante agitación magnética y con aplicación de calor a una temperatura de 50 °C. La solución de gelatina se prepara en un vaso de precipitados alargado de 100 mL fijado a una placa agitadora con un baño de agua para su control de temperatura mientras que la de goma arábica se puede preparar fuera del baño.
2. Cuando la solución de gelatina (GEL_{sol}) sea homogénea y la temperatura haya alcanzado 50 °C, se retira el agitador mecánico y se añade la fase aceite (aceite o fragancia). La cantidad de aceite a encapsular está comprendida entre 1-2 g.
3. Se acopla el homogenizador Ultra-Turrax®T25 y se sumerge el vástago en la solución de gelatina para llevar a cabo la emulsión (8.000 rpm, 10 min).
4. Cuando se obtiene una emulsión estable, se retira el homogeneizador, y se añade de nuevo el agitador magnético para mantener el sistema agitado de manera constante (750 rpm).
5. Se añade la solución de goma arábica (GA_{sol}) sobre la disolución de gelatina (GEL_{sol}) gradualmente y se mezclan los componentes (5 min)
6. Se ajusta el pH de la reacción hasta 4.1 con una solución de ácido acético (10%p/p) para inducir la coacervación. Tras esto se observa claramente un incremento de la turbidez del sistema.
7. La agitación se mantiene constante (750 rpm, 15 min) y la temperatura sin modificar (50 °C).
8. Pasado este tiempo se procede al enfriamiento gradual del sistema. El descenso se diferencia en 2 etapas. Primero la gelificación (T_{final} ≈ 25°C, t ≈ 60 minutos) y posteriormente una mayor reticulación (T_{final} ≈ 5°C, t ≈ 60 minutos). Para este descenso es necesario la adición de hielo de forma controlada o un criotermostato. En la segunda etapa de enfriamiento se reduce ligeramente la agitación para evitar posibles rupturas de las cápsulas ya gelificadas. (500 rpm)

CO.3. Síntesis de cápsulas de mononucleares pequeñas (<50 μm , Miglyol o fragancias)

Para experimentos a escala laboratorio (50-60 g)

Materiales y equipos:

- Goma arábica (GA, Sigma-Aldrich®)
- Gelatina de cerdo, Tipo A, Bloom 300 (GEL, Sigma-Aldrich®)
- Fase aceite (Miglyol®812 o fragancias)
- Disolución Acético glacial 10%p/p (Sigma-Aldrich®)
- Agua MilliQ® o destilada
- Vaso alargado (100 mL, $\varnothing = 50$ mm)
- Homogenizador IKA®Ultra-Turrax®T25
- Placa agitadora con control de temperatura
- Imán agitador (30 mm x 5 mm)
- pHmetro o papel indicador de pH
- Hielo

Procedimiento:

1. Se preparan por separado las disoluciones de ambos polímeros, en este caso la gelatina A (GEL) y la goma arábica (GA). Para ello, 1 g de cada biopolímero se diluyen en 25 g de agua destilada o MilliQ® con el fin de obtener soluciones al 4%. Ambos se diluyen mediante agitación magnética y con aplicación de calor hasta una temperatura de 50 °C. La solución de gelatina se prepara en un vaso de 100 mL alargado ya acoplado una placa agitadora con un baño de agua para su control de temperatura mientras que la de goma arábica se puede realizar por separado.
2. Cuando la solución de gelatina (GEL_{sol}) esté homogénea y a la temperatura mencionada, se retira el agitador mecánico y se añade la fase aceite a esta disolución (aceite o fragancia. La cantidad de aceite a encapsular debe estar en 8 y 10 g, es decir una relación 1:4 o 1:5 de polímero respecto al núcleo).
3. Se acopla el homogenizador Ultra Turrax®T25 y se sumerge el vástago en la solución de gelatina para llevar a cabo la emulsión (8.000 rpm para un núcleo viscoso)-14.000 rpm (para un núcleo muy viscoso), durante 5 min.
4. Cuando se obtiene una emulsión estable y de tamaño de gota deseado (comprobado por microscopio óptico), se retira el homogenizador, y se añade de nuevo el agitador magnético para mantener el sistema agitado de manera constante (1000 rpm).
5. A continuación se añade la solución de goma arábica (GA_{sol}) sobre la disolución de gelatina (GEL_{sol}) gradualmente y se mezcla durante 5 minutos.
6. Seguidamente, se ajusta el pH de la reacción hasta pH=4.1 con una solución de ácido acético (10%p/p) para inducir la coacervación. Tras esto se observa claramente un incremento de la turbidez del sistema.
7. La agitación se mantiene constante (750 rpm) durante 15 minutos y la temperatura sin modificar (50 °C).
8. Pasado este tiempo se procede al enfriamiento gradual del sistema. El descenso se diferencia en 2 etapas. En la primera ($T_{\text{final}} \approx 25^{\circ}\text{C}$, $t \approx 60$ minutos) se alcanza la gelificación mientras que en la siguiente ($T_{\text{final}} \approx 5^{\circ}\text{C}$, $t \approx 60$ minutos) se produce una mayor reticulación y endurecimiento de las cápsulas. Es importante que la agitación no se detenga en ningún momento de la gelificación ya que de ser así se obtendrán agregados de forma irreversible.

Para este descenso es necesario la adición de hielo de forma controlada. Tras la gelificación se reduce la velocidad de agitación para no romper las cápsulas (750 rpm).

CO.4. Escalado de síntesis de cápsulas de mononucleares de fragancia TROPICAL (>50 μm)

Para la síntesis de 1.2 Kg de suspensión de microcápsulas

Materiales y equipos:

- Goma arábica (GA, Sigma-Aldrich®)
- Gelatina de cerdo, Tipo A, Bloom 300 (GEL, Sigma-Aldrich®)
- Fragancia Tropical Fruit P780765 (CARINSA)
- Disolución Acético glacial 10%p/p (Sigma-Aldrich®)
- Agua MilliQ® o destilada
- Placa agitadora con control de temperatura
- Vaso de precipitados (1000 mL, $\varnothing=105$ mm)
- pHmetro o papel indicador de pH
- Sistema de recirculación con control de temperatura (Julabo®F10)
- IKA® Ultra-Turrax T®50
- IKA® RW 28 Basic
- Reactor de 2L encamisado con tapa y sumidero inferior
- Tubo de silicona para transferencia de líquidos
- Soporte para reactor de 2L
- Embudo de adición
- Varilla agitadora en forma de hélice ($\varnothing=8$ cm)
- Varilla agitadora en forma de hélice ($\varnothing=14$ cm)

Procedimiento:

1. Inicialmente se prepara una solución de 500 g de gelatina (GEL, 2%p/p) en el reactor de 2 L bajo agitación mecánica (400 rpm, 50 °C).
2. Cuando la solución (GEL_{sol}) sea homogénea y alcance los 50 °C, se añaden 80 g de la fragancia TROPICAL, se acopla el homogenizador Ultra-Turrax®T25 y se emulsiona (3.000 rpm, 15 min).
3. En un vaso de precipitados (1000 mL), se prepara a continuación la solución de 500 g de goma arábica (GA, 2%p/p) bajo agitación magnética y temperatura (750 rpm, 15 min, °C)
4. Cuando la nueva solución (GA_{sol}) se encuentre totalmente homogénea y a la temperatura de 50 °C, ésta se transfiere de al reactor de 2L gradualmente (50 mL/s) de la misma manera que se realizó con la emulsión previa.
5. Cuando se haya completado la transferencia, se deja agitando durante 15 minutos para mezclar los componentes (250 rpm, 15 min)
6. Transcurrido este tiempo, se ajusta el pH a 4.1 mediante la adición gota a gota de una solución 10%p/p de ácido acético y se inicia el proceso de coacervación
7. Tras el ajuste de pH se ajusta la velocidad de agitación que se mantendrá inalterado durante toda la síntesis (400 rpm) y se inicia el descenso de temperatura.
8. El descenso se diferencia en 2 etapas. En la primera ($T_{\text{final}} \approx 25^\circ\text{C}$, $t \approx 60$ minutos, 400 rpm) se alcanza la gelificación mientras que en la siguiente ($T_{\text{final}} \approx 5^\circ\text{C}$, $t \approx 60$ minutos, 250 rpm) se produce una mayor reticulación y endurecimiento de las cápsulas.

9. Tras el proceso de descenso de temperatura, las cápsulas ya están correctamente formadas. La suspensión debe ser fluida, sin agregados macroscópicos. Las cápsulas deben tener un tamaño de partícula comprendido entre 50 y 100 μm .

CO.5. Escalado de síntesis de cápsulas de mononucleares de fragancia TROPICAL (<50 μm)

Para la síntesis de 2.5 Kg de suspensión de microcápsulas

Materiales y equipos:

- Goma arábica (GA)
- Gelatina de cerdo, Tipo A, Bloom 300 (GEL)
- Fase aceite (fragancia, aceite o PCM en fase líquida)
- Disolución Acético (10%p/p)
- Agua MilliQ® o destilada
- pHmetro o papel indicador de pH
- Criotermostato con sistema de recirculación
- IKA UltraTurrax T®50
- IKA® RW 28 Basic
- IKA®RW 20 Digital
- Fragancia Tropical Fruit P780765 (CARINSA)
- Reactor de 5L encamisado con tapa y sumidero inferior
- Reactor de 2L encamisado con tapa y sumidero inferior
- Tubo de silicona para transferencia
- Soporte para reactor de 2L
- Soporte para reactor de 5L
- Embudo de adición
- Varilla agitadora en forma de hélice ($\varnothing=14$ cm)
- Varilla agitadora en forma de hélice ($\varnothing=8$ cm)

Procedimiento:

1. Inicialmente se prepara una solución de 1.25 kg de gelatina (GEL, 4%p/p) en el reactor de 2 L bajo agitación mecánica (400 rpm, 50 °C).
2. Cuando la solución (GEL_{sol}) sea homogénea y alcance los 50 °C, se añaden 400 g de la fragancia TROPICAL, se acopla el homogenizador Ultra-Turrax®T25 y se emulsiona (8.000 rpm, 15 min).
3. Cuando la emulsión sea estable, ésta se transfiere al reactor de 5L, previamente calentado a 50 °C, mediante un tubo de silicona adaptado entre sumidero inferior del reactor de 2L y la boca del reactor de 5L.
4. Tras la transferencia, se coloca la tapa y se acopla un sistema a de agitación con una varilla de tipo hélice (250 rpm).
5. En el reactor de 2L, se prepara a continuación la solución de 1.25 Kg de goma arábica (GA, 4%p/p).

6. Cuando la nueva solución (GA_{sol}) se encuentre totalmente homogénea y a la temperatura de 50 °C, ésta se transfiere de al reactor de 5L de la misma manera que se realizó con la emulsión previa.
7. Cuando se haya completado la transferencia, se deja agitando para mezclar los componentes (250 rpm, 15 min)
8. Transcurrido este tiempo, se ajusta el pH a 4.1 mediante la adición gota a gota de una solución 10%p/p de ácido acético y se inicia el proceso de coacervación
9. Tras el ajuste de pH se ajusta la velocidad de agitación que se mantendrá inalterado durante toda la síntesis (400 rpm) y se inicia el descenso de temperatura.
10. El descenso se diferencia en 2 etapas. En la primera ($T_{final} \approx 25^{\circ}C$, $t \approx 60$ minutos, 400 rpm) se alcanza la gelificación mientras que en la siguiente ($T_{final} \approx 5^{\circ}C$, $t \approx 60$ minutos, 250 rpm) se produce una mayor reticulación y endurecimiento de las cápsulas. Es importante que la agitación no se detenga en ningún momento de la gelificación ya que de ser así se obtendrán agregados de forma irreversible.
11. Tras el proceso de descenso de temperatura, las cápsulas ya están correctamente formadas. La suspensión debe ser fluida, sin agregados macroscópicos. Las cápsulas deben tener un tamaño de partícula comprendido entre 10 y 20 μm .

4. Otros protocolos

TURB.1. Determinación del punto de mayor turbidez en la formación de coacervados

Materiales y equipos:

- Solución 1%p/p GA en agua MilliQ®
- Solución 1%p/p GEL en agua MilliQ®
- Vaso de precipitados(50 mL, $\varnothing=43$ mL)
- Imán agitador (2x20 mm)
- Pipeta Pasteur
- pHmetro
- Solución ácido acético glacial (1%p/p)
- Espectrofotómetro UV-VIS (Cary 4000, Agilent®)
- Cubeta de cuarzo

Procedimiento:

1. En un vaso alargado de 50 mL provisto de un imán agitador, se añaden 15 mL de solución de GA (0.1%p/p) y se sumerge el electrodo del pHmetro.
2. A esta solución, bajo agitación magnética, se le añade la solución de GEL (0.1%p/p).La mezcla de ambas soluciones instantáneamente muestran una ligera turbidez por la generación de coacervados.
3. Para la determinación de esta turbidez, se extraen alícuotas y se introducen en la cubeta de cuarzo para su análisis por absorbancia en el espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 600 nm.
4. A continuación se acidifica gradualmente la mezcla de biopolímeros con la adición de ácido acético y se analizan las variaciones de turbidez. Se extraen los valores de absorbancia respecto al pH de la mezcla.

5. Con los datos extraídos se genera una relación pH vs absorbancia que muestra el pH donde la turbidez es máxima, y por lo tanto, la producción de coacervados es mayor.

DEC.1. Lavado de cápsulas (MF, PA, CO) mediante decantación

Para suspensiones a escala laboratorio (50-120 g)

Materiales:

- Embudo de decantación (250-500 mL)
- Agua MilliQ® o destilada

Procedimiento:

1. Tras finalizar la reacción, se retira el agitador magnético y se retira la suspensión del baño de agua.
2. Se recogen la mayor cantidad posible de cápsulas arrastrándolas con agua y se añaden a un embudo de adición.
3. A continuación se añade una cantidad de agua destilada o MilliQ que sea doble la masa de crudo obtenida (100-240 g). Se agita vigorosamente el embudo de decantación y se dejar reposar las cápsulas.
4. Dependiendo de la densidad de las cápsulas, éstas pueden flotar o depositarse por lo que la recolección puede ser previa o posterior a la eliminación del agua. En caso de que se observen dos fases (superior e inferior) se pueden recoger por separado.

LIOF1. Proceso de liofilización de cápsulas

Materiales y equipos.

- Tubos Falcon® de 50 mL con tapón
- Suspensión de microcápsulas
- Nitrógeno líquido
- Recipiente encamisado tipo Dewar®
- Ultracongelador (HEF U410, New Brunswick®)
- Liofilizadora (Cryodos-50, Telstar®)
- Balanza (KERN PLS 1200-3^ª)

Procedimiento:

1. Se recoge una porción de la suspensión de cápsulas (15-20 mL) en un tubo Falcon previamente tarado. Se anota la cantidad añadida de suspensión para conocer posteriormente la concentración.
2. Posteriormente se procede a la congelación de la muestra. Según si la muestra se congela instantáneamente o progresivamente se usará nitrógeno líquido o un ultracongelador, respectivamente
3. En el caso de congelar con nitrógeno líquido, la boca del tubo a liofilizar se precinta con parafilm perforado antes de la congelación. Tras esto, el tubo se deposita en un recipiente

apto para congelaciones con nitrógeno líquido y se añade el nitrógeno con precaución. Se dejan congelar las muestras unos 5-10 minutos y se llevan directamente a la liofilizadora.

4. En el caso de congelar mediante un ultracongelador, éstas se dejan durante al menos 2 horas para asegurar la completa congelación. Pasado este tiempo mínimo, se procede a taparlas con parafilm perforado y se introducen en la liofilizadora.
5. Las muestras a liofilizar se introducen en un vaso apto para liofilización, y se dejan mínimo 48 h hasta para asegurar la completa evaporación del agua. Las condiciones para la liofilización:
 - Temperatura \approx -50 °C
 - Presión \approx 0.780 mBar

GC.1. Análisis por GC-MS de muestras encapsuladas

Materiales y equipos:

- Cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 7890B)
- Espectrómetro de masas (Agilent Technologies 5977A MSD. SQ detector)
- Muestra de microcápsulas (suspensión o sólido liofilizado)
- Acetona (ACS reagent grade, Scharlau)
- Hexano (ACS reagent grade, Scharlau)
- Agitador magnético de cruz (15x15mm)
- Jeringas de plástico (10 mL)
- Filtro TF 0,1 μ m \varnothing Turrax® T25

Condiciones GC-MS

- Gas portador: Helio
- Flujo de gas: 1.8 mL/min
- Presión: 15 psi
- Modo: Split
- Cantidad de muestra inyectada : 2 μ L
- Columna: Agilent 19091s-433
- Dimensiones columna: 30 m x 250 μ m x 0,25 μ m
- Rango de temperaturas: 50-280 °C

Procedimiento:

1. Las cápsulas a analizar se pesan y se introducen en un vial para proceder al procedimiento de ruptura y extracción.
2. En los casos en que se quiera determinar la fragancia en el exterior de las cápsulas se puede usar hexano como disolvente. El hexano extrae los compuestos orgánicos fuera de las cápsulas, ya sea en la pared en muestras liofilizadas, o libres en una suspensión acuosa. Esta fase se pincha en el GC-MS mediante el uso de un filtro.
3. Tras la extracción de los compuestos del exterior de la cápsula, la suspensión se mezcla con una cantidad conocida de acetona y se dejan agitando al menos 2 horas. Este proceso extrae el contenido interior de la cápsula.
4. Transcurrido el tiempo, se extrae la acetona del vial y se filtra para eliminar cualquier resto de cápsula.

5. La muestra se introduce en viales aptos para la determinación por GC-MS y se procede a pinchar la muestra.

GRAV. Ruptura de cápsulas para determinación cuantitativa por gravimetría

Materiales y equipos:

- Cápsulas en forma de polvo/sólido liofilizado
- Cloroformo/acetona (ACS reagen grade, Scharlau)
- Embudo Buchner ($\varnothing=55$ mm)
- Matraz Kitasato (250 mL)
- Papel de filtro 1-3 μm
- Bomba de vacío papel filtrante
- Imán agitador de cruz (25x25 mm)
- Vaso de precipitados (250 mL)
- Agitador magnético

Procedimiento:

1. Una cantidad conocida de cápsulas liofilizadas (20-40 g) o una suspensión de las mismas (100-200 g, 15-30%p/p de cápsulas), se mezclan con el disolvente orgánico de ruptura. Los disolventes más aptos para ello son acetona o cloroformo.
2. La mezcla se agita vigorosamente cubriendo el vaso para evitar una excesiva evaporación y salpicaduras (1000 rpm, 4 h).
3. Transcurrido este tiempo, se filtra el contenido bajo vacío con un montaje embudo Buchner/Kitasato y con el uso de un papel de filtro previamente pesado.
4. Tras el filtrado, se añade acetona/cloroformo para acabar de arrastrar restos de aceite/fragancia encapsulado y se deja secar al aire.
5. Tras el secado al aire, tanto el papel y el material recogido, se dejan secar en un horno (40 °C).
6. Transcurridas 6 h, se retira la muestra del horno, y se pesa para determinar la cantidad de material seco recogido.

RUPTRMN.1. Proceso de ruptura y extracción para determinación cuantitativa por ^1H -RMN

Materiales y equipos:

- Cápsulas en forma de polvo/sólido liofilizado
- Cloroformo deuterado (Eurisotop[®])
- N,N-Dimetilformamida(DMF, ACS reagen grade, Scharlau)
- Viales de vidrio con tapón (5 mL)
- Imán agitador (3x10 mm)
- Placa agitadora
- Micropipetas (100 y 1000 μL)
- Pipetas Pasteur de vidrio
- Tubos de vidrio de RMN (Eurisotop[®])

Procedimiento:

1. Se introduce una cantidad de 30 mg de cápsulas liofilizadas en un vial provisto de un agitador magnético.
2. Se añade a continuación una cantidad de cloroformo comprendida entre 800-1000 μ L mediante una micropipeta, cantidad suficiente para el llenado posterior del tubo de RMN.
3. El vial se tapa inmediatamente y se deja agitar durante al menos 12h para asegurar la completa ruptura y extracción del material encapsulado.
4. Tras el proceso de ruptura, se añade a la mezcla una cantidad conocida de DMF (patrón interno) y se homogeniza agitando levemente la mezcla.
5. A continuación se extrae el contenido del vial con una pipeta Pasteur y se transfiere a un tubo de RMN. En este proceso no es necesario filtrar la suspensión ya que las partículas sólidas no interfieren en el análisis posterior por RMN. En la mayoría de los casos el material de corteza se sitúa en la parte superior del tubo por la mayor densidad del cloroformo.

RMN.1. Análisis del contenido por ^1H -RMN

Materiales y Equipos:

- Espectroscopio RMN (Bruker[®] ,250 MHz)
- Tubo RMN con la muestra a analizar
- Turbina Spinner Bruker[®]

Condiciones:

- Análisis ^1H -RMN para la determinación de protón
- Lock (disolvente): CDCl_3
- Nº scans: 32 scans.
- Software : TOPSPIN

CALC.1.Cálculo de la carga útil de microcápsulas por ^1H -RMN

Software:

- Mestrelab Mestrenova[®]
- Microsoft Excel[®]

Procedimiento:

1. Mediante el Software Mestrenova[®] u otro apto para el análisis de espectro de RMN, se determina la integral de los picos a analizar. Como integral de referencia se toma el protón situado en $\delta = 8.03$ correspondiente a DMF. Esta integral se normaliza a 1.
2. En una tabla Excel[®] se añaden los datos correspondientes a la DMF y el núcleo a analizar. Los datos más relevantes (fijos y variables) son:
 - Cantidad de patrón DMF añadida
 - Peso molecular de los compuestos
 - Densidad de los compuestos
 - Cantidad de protones del pico a analizar
 - Integral del pico a analizar

- Mediante la introducción de la integral determinada se puede determinar la cantidad en masa de núcleo encapsulado. Esta cantidad, comparada con la cantidad de cápsulas analizadas da como resultado la carga de cápsula.

Las ecuaciones utilizadas para adquirir estos valores se detallan a continuación:

Abreviaciones

| | | | |
|--------------|---------------------------------------|-------------|----------------------------|
| A_{DMF} | Área Pico DMF | M_{DMF} | Masa DMF |
| A_x | Área señal del compuesto X a analizar | M_x | Masa <i>compuesto X</i> |
| n_{HDMF} | Número de protones señal DMF | M_{caps} | Masa cápsulas analizadas |
| n_{HX} | Número de protones señal compuesto X | Vol_{DMF} | Volumen añadido DMF |
| $P.M._{DMF}$ | Peso molecular DMF | Vol_x | Volumen <i>compuesto X</i> |
| $P.M._x$ | Peso molecular compuesto X | | |
| d_{DMF} | Densidad DMF | | |
| d_x | Densidad compuesto X | | |

Inicialmente se calcula la cantidad de moles añadidos de patrón interno (DMF)

$$\text{moles DMF} = Vol_{DMF} \times d_{DMF} \times P.M._{DMF}$$

A continuación, para obtener los moles del **compuesto X** es necesario establecer la relación molar con el DMF. Los datos necesarios para ello, son el número de protones que corresponden a dicha señal y la integral obtenida teniendo como referencia el Area de DMF ($A_{DMF}= 1$, $n_H=1$).

La ecuación para la determinación de esta relación molar es la siguiente:

$$\text{Rel. Molar} \left(\frac{DMF}{X} \right) = \frac{\left(\frac{A_{DMF}}{n_{HDMF}} \right)}{\left(\frac{A_x}{n_{HX}} \right)}$$

Tras establecer la relación molar entre ambos compuestos se puede determinar la cantidad de moles que hay del **compuesto X** y su masa.

$$\text{moles X} = \text{Rel. Molar} \left(\frac{\text{DMF}}{\text{X}} \right) \times \text{moles DMF}$$

$$M_X = \text{moles}_X \times P \cdot M \cdot X$$

Finalmente, con los datos correspondientes a la masa de cápsulas de partida, se puede obtener la carga útil de las cápsulas con la siguiente ecuación:

$$\text{Carga útil (\%)} = \left(\frac{M_X}{M_{caps}} \right) \times 100$$

OM.1. Visualización de muestras por microscopio óptico

Materiales y equipos:

- Suspensión de cápsulas
- Agua destilada
- Portamuestras de vidrio
- Pipeta Pasteur
- Microscopio Óptico (ZEISS® Primostar)

Procedimiento:

1. Se extrae una pequeña fracción de muestra mediante una pipeta Pasteur y se extiende por el portamuestras de vidrio. En caso de que la muestra sea muy concentrada, se extrae una fracción y se diluye con agua destilada antes de su deposición

SEM.1. Preparación y análisis de muestras por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Materiales y equipos:

- Suspensión acuosa o polvo de cápsulas
- Soporte de muestras para SEM
- Recubrimiento de soporte (Aluminum Tape o carbón Tape)
- Equipo para metalización de muestras (Leica® EM ACE 200)
- Microscopio de barrido electrónico (FEI® Quanta™ 650 FEG ESEM)

Procedimiento:

1. Para la preparación de muestras se usa aluminio en el caso las muestras húmedas y cinta de carbono para el polvo de cápsula. En las muestras en húmedo se depositan pequeñas gotas sobre la cinta de aluminio y posteriormente se dejan secar al aire. Para el caso de las muestras de cinta de carbono, las cápsulas sólidas se depositan con una espátula sobre la superficie adhesiva.
2. Tras preparar las muestras y comprobar su secado (en el caso de las húmedas) se procede a un proceso de metalización para mejorar su conductividad y por consiguiente su observación.
3. Para ello, se colocan en el metalizador y se les aplica un recubrimiento de platino de 5 nm de grosor.
4. Cuando el proceso haya finalizado (20-25 minutos) se retiran las muestras del metalizador y se colocan en el microscopio electrónico.
5. En la visualización por SEM se recomienda utilizar parámetros de *SPOT SIZE* comprendidos entre (2.5-3), un voltaje entre (2-10 mV) y alto vacío en el modo de electrones secundarios.

MZ.1. Determinación de distribución de tamaño por difracción laser

Materiales y equipos:

- Suspensión acuosa o polvo de cápsulas
- Equipo de difracción laser (Mastersizer®2000, Malvern®) con accesorio de dispersión vía húmeda
- Agua MilliQ®
- Pipetas Pasteur

Procedimiento:

1. Antes de la introducción de la muestra se fijan las siguientes condiciones para el análisis de microcápsulas tanto en el software como en el equipo:
 - 1250 rpm velocidad del dispersor vía húmeda
 - 5-15% rangos de oscuración
 - Difracción del medio: agua
2. La cámara de cuarzo por donde la muestra circula se limpia previamente con papel de microfibra para evitar la presencia de cualquier partícula que pueda interferir en la determinación.
3. Se vuelve a colocar la cámara en el equipo y se conectan la entrada y la salida del accesorio para vía húmeda
4. Se añade agua destilada al accesorio y se activa el motor a la velocidad antes especificada.
5. Si la señal de los detectores es la correcta (no hay presencia de suciedad) se realiza el alineado y el blanco.
6. Se añade a continuación una cantidad de muestra suficiente como para situar la señal dentro del rango de oscuración fijado y se inicia la determinación de tamaño. La muestra se puede añadir con una pipeta en caso de ser una suspensión acuosa o con espátula en caso de ser sólida y redispersable en agua.
7. Se realizan 3 análisis de la muestra y se genera un gráfico con los tamaños correspondientes a la muestra.

IMP.1. Impregnación de tejidos con microcápsulas al 0.15% en peso

Materiales y equipos:

- Suspensión acuosa o polvo de cápsulas
- Agitador magnético cruz (25x25 mm)
- Vaso de precipitados (500 mL, Ø=90 mm)
- Placa agitadora con control de temperatura
- Fragmentos de tejido de 25 cm² (5x5) de toalla o camiseta de algodón
- Placas Petri de vidrio

Procedimiento:

1. En un vaso de precipitados de 500 mL provisto de un imán agitador se añaden 400 g de agua del grifo hasta lograr una suspensión 0.15%p/p en cápsulas (0.6 g).
2. La mezcla se homogeniza y a continuación se añade el fragmento de tejido a tratar.
3. En caso de ser por agitación, se añade el fragmento y se deja agitando durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo se extrae con pinzas y se deja secar al aire en una placa Petri. y se activa el motor a la velocidad antes especificada.
4. En caso de ser por inmersión, el fragmento, sostenido con pinzas, se sumerge en la suspensión de cápsulas 5 veces. Tras esto se procede a dejar secar de la misma manera que con agitación.

Anexo II.

Formulaciones de fragancias utilizadas

TROPICAL FRUIT P780765

| Nombre | % Fórmula | Nombre | % Fórmula |
|---------------------------|-----------|-----------------------------|-----------|
| Acetato etilo | 1.5 | Agrumex | 16 |
| 2-Metilbutirato etilo | 3 | Aldehido C11 Undecílico | 0.0585 |
| cis-3-Hexenol | 0.2 | Veloutone | 0.5 |
| Acetato isoamilo | 1.8 | Orivone | 0.2 |
| Manzanate | 2 | Acetato terpenilo | 0.001 |
| Acetato cis-3-hexenilo | 3 | Aldehido C12 MNA | 0.0025 |
| Acetato hexilo | 6 | Menta-8-tiol-3-ona | 0.002 |
| 2-Isopropil-4-metiltiazol | 0.01 | delta-Damascona | 0.4 |
| p-Cimeno | 0.0025 | Acetato geranilo | 1.5 |
| Limoneno | 7.075 | Aldehido C12 Láurico | 0.0535 |
| Eucaliptol | 0.4 | MAM | 0.01 |
| Melonal | 0.1 | Acetato verdilo | 7.5 |
| gamma-Terpineno | 0.0025 | Metil ionona | 0.5 |
| DHM | 3.5 | Floralozone | 0.2 |
| Caproato alilo | 1.5 | Yara yara | 2 |
| Butirato de amilo | 0.8 | trans-2-dodecenal | 0.006 |
| Liffaroma | 0.2 | Decadienoato etilo | 0.1 |
| Terpinoleno | 0.0015 | Acetato veticol | 0.2 |
| Linalol | 3.655 | Butirato DBC | 1.5 |
| Alcohol feniletílico | 0.001 | Phenirat | 3 |
| Isobutirato hexilo | 0.4 | Bacdanol | 0.2 |
| Citronelal | 0.05 | Aldehido C14 | 9 |
| Mentona | 0.4 | Fructalate | 0.2 |
| Acetato bencilo | 0.0105 | DEP | 1.538 |
| Heptanoato alilo | 3 | Hedione | 3 |
| Butirato cis-3-hexenilo | 0.2 | TEC | 0.2648 |
| Terpineol | 0.02 | Iso E Super | 4 |
| Aldehido C10 | 0.206 | Salicilato hexilo | 4 |
| Terpenil metil eter | 0.6 | Habanolide | 2 |
| Alil amil glicolato | 0.2 | Aldehido alfa-amil cinámico | 0.0015 |
| Aldehido cumínico | 0.0002 | Salicilato metilo | 0.0005 |
| Citral | 0.5015 | Sandela | 0.5 |
| Carvona | 0.2 | | |
| Acetato linalilo | 1.026 | | |

APPLE TOP FCAP P9502505

| Nombre | % Fórmula |
|------------------------|-----------|
| 2-Metilbutirato etilo | 30 |
| Acetato cis-3-hexenilo | 15 |
| Caproato alilo | 40 |
| Manzanate | 15 |
| Manzanate | 2 |

FRUTAS DEL BOSQUE P105887

| Nombre | % Fórmula |
|---------------------------------|-----------|
| 2-Metilbutirato etilo | 2 |
| Acetato bencilo | 5 |
| Acetato hexilo | 2 |
| Acetato isoamilo | 0.2 |
| Alcehído C-14 (G.undecalactona) | 1 |
| Alcehído C-16 (Ald.Fresa) | 4 |
| Alcehído C-18 (G.Nonalactona) | 1 |
| Butirato de DBC | 6 |
| Caprilato de etilo | 2 |
| Beta Damascona | 0.1 |
| Etil Maltol | 2 |
| Frambinon | 4 |
| Ftalato dietilo | 29.5 |
| Gamma decalactona | 1 |
| Hedione | 15 |
| Ionona alfa | 2 |
| Ionona beta | 3 |
| Isobut.fenoxietilo | 10 |
| Agrumex | 10 |
| Acido 2-metil-2-pentenoico | 0.2 |

MARINO P105845

| Nombre | % Fórmula |
|--------------------|-----------|
| Acetato linalilo | 17 |
| Acetato nerilo | 5 |
| Bois ambrene forte | 5 |
| Calone 161 | 1 |
| Hedione | 40 |
| Helional | 5 |
| Iso e super | 25 |
| Liffaroma | 1 |
| Floralozone | 1 |

PIÑA P105885

| Nombre | % Fórmula |
|-----------------------|-----------|
| 2-Metilbutirato etilo | 2.5 |
| Acetato hexilo | 22.5 |
| Acetato isoamilo | 2.5 |
| Caprilato de etilo | 7.5 |
| Caproato alilo | 25 |
| Caproato de etilo | 12.5 |
| Heptilato etilo | 25 |
| Manzanate | 2.5 |

AMAPOLA P105887

| Nombre | % Fórmula |
|---------------------------------|-----------|
| Acetato bencilo | 8 |
| Acetato citronelilo | 2 |
| Acetato geranilo | 4 |
| Aldehído C-10 | 0.2 |
| Aldehído C-12 MNA | 0.2 |
| Alcehído C-14 (G.undecalactona) | 4 |
| Alil amil glicolato | 1 |
| Bois ambrene forte | 2 |
| Dihydroflororiffone | 2 |
| Hedione | 40 |
| Helional | 5 |
| Liffaroma | 0.5 |
| Triplal | 0.5 |
| Undecavertrol | 0.6 |
| Aldehído ciclamen supra | 0.5 |
| Propionato verdilo | 4 |
| Florazolozone | 1.5 |
| Bergaflor base | 20 |

