



# Formación y propiedades de espumas macroporosas de quitosano obtenidas a partir de emulsiones altamente concentradas

Jonatan Miras Hernández

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

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

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Programa de doctorado: “Ciència i Tecnologia de Materials”

# **Formación y propiedades de espumas macroporosas de quitosano obtenidas a partir de emulsiones altamente concentradas**

Jonatan Miras Hernández

Directores de tesis:

Jordi Esquena Moret  
Consejo Superior de Investigaciones  
Científicas (CSIC)

Susana Vilchez Maldonado  
Consejo Superior de Investigaciones  
Científicas (CSIC)

Tutora: Dra. Carme González Azón  
Universitat de Barcelona (UB)



## *Agradecimientos*

Cuando allá por el 2007, entré en el IIQAB para realizar el TFC sobre un polímero llamado quitosano y me comentaron que lo querían incorporar en emulsiones para la obtención de materiales porosos, aún no era consciente de todo lo que vendría *a posteriori*. Gracias al trabajo realizado en esta tesis doctoral y en los años previos, he tenido la oportunidad de disfrutar de una muy buena experiencia tanto personal, como profesional.

En primer lugar, me gustaría darles las gracias a mis dos directores de tesis, Jordi y Susana. A Jordi, por darme la oportunidad de entrar en el grupo de Química de Superficies (QS), por su apoyo y por haber estado siempre dispuesto a resolver cualquier duda sobre el mundo de las emulsiones, los materiales porosos y la ciencia en general. A Susana, le tengo que dar mil gracias por toda la paciencia que ha tenido conmigo en el día a día, por enseñarme a desenvolverme en el laboratorio y darme confianza en toda esta importante etapa. Ha sido para muchos como la hermana mayor o últimamente, la madrina del laboratorio. Para mí, la Jefa, pero también y sobretodo, una excelente compañera. Gracias por todos los consejos.

Me gustaría agradecer a Conxita Solans y Pilar Erra, por haber transmitido esa pasión por la ciencia y por el trabajo bien hecho. Tampoco querría olvidarme de Montse Porras, por proponerme la posibilidad de iniciarme en el mundo científico en este grupo. Agradecer a M<sup>a</sup> José García-Celma, por toda la ayuda facilitada; y también a Carmen González y Núria Llorca, por resolver todas las dudas que han ido surgiendo con los trámites con la universidad.

Gracias a M<sup>a</sup> José Bleda por su gran aportación en los cálculos estadísticos y por enseñarnos otro punto de vista en el tratamiento de los datos experimentales, al cual no estamos muy acostumbrados.

Quiero agradecer también a mis compañeros del QS con los que he compartido buenas experiencias, dentro y fuera del trabajo. A Silvia, por todos los buenos ratos compartidos, contando historias que sólo le podían pasar a ella. Una Vílchez 100 %. A Álex, por su buen humor, por los buenos momentos y por su disponibilidad a ayudar siempre. A María MR, una muy buena profesora, por resolverme muchas dudas sobre química que me fueron surgiendo. A Isabel Solè, por los *coffee breaks* que hacíamos. A Lulú, por mantener alimentado a medio centro a base de pollo con mole y niño envuelto durante su estancia en el CSIC. También quería agradecer el buen compañerismo y los buenos momentos pasados durante esta última etapa a Elena, Baltazar, Adaris y Yoran.

Gracias a los compañeros del grupo de Química Coloidal e Interfacial: a María Homs, por su disponibilidad a ayudar siempre y su amabilidad; a Ferran, por toda la ayuda dada en esta tesis y por los buenos momentos pasados; M<sup>a</sup> Carmen, Montse, Rodrigo, Sheila, Jérémie, Laura, Aurora, Cristina, Natàlia, Romà y Marta, gracias a todos por hacer mucho más agradable el día a día.

También quiero dedicarles mi agradecimiento a mucha más gente con la que he compartido parte de esta importante etapa: a Alberto, que tanto te hace un IR como te monta una barbacoa (a ver si la estrenamos); Neus y Kelly, siempre de buen humor; Alessandro y Petar, dando siempre buenos consejos y otros puntos de vista; Manroshan, Marina, Txell, Lacra, Carlos, Steffi, Roland, Javi, Camille, Jon, Raúl, Jordi Morros, Aurora, Neus Lozano... a todos, gracias.

No me olvido de todos mis amigos de la universidad, con lo que empecé: Cris, Isa, Karina, Ferran, Caye... gracias por todo lo compartido; o a los que conocí más tarde: Sonia, Ignacio, Elena, Miguel, David, Blanca... Gracias a todos por los buenos momentos.

Y gracias sobretodo a mi familia; a mis padres, por toda la paciencia y el apoyo que me habéis dado y a mi hermano, siempre resolviéndome las dudas informáticas y tecnológicas.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>13</b>
<b>GLOSARIO</b> .....	<b>19</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>21</b>
<b>SÍMBOLOS LATINOS</b> .....	<b>22</b>
<b>SÍMBOLOS GRIEGOS</b> .....	<b>24</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>27</b>
<b>1.1 TENSIOACTIVOS</b> .....	<b>29</b>
1.1.1 Propiedades de adsorción y autoagregación de tensioactivos.....	30
1.1.2 Comportamiento fásico de sistemas tensioactivos.....	32
1.1.3 Caracterización de sistemas tensioactivos .....	33
<b>1.2 EMULSIONES</b> .....	<b>34</b>
1.2.1 Clasificación y propiedades .....	34
1.2.2 Formación de emulsiones .....	37
1.2.3 Estabilidad de emulsiones.....	43
1.2.4 Aplicaciones .....	49
<b>1.3 EMULSIONES ALTAMENTE CONCENTRADAS</b> .....	<b>49</b>
1.3.1 Características generales.....	49
1.3.2 Estudio de propiedades mediante reología .....	50
1.3.3 Caracterización y propiedades reológicas de las emulsiones: Viscoelasticidad y estabilidad cinética .....	58
1.3.4 Aplicaciones .....	60
<b>1.4 EMULSIONES ALTAMENTE CONCENTRADAS COMO MEDIOS DE REACCIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE MATERIALES POROSOS</b> .....	<b>61</b>
1.4.1 Aspectos generales .....	61
1.4.2 Materiales macroporosos, mesoporosos y materiales duales meso/macroporosos: obtención y caracterización .....	62
<b>1.5 QUITOSANO: OBTENCIÓN, REACTIVIDAD, PROPIEDADES Y APLICACIONES</b> .....	<b>69</b>
1.5.1 Aspectos generales .....	69
1.5.2 Aplicaciones del quitosano.....	70
1.5.3 Reactividad del quitosano.....	70

<b>2</b>	<b>OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO .....</b>	<b>77</b>
2.1	OBJETIVOS .....	79
2.2	PLAN DE TRABAJO.....	80
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTAL.....</b>	<b>83</b>
3.1	MATERIALES.....	85
3.1.1	Tensioactivos.....	85
3.1.2	Fase oleosa.....	86
3.1.3	Fase acuosa.....	86
3.1.4	Otros productos utilizados .....	87
3.2	APARATOS E INSTRUMENTAL .....	88
3.3	MÉTODOS Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES.....	92
3.3.1	Comportamiento fásico.....	92
3.3.2	Preparación de emulsiones altamente concentradas .....	95
3.3.3	Caracterización de emulsiones altamente concentradas .....	98
3.3.4	Preparación de las espumas de quitosano .....	106
3.3.5	Caracterización de las espumas de quitosano .....	107
3.3.6	Preparación de films de quitosano .....	112
3.3.7	Respuesta al pH de los films de quitosano .....	113
3.3.8	Ensayos de adsorción/desorción de colorantes .....	116
<b>4</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>119</b>
4.1	ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO FÁSICO.....	121
4.1.1	Comportamiento fásico del sistema Solución de quitosano / Solución reguladora de fosfatos / Synperonic A7 / Decano .....	123
4.1.2	Comportamiento fásico del sistema Agua / Tween 20 / Decano .....	124
4.1.3	Comportamiento fásico del sistema Agua / Pluronic® F127 / Decano .....	125
4.1.4	Comportamiento fásico de los sistemas Agua / Pluronic® P123 / Decano y Solución de quitosano / Solución reguladora de fosfatos / Pluronic® P123 / Decano .....	126
4.2	PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EMULSIONES ALTAMENTE CONCENTRADAS CON LOS SISTEMAS ÁCIDO ACÉTICO / SOLUCIÓN REGULADORA DE FOSFATOS / SYNPERONIC A7 / DECANO Y QUITOSANO / SOLUCIÓN REGULADORA DE FOSFATOS / SYNPERONIC A7 / DECANO .....	130
4.2.1	Estudio preliminar de la influencia del quitosano en la estabilidad de las emulsiones preparadas a 25 °C .....	130
4.2.2	Influencia del quitosano, de la velocidad de agitación y del tiempo en el tamaño de gota.....	134

4.2.3	Estabilidad y cinética del proceso de entrecruzamiento del quitosano .....	159
<b>4.3</b>	<b>OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ESPUMAS DE QUITOSANO OBTENIDAS, A PARTIR DE EMULSIONES ALTAMENTE CONCENTRADAS, CON EL SISTEMA QUITOSANO / GENIPINA / SYNPERONIC A7 / DECANO ....</b>	<b>166</b>
4.3.1	Topografía de las espumas.....	167
4.3.2	Superficie específica, volumen y tamaño de poro .....	168
4.3.3	Nanofilms de quitosano entrecruzados con genipina como sistema modelo para el estudio de la respuesta al pH de las espumas de quitosano .....	171
4.3.4	Ensayos de adsorción/desorción de colorantes .....	180
<b>4.4</b>	<b>PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EMULSIONES ALTAMENTE CONCENTRADAS CON LOS SISTEMAS ÁCIDO ACÉTICO / SOLUCIÓN REGULADORA DE FOSFATOS / PLURONIC® P123 / DECANO Y QUITOSANO / SOLUCIÓN REGULADORA DE FOSFATOS / PLURONIC® P123 / DECANO.....</b>	<b>190</b>
4.4.1	Influencia del quitosano, de la concentración de tensioactivo y del tiempo en el tamaño de gota .....	191
4.4.2	Estabilidad y cinética del proceso de entrecruzamiento del quitosano .....	221
<b>4.5</b>	<b>OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ESPUMAS DE QUITOSANO A PARTIR DE EMULSIONES ALTAMENTE CONCENTRADAS CON EL SISTEMA QUITOSANO / GENIPINA / PLURONIC® P123 / DECANO .....</b>	<b>227</b>
4.5.1	Topografía de las espumas.....	229
4.5.2	Mesoporosidad de las espumas.....	234
4.5.3	Superficie específica, volumen y tamaño de poro .....	235
<b>4.6</b>	<b>ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ESTABILIDAD DE LAS EMULSIONES CON LOS TENSIOACTIVOS SYNPERONIC A7 Y PLURONIC® P123 Y DE LAS PROPIEDADES FINALES DE LAS ESPUMAS DE QUITOSANO .....</b>	<b>237</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>245</b>
<b>6</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>251</b>
<b>7</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>255</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>285</b>
8.1	TEST DE WILCOXON Y KRUSKAL-WALLIS (Diámetro de gota: Análisis estadístico para los sistemas Solución ácido acético / Solución reguladora de fosfatos / Synperonic A7 / Decano y Quitosano / Solución reguladora de fosfatos / Synperonic A7 / Decano) .....	287



<b>8.2</b>	<b>MODELO DE REGRESIÓN LINEAL MÚLTIPLE (Diámetro de gota: Análisis estadístico para los sistemas Solución ácido acético / Solución reguladora de fosfatos / Synperonic A7 / Decano y Quitosano / Solución reguladora de fosfatos / Synperonic A7 / Decano) .....</b>	<b>293</b>
<b>8.3</b>	<b>TEST DE WILCOXON Y KRUSKAL-WALLIS (Módulo elástico, <math>G'_{LVR}</math>: Análisis estadístico para los sistemas Solución ácido acético / Solución reguladora de fosfatos / Synperonic A7 / Decano y Quitosano / Solución reguladora de fosfatos / Synperonic A7 / Decano) .....</b>	<b>294</b>
<b>8.4</b>	<b>CURVAS DE CALIBRADO MEDIANTE ESPECTROMETRÍA UV-VIS PARA LOS PROCESOS DE ADSORCIÓN/DESORCIÓN DE COLORANTE .....</b>	<b>304</b>
<b>8.5</b>	<b>TEST DE WILCOXON Y KRUSKAL-WALLIS (Diámetro de gota: Análisis estadístico para los sistemas Solución ácido acético / Solución reguladora de fosfatos / Pluronic® P123 / Decano y Quitosano / Solución reguladora de fosfatos / Pluronic® P123 / Decano) .....</b>	<b>305</b>
<b>8.6</b>	<b>MODELO DE REGRESIÓN LINEAL MÚLTIPLE (Diámetro de gota: Análisis estadístico para los sistemas Solución ácido acético / Solución reguladora de fosfatos / Pluronic® P123 / Decano Quitosano / Solución reguladora de fosfatos / Pluronic® P123 / Decano) .....</b>	<b>310</b>
<b>8.7</b>	<b>DISTRIBUCIONES DE DIÁMETRO DE GOTA, EN VOLUMEN (%), PARA LAS COMPOSICIONES EAC4, EAC5, EAC7 Y EAC8.....</b>	<b>311</b>
<b>8.8</b>	<b>TEST DE WILCOXON Y KRUSKAL-WALLIS (Módulo elástico, <math>G'_{LVR}</math>: Análisis estadístico para los sistemas Solución ácido acético / Solución reguladora de fosfatos / Pluronic® P123 / Decano y Quitosano / Solución reguladora de fosfatos / Pluronic® P123 / Decano) .....</b>	<b>313</b>
<b>8.9</b>	<b>TEST DE WILCOXON Y KRUSKAL-WALLIS (Diámetro de gota: Análisis estadístico para los sistemas formados por los tensioactivos Synperonic A7 y Pluronic® P123, en ausencia y presencia de quitosano) .....</b>	<b>316</b>
<b>8.10</b>	<b>MODELO DE REGRESIÓN LINEAL MÚLTIPLE (Análisis estadístico para los sistemas formados por los tensioactivos Synperonic A7 y Pluronic® P123, en ausencia y presencia de quitosano).....</b>	<b>321</b>
<b>8.11</b>	<b>TEST DE WILCOXON Y KRUSKAL-WALLIS (Módulo elástico, <math>G'_{LVR}</math>: Análisis estadístico para los sistemas formados por los tensioactivos Synperonic A7 y Pluronic® P123, en ausencia y presencia de quitosano).....</b>	<b>322</b>
<b>8.12</b>	<b>PUBLICACIONES .....</b>	<b>325</b>

<b>8.13</b>	<b>PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS .....</b>	<b>345</b>
-------------	---	------------



# Resumen

---



Las emulsiones altamente concentradas se caracterizan por presentar un elevado porcentaje de fracción en volumen de fase dispersa ( $\phi$ ). Una de sus aplicaciones que ha mostrado un gran interés en investigación durante las últimas dos décadas ha sido la preparación de materiales porosos que pueden presentar una elevada porosidad e interconectividad, con bajas densidades (inferior a  $0,1 \text{ g/cm}^3$ ) y diferentes morfologías controladas.

El trabajo presentado en esta tesis se ha centrado en la obtención de espumas porosas de quitosano mediante la utilización de emulsiones altamente concentradas, de tipo aceite en agua, como medios de reacción. Para ello, en primer lugar, se seleccionó el sistema tensioactivo a utilizar en la preparación de las emulsiones, un tensioactivo hidrófilo para la obtención de emulsiones O/W, con una relación fase oleosa:fase acuosa de 80:20 y en presencia del biopolímero quitosano. A partir del estudio del comportamiento físico de diversos sistemas tensioactivos, se escogieron dos tensioactivos no iónicos: Synperonic A7 y Pluronic<sup>®</sup> P123.

Una vez seleccionados los sistemas tensioactivos, se prepararon las emulsiones altamente concentradas y se determinó su estabilidad y la influencia sobre el tamaño de gota de diversos parámetros: incorporación de quitosano en la fase continua de las emulsiones, velocidad de agitación durante el proceso de emulsificación y variación de la concentración de tensioactivo. Para ello, se caracterizó mediante microscopía óptica y difracción de luz láser la variación del tamaño de gota en función del tiempo. En ambos sistemas tensioactivos, dicho estudio se realizó durante 72 h a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , condiciones utilizadas posteriormente para la obtención de las espumas de quitosano. La variación del tamaño de gota obtenida mediante microscopía óptica fue analizada mediante un software estadístico (STATA<sup>®</sup>), para determinar si existían diferencias significativas en el tamaño de gota debido a las diferentes variables.

Los resultados mostraron de forma clara la reducción del tamaño de gota debido a la incorporación de quitosano debido a un incremento de viscosidad de la fase continua de las emulsiones. Dicho incremento produce una mayor cizalla durante el proceso de emulsificación y la consiguiente reducción del tamaño de gota. En el sistema formado por el tensioactivo Synperonic A7, también se detectó una reducción sistemática del tamaño de gota con el incremento de la velocidad de cizalla, debido a un mayor aporte

de energía al sistema. El incremento de concentración de tensioactivo en el sistema con el tensioactivo Pluronic<sup>®</sup> P123 y la formación de una estructura de cristal líquido, produjo un aumento de la viscosidad de la fase continua de ocho órdenes de magnitud. No obstante, esta mayor viscosidad no disminuyó en gran medida el tamaño de gota. Estos resultados indicarían que existe un diámetro de gota mínimo al incrementar la viscosidad de la fase continua. Por último, también se estudió la variación del tamaño de gota en función del tiempo. Tras ajustar los resultados a distintos modelos, se observó la presencia de un leve proceso de desestabilización por coalescencia y maduración de Ostwald, que tenían lugar de forma simultánea.

Las propiedades reológicas de las emulsiones fueron estudiadas mediante ensayos oscilatorios de deformación. La incorporación de quitosano y/o el incremento de la velocidad de agitación produjeron la reducción del tamaño de gota, obteniendo valores del módulo elástico superiores, que indicaron un comportamiento reológico más elástico de las emulsiones. En el sistema formado por el tensioactivo Pluronic<sup>®</sup> P123, la presencia de cristal líquido laminar en la fase continua de las emulsiones produjo un incremento del módulo elástico de un orden de magnitud. Los dos sistemas tensioactivos estudiados mostraron una reducción de los valores de  $G'_{LVR}$  en función del tiempo durante 72 h, que indicaron la posible presencia de coalescencia. Sin embargo, el proceso de desestabilización se podía considerar leve y por lo tanto, estos sistemas se utilizaron como medios de reacción en la obtención de materiales porosos de quitosano.

El biopolímero quitosano fue entrecruzado con un reactivo natural, la genipina. La cinética del proceso de entrecruzamiento se caracterizó también mediante reología. La reticulación dio lugar a emulsiones con un módulo elástico mayor, alcanzando el valor máximo del módulo elástico a tiempos inferiores a 48 h. No obstante, el sistema preparado con la mayor concentración de tensioactivo Pluronic<sup>®</sup> P123 presentó un comportamiento atípico, atribuido a un menor entrecruzamiento.

Finalmente, se obtuvieron las espumas de quitosano a partir de emulsiones altamente concentradas utilizadas como medios de reacción. Éstas fueron caracterizadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), mostrando una morfología porosa homogénea, con poros inferiores a 500 nm para los dos sistemas tensioactivos

estudiados. Estos valores, junto con los valores de superficie específica entre 25-60 m<sup>2</sup>/g, obtenidos mediante las isothermas de adsorción/desorción de nitrógeno, indicaron su naturaleza macroporosa. Al analizar las espumas preparadas al 9 % Pluronic® P123, se observó una estructura fibrosa y no porosa, como indicaron los bajos valores de superficie específica (17 m<sup>2</sup>/g) y la falta de mesoporosidad, caracterizada mediante adsorción/desorción de nitrógeno y difracción de rayos X a ángulo pequeño (SAXS).

Para estudiar la respuesta al pH de estos sistemas, se prepararon nanofilms de quitosano entrecruzado, de un grosor de  $\approx 40$  nm. Éstos se caracterizaron en función del pH y del grado de entrecruzamiento mediante ángulo de contacto dinámico para estudiar su mojabilidad y mediante microbalanza de cristal de cuarzo y microscopía de fuerza atómica para estudiar su hinchamiento. Los resultados obtenidos mostraron la respuesta al pH de estos sistemas, con hinchamiento a pH ácido y encogimiento a pH básico, indicando que podrían ser adecuados para su utilización en procesos de adsorción/desorción en función del pH.

Por último, se estudió la posibilidad de aplicar las espumas de quitosano en la eliminación de colorantes en aguas residuales mediante cambios de pH. Con esa finalidad, se determinó la capacidad de adsorción del colorante rojo ácido 27 de las espumas obtenidas con el tensioactivo Synperonic A7 a pH 3 y la capacidad de desorción a pH 9. Los resultados obtenidos mostraron que las espumas presentaban bajas capacidades de adsorción debido a su alto grado de entrecruzamiento, que limita el número de grupos amino disponibles.

En conclusión, se han utilizado emulsiones altamente concentradas con los sistemas tensioactivos Synperonic A7 y Pluronic® P123, las cuales se ha considerado estables para su utilización en la obtención de espumas macroporosas de quitosano. Dichas espumas se han caracterizado por su naturaleza macroporosa, con poros inferiores a 500 nm y superficies específicas entre 25-63 m<sup>2</sup>/g. Los resultados obtenidos indican que mediante el incremento de las propiedades mecánicas de estas espumas y una reducción del grado de entrecruzamiento proporcionarían a dichos sistemas una gran diversidad de aplicaciones, tanto en la eliminación de contaminantes en aguas residuales, como en aplicaciones farmacéuticas o biomédicas debido a la utilización de tensioactivos aceptados por la FDA (*Food and Drug Administration*) como el Pluronic® P123.





# Glosario

---



**ABREVIATURAS**

<b>AFM</b>	Microscopía de fuerza atómica ( <i>Atomic Force Microscopy</i> )
<b>BET</b>	Brunauer-Emmett-Teller
<b>BJH</b>	Barrett-Joyner-Halenda
<b>CHT</b>	Quitosano
<b>CMC</b>	Concentración micelar crítica
<b>D<sub>m.g.</sub></b>	Diámetro medio geométrico
<b>EAC</b>	Emulsión altamente concentrada
<b>EO</b>	Unidad de etilenglicol
<b>FDA</b>	Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos ( <i>Food and Drug Administration</i> )
<b>H</b>	Porcentaje en peso de la sección hidrofílica de un tensioactivo
<b>HLB</b>	Balance hidrofílico-lipofílico
<b>IUPAC</b>	Unión Internacional de la Química Pura y Aplicada ( <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> )
<b>L</b>	Porcentaje en peso de la sección lipofílica de un tensioactivo
<b>LVR</b>	Zona de viscoelasticidad lineal
<b>MMW</b>	Peso molecular promedio ( <i>Medium Molecular Weight</i> )
<b>O/W</b>	Emulsión aceite en agua
<b>PIC</b>	Composición de inversión de fases
<b>PIT</b>	Temperatura de inversión de fases
<b>pNIPAAm</b>	Poli[N-isopropilacrilamida]
<b>PO</b>	Unidad de propilenglicol
<b>QCM-D</b>	Microbalanza de cristal de cuarzo con determinación de la disipación ( <i>Quartz Crystal Microbalance with Dissipation monitoring</i> )
<b>SAXS</b>	Dispersión de rayos X a ángulo pequeño ( <i>Small Angle X-ray Scattering</i> )
<b>SCT-UB</b>	Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona
<b>scCO<sub>2</sub></b>	CO <sub>2</sub> en condiciones supercríticas
<b>WAXS</b>	Dispersión de rayos X a ángulo grande ( <i>Wide Angle X-ray Scattering</i> )
<b>W/O</b>	Emulsión agua en aceite

## SÍMBOLOS LATINOS

<b>a</b>	Distancia de repetición
<b>A</b>	Área / Área interfacial / Constante efectiva de Hamaker
<b>a<sub>s</sub></b>	Área por molécula
<b>C</b>	Constante relacionada con la entalpía de adsorción de un gas / Constante de sensibilidad del cristal de cuarzo ( $C = 17,7 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{Hz}^{-1}$ )
<b>CL</b>	Cristal líquido
<b>c<sub>0</sub></b>	Concentración de colorante inicial
<b>c<sub>t</sub></b>	Concentración de colorante en solución a un determinado tiempo t
<b>d</b>	Diámetro de gota / distancia entre planos o distancia de Bragg
<b>D</b>	Diámetro medio de poro / Coeficiente de difusión de la fase dispersa en la continua
<b>D[4,3]</b>	Diámetro medio de Brouckere
<b>D<sub>m.g.</sub></b>	Media geométrica del diámetro de gota
<b>D<sub>teórico</sub></b>	Diámetro teórico de gota
<b>E</b>	Porcentaje en peso de la sección hidrofílica de un tensioactivo no iónico etoxilado
<b>E<sub>c</sub></b>	Densidad de energía de cohesión
<b>f</b>	Frecuencia
<b>f<sub>0</sub></b>	Frecuencia fundamental
<b>F</b>	Fuerza
<b>f<sub>D</sub></b>	Factor de corrección
<b>g</b>	Gravedad
<b>G'</b>	Módulo elástico o de almacenamiento
<b>G''</b>	Módulo viscoso o de pérdida
<b>G<sub>A</sub></b>	Fuerzas de atracción de van de Waals según Hamaker
<b> G* </b>	Módulo complejo
<b>G'<sub>LVR</sub></b>	Módulo elástico en la zona de viscoelasticidad lineal
<b>G<sub>0</sub></b>	Módulo de cizalla elástico
<b>h</b>	Distancia entre gotas
<b>H</b>	Cristal líquido hexagonal
<b>H<sub>1</sub></b>	Cristal líquido hexagonal directo
<b>H<sub>2</sub></b>	Cristal líquido hexagonal inverso

<b>I<sub>1</sub></b>	Cristal líquido cúbico directo
<b>I<sub>2</sub></b>	Cristal líquido cúbico inverso
<b>J</b>	Capacitancia
<b>J<sub>0</sub></b>	Capacitancia instantánea
<b>k</b>	Índice de consistencia / Velocidad de coalescencia
<b>k<sub>1</sub> y k<sub>2</sub></b>	Constantes cinéticas de pseudoprimer y pseudosegundo orden, respectivamente
<b>K<sub>p</sub></b>	Coeficiente de partición
<b>K<sub>oil</sub></b>	Constante (17 °C) utilizada para la determinación de la PIT
<b>L</b>	Solución isótropa
<b>L<sub>1</sub></b>	Micela directa
<b>L<sub>2</sub></b>	Micela inversa
<b>L<sub>α</sub></b>	Cristal líquido laminar
<b>M</b>	Peso molecular / Masa
<b>M<sub>Lα</sub></b>	Región multifásica con presencia de cristal líquido laminar
<b>M<sub>w</sub></b>	Peso molecular
<b>n</b>	Índice de comportamiento / Armónico
<b>N<sub>A</sub></b>	Número de Avogadro
<b>N<sub>HLB</sub></b>	Número HLB
<b>N<sub>oil</sub></b>	Constante de hidrofiliadad de un aceite. Utilizada en la determinación de la PIT
<b>O</b>	Aceite / Fase aceite de una emulsión
<b>p/p<sub>0</sub></b>	Presión relativa
<b>q</b>	Módulo del vector de dispersión / Capacidad de adsorción o cantidad de colorante adsorbido por cantidad de material utilizado
<b>q<sub>e</sub></b>	Capacidad de adsorción en equilibrio
<b>r</b>	Radio de gota / Radio externo de aguja
<b>R</b>	Radio de gota / Constante de los gases ideales
<b>R<sub>32</sub></b>	Radio medio de Sauter
<b>R<sub>e</sub></b>	Número de Reynolds
<b>S</b>	Tensioactivo / Región isótropa con sólido presente
<b>S(r)</b>	Solubilidad de una fase en gota de radio r
<b>S(∞)</b>	Solubilidad de la fase dispersa en la fase continua de una emulsión

$S_{\text{BET}}$	Superficie específica obtenida mediante el método BET
<b>SEM</b>	Microscopía electrónica de barrido ( <i>Scanning Electron Microscopy</i> )
<b>Span</b>	Polidispersidad
<b>t</b>	Tiempo
<b>T</b>	Temperatura
$t_g$	Tiempo de gelificación
<b>v</b>	Velocidad lineal
<b>V</b>	Volumen de gas adsorbido / Volumen de la solución de colorante
$V_1$	Cristal líquido bicontinuo directo
$V_2$	Cristal líquido bicontinuo inverso
$V_{\text{ads}}$	Volumen de nitrógeno adsorbido a una presión relativa próxima a 1
$V_D$	Volumen de gota
$V_m$	Volumen molar de la fase dispersa de una emulsión / Volumen molar de nitrógeno líquido ( $34,7 \text{ cm}^3/\text{mol}$ ) / Solución micelar
$V_P$	Volumen total de poro (para diámetros de poro inferiores a 300 nm)
$v_s$	Velocidad de sedimentación o cremado
$V_T$	Volumen total de poro / Volumen total
$V_{Tm}$	Volumen total de mesoporos
<b>w</b>	Peso final
<b>W</b>	Agua / Fase acuosa de una emulsión / Peso del material de quitosano
$w_0$	Peso inicial
$W_m$	Cantidad de gas adsorbido en una monocapa

## SÍMBOLOS GRIEGOS

$\delta$	Ángulo de fase
$\Delta A$	Variación del área interfacial
$\Delta D$	Variación de energía de disipación
$\Delta f$	Variación de frecuencia
$\Delta \gamma$	Variación de la tensión interfacial
$\Delta G^{\text{form}}$	Variación de la energía libre de formación
$\Delta m$	Variación de masa adsorbida
$\Delta p$	Variación de la presión de Laplace

---

$\Delta S$	Variación de entropía
$\Delta V$	Variación del volumen de gota
$\phi$	Fracción en volumen de fase dispersa
$\phi_c$	Fracción en volumen de fase dispersa crítica
$\gamma$	Tensión interfacial / Deformación
$\dot{\gamma}$	Velocidad de cizalla
$\gamma_0$	Amplitud de deformación
$\gamma_{cr}$	Deformación crítica
$\lambda$	Longitud de onda
$\lambda_{MAX}$	Longitud de onda de máxima adsorción
$\theta$	Ángulo de contacto / Ángulo de dispersión
$\eta$	Viscosidad
$\tau_{def}$	Tiempo de emulsificación
$\rho$	Densidad
$\sigma$	Esfuerzo de cizalla
$\sigma_0$	Esfuerzo umbral o de fluencia / Amplitud de esfuerzo sinusoidal
$\omega$	Frecuencia de ruptura del film por unidad de superficie / Velocidad angular





*Capítulo 1*

# **Introducción**

---



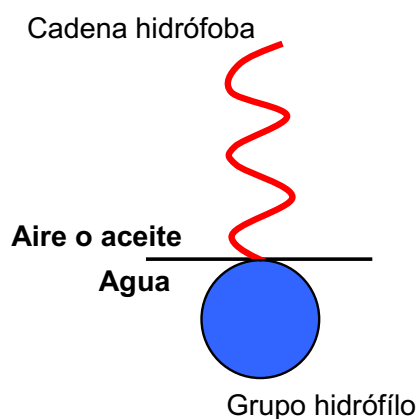
Las espumas porosas poliméricas, orgánicas o inorgánicas, presentan unas propiedades específicas, como la alta porosidad y baja densidad, que hacen que sean candidatas idóneas para su aplicación en numerosos campos. Este tipo de materiales se pueden obtener mediante el uso de emulsiones altamente concentradas a partir de procesos de polimerización o entrecruzamiento en la fase continua de dichas emulsiones.

La utilización de emulsiones altamente concentradas permite controlar la morfología y las propiedades de estas espumas en función del polímero utilizado. Dicha morfología vendrá controlada por el volumen de fase dispersa utilizado y el tipo de agregados tensioactivos formados en la fase continua. Asimismo, los parámetros experimentales utilizados, como concentración o temperatura, podrán afectar en mayor o menor grado a las características de las espumas obtenidas.

A lo largo de esta introducción se explicarán los diversos métodos de formación de estas espumas poliméricas, enfocados sobre la preparación de espumas porosas de un polisacárido de origen natural, el quitosano. Al utilizar emulsiones altamente concentradas como medios de reacción, es importante conocer las diversas propiedades específicas de dichas emulsiones y qué mecanismos pueden afectar a su estabilidad. Junto a otros parámetros como las condiciones experimentales utilizadas, el tipo de tensioactivo y los autoagregados formados por éste serán los principales responsables de la estabilidad de dichas emulsiones. Por ello, a continuación, se describen en qué consisten estas moléculas y cuál es su función en la preparación de emulsiones.

## **1.1 TENSIOACTIVOS**

Los tensioactivos se definen como moléculas anfifílicas, que se caracterizan por poseer una sección hidrófoba y otra hidrófila, afines a una fase aire u oleosa y una fase acuosa, respectivamente. En la Figura 1.1 se muestra un esquema de una molécula de tensioactivo en la interfase y orientada en función del tipo de fase.



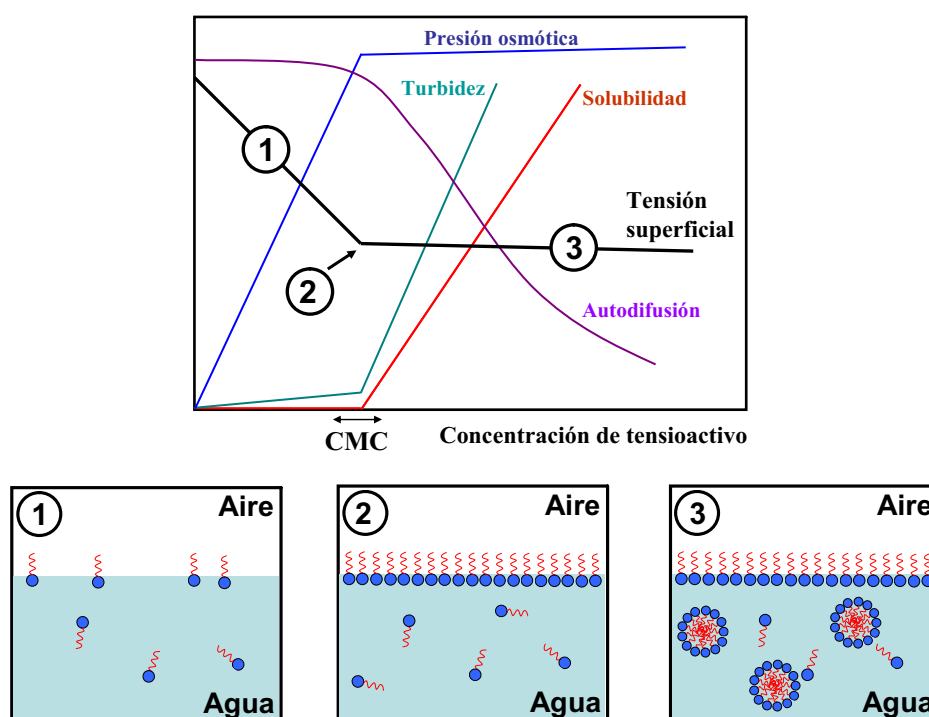
**Figura 1.1** Representación esquemática de la molécula de tensioactivo.

Generalmente, este tipo de moléculas están compuestas por una cadena alquílica lineal o ramificada como parte hidrófila, mientras que el grupo hidrófobo puede ser de cuatro tipos que, a su vez, clasifican los tensioactivos en: aniónicos, catiónicos, no iónicos y anfóteros. Esta tesis se ha centrado en el uso de tensioactivos no iónicos, los cuáles se consideran que presentan una toxicidad menor que los iónicos. Generalmente, son compatibles con el resto de tensioactivos y sus propiedades fisicoquímicas varían en mayor grado con la temperatura, mientras que la presencia de electrolitos influye en menor medida, en comparación con los tensioactivos iónicos [Jönsson, 1998a].

### 1.1.1 Propiedades de adsorción y autoagregación de tensioactivos

Las dos propiedades que definen a un tensioactivo son la capacidad de adsorción en interfases, así como la capacidad de formar autoagregados, produciéndose una orientación preferencial para reducir interacciones desfavorables [Rosen, 1978]. Como se puede apreciar en la Figura 1.2, muchas de las propiedades características de los tensioactivos son función de su concentración. En el campo de los coloides, una de las propiedades más importantes es la tensión superficial en sistemas agua-aire o tensión interfacial en sistemas agua-aceite. Los tensioactivos muestran una disminución de la tensión superficial con el incremento de concentración producido por la adsorción de las moléculas de tensioactivo en la interfase (región 1 del gráfico). Se produce esta disminución de la tensión superficial hasta alcanzar un valor característico, conocido como concentración micelar crítica (cmc), a partir del cual la tensión superficial prácticamente se mantiene constante alcanzando un plateau. A la concentración de la cmc, la interfase está saturada por las moléculas de tensioactivo. Al seguir

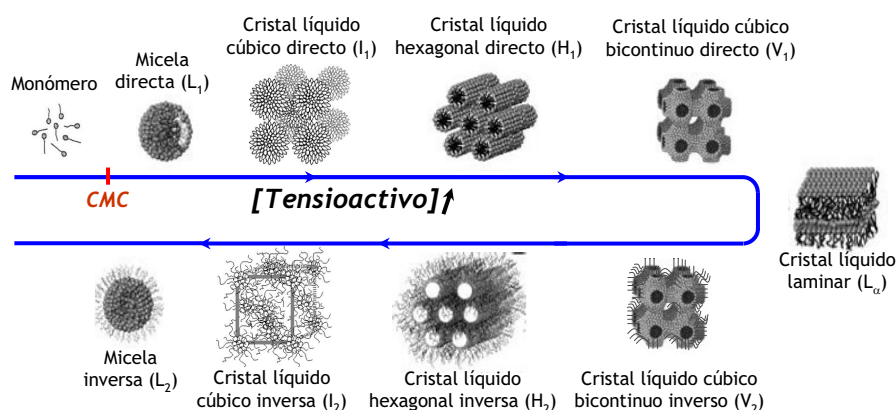
incrementando la concentración de tensioactivo se forman agregados tensioactivos por un efecto hidrofóbico [Blokzijl, 1993] de las moléculas tensioactivas con el fin de reducir las interacciones desfavorables. De esta manera, las moléculas tensioactivas forman estructuras más complejas, como micelas (Figura 1.2, punto 3) ya que su formación es un proceso entrópicamente favorable. El valor característico de la cmc para un sistema tensioactivo dependerá de la técnica utilizada para su determinación. Por ejemplo, la caracterización mediante la variación de la presión osmótica proporciona valores de cmc ligeramente superiores a la determinación por tensiometría. Sin embargo, en la determinación de la cmc mediante dispersión de luz láser dinámica (DLS) se obtendrán valores de la cmc ligeramente inferiores a tensiometría. Es por ello que la determinación de la cmc con fines comparativos debe realizarse mediante la misma técnica.



**Figura 1.2** Representación esquemática de diferentes propiedades de los tensioactivos en función de su concentración.

Las moléculas de tensioactivo pueden formar otras estructuras de autoagregados más complejas con el incremento de la concentración de tensioactivo, llamadas estructuras de cristal líquido, que a mayores concentraciones de tensioactivo pueden originar estructuras inversas (Figura 1.3). Generalmente, los tensioactivos no presentarán todas las estructuras de autoagregación posibles. Éstas principalmente dependen de los

propios componentes del sistema: disolvente y características del propio tensioactivo [Israelachvili, 1975, 1994].



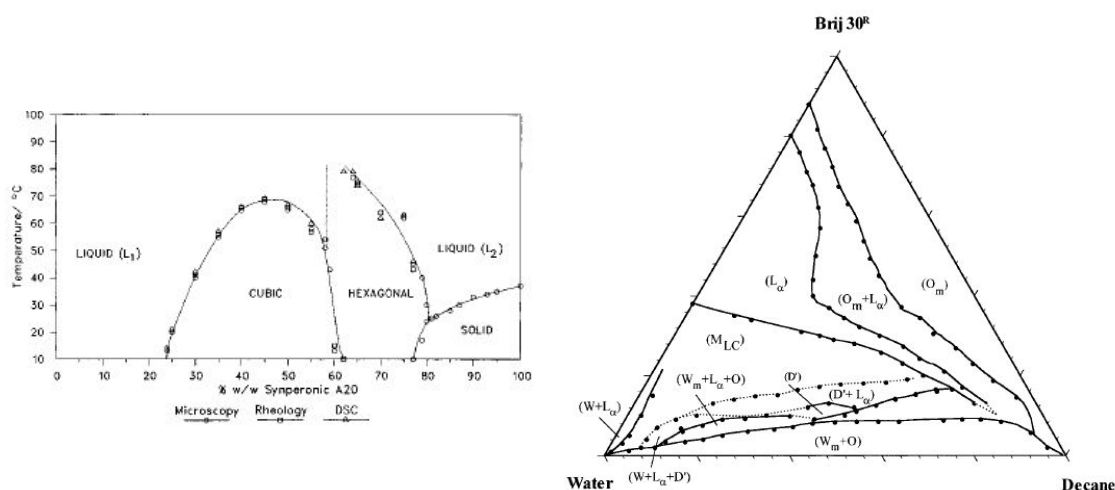
**Figura 1.3** Autoagregación de tensioactivos con el incremento de la concentración [Jönsson, 1998b].

### 1.1.2 Comportamiento fásico de sistemas tensioactivos

La determinación y caracterización del comportamiento fásico de sistemas tensioactivos se realiza mediante el uso de diagramas de fases. Es una herramienta muy útil para representar de manera clara y precisa las diferentes fases de un sistema en equilibrio, indicando su composición y estructura tensioactiva. Dependiendo del número de componentes ( $C$ ) del sistema que se quiera representar, los diagramas de fases pueden ser binarios (2 componentes: fase acuosa más tensioactivo o fase oleosa más tensioactivo) o ternarios (3 componentes: fase acuosa, fase oleosa y tensioactivo). Según la regla de las fases (Ecuación 1.1), los diagramas binarios ( $C = 2$ ) presentan dos grados de libertad ( $F = 2$ ) al trabajar a presión constante. Por lo tanto, generalmente, se estudian variando la temperatura y la concentración de tensioactivo. Por ello, se representan en gráficos de dos ejes: en el eje Y la temperatura y en el X la concentración de tensioactivo. En el caso de los diagramas ternarios ( $C = 3$ ), poseen tres grados de libertad y se representan en diagramas triangulares, conocidos como triángulos de Gibbs, al tener como variables dos concentraciones a temperatura constante. Se muestran ejemplos de diagrama binario y ternario en la Figura 1.4.

$$P + F = C + 2 \quad \text{Ecuación 1.1}$$

donde  $P$  es el número de fases existentes,  $F$  los grados de libertad y  $C$  el número de componentes.



**Figura 1.4** Ejemplos de diagrama binario del sistema Agua / Synperonic A20 (a) [Dimitrova, 1996] y diagrama ternario del sistema Agua / Brij 20 / Decano (b) [Forgiarini, 2001].  $L_1$ : fase micelar directa,  $L_2$ : fase micelar inversa, CUBIC: fase de cristal líquido cúbica, HEXAGONAL: fase de cristal líquido hexagonal, SOLID: fase sólida,  $O_m$ : microemulsión W/O,  $L_\alpha$ : fase de cristal líquido laminar,  $D'$ : fase birrefringente bajo cizalla,  $W_m$ : microemulsión O/W, W: fase acuosa, O: fase oleosa,  $M_{LC}$ : región multifásica con presencia de cristal líquido.

### 1.1.3 Caracterización de sistemas tensioactivos

Para la caracterización de los sistemas tensioactivos, se establece una primera gran clasificación entre estructuras tensioactivas isótropas y anisótropas o birrefringentes. A través de polarizadores cruzados, las muestras birrefringentes presentan un brillo característico debido al giro del ángulo de polarización de la luz causado por los planos de simetría que presentan ciertas estructuras de cristal líquido. Esta primera división permite diferenciar las soluciones micelares y los cristales líquidos cúbicos, que son estructuras isótropas, de los cristales líquidos hexagonales y laminares, que presentan birrefringencia. Un método simple de diferenciar entre una solución micelar y una estructura de cristal líquido cúbica es a través de la viscosidad de las muestras. Generalmente, las soluciones micelares presentan bastante fluidez, mientras que los cristales líquidos cúbicos son fluidos viscoelásticos con muy alta viscosidad. Los cristales líquidos hexagonales y laminares también presentan viscosidades elevadas, aunque inferiores a los cúbicos. Los cristales líquidos laminares presentan la menor viscosidad de los tres, al estar formados por capas de tensioactivo que se deslizan unas sobre otras al aplicar un esfuerzo.



La microscopía óptica con luz polarizada permite determinar el tipo de estructuras tensioactivas. Cristales líquidos hexagonales y laminares presentan texturas características que permiten su identificación [Laughlin, 1994]. Asimismo, de forma complementaria, otras técnicas también permiten conocer diversas propiedades características de las estructuras de cristal líquido [Dimitrova, 1995; Fairhurst, 1997; Dos Santos, 2007]. La técnica de dispersión de rayos X a ángulo pequeño permite identificar las diferentes estructuras de cristal líquido, isotropas o birrefringentes, determinando además parámetros característicos, como la distancia de repetición, que se explicarán en mayor detalle posteriormente [Kunieda, 1998, 2001; Sharma, 2006; Esquena, 2012].

Como se muestra en la Figura 1.3, las estructuras tensioactivas también se pueden clasificar en directas o inversas. Una primera identificación se puede realizar a través de su composición. Las estructuras directas se presentan a concentraciones elevadas de fase acuosa. Al reducir el porcentaje de fase acuosa, se produce la formación de las estructuras inversas. Medidas de conductividad, por ejemplo, permiten la identificación del tipo de estructura presente ya que las estructuras directas presentan valores superiores de conductividad que las estructuras inversas.

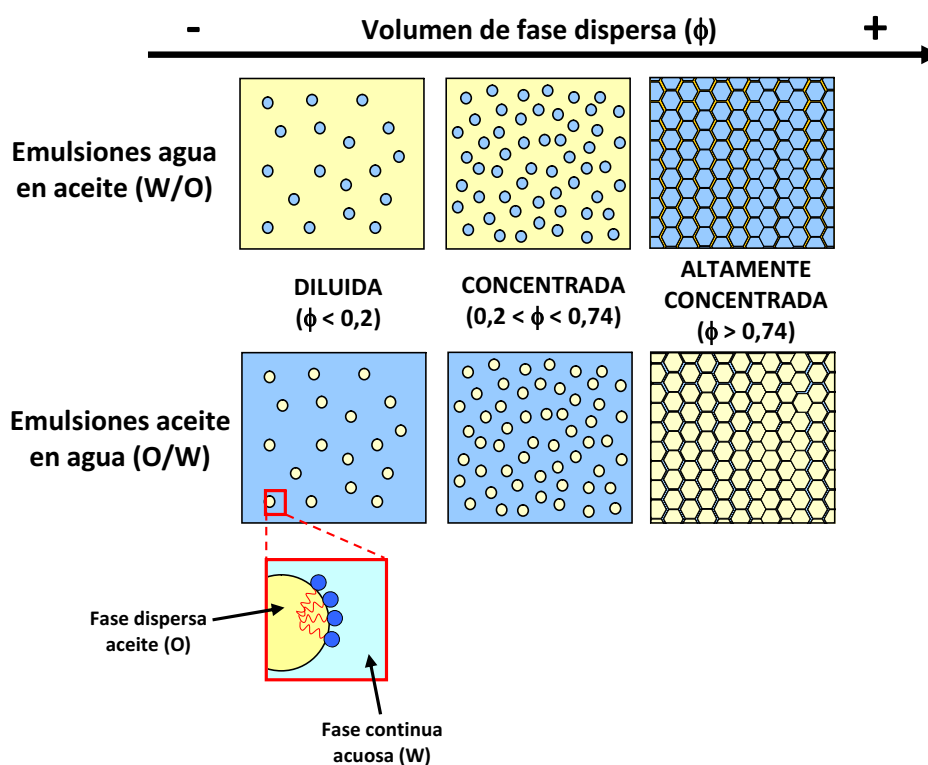
## 1.2 EMULSIONES

Debido al carácter anfílico que poseen los tensioactivos, una de sus principales aplicaciones es la formación y estabilización de emulsiones. Becher y, posteriormente, Everett definieron las emulsiones como sistemas heterogéneos termodinámicamente inestables, formados por al menos dos fases líquidas inmiscibles o parcialmente miscibles, de las cuales una está dispersa en la otra en forma de gotas de diámetro, generalmente superior a  $0,1 \mu\text{m}$  [Becher, 1965; Everett, 1972].

### 1.2.1 Clasificación y propiedades

Las principales clasificaciones de las emulsiones se realizan en base a dos factores: la naturaleza de las fases y la fracción en volumen de fase dispersa ( $\phi$ ), como se muestra de forma esquemática en la Figura 1.5. Las emulsiones pueden clasificarse en aceite en agua (O/W) al utilizar tensioactivos hidrófilos o solubles en medios acuosos y

emulsiones agua en aceite (W/O) al utilizar tensioactivos lipófilos. Las emulsiones también se clasifican según el volumen de fase dispersa ( $\phi$ ) en diluidas, concentradas y altamente concentradas. Estas últimas presentan unas propiedades y aplicaciones muy concretas debido a sus propiedades estructurales que se analizarán en mayor profundidad en los siguientes apartados, ya que la presente tesis se ha centrado en la utilización de emulsiones altamente concentradas.



**Figura 1.5** Clasificación de las emulsiones según el tipo de fase dispersa/continua y en función del volumen de fase dispersa ( $\phi$ ).

Bancroft, en 1912 [Bancroft, 1913], propuso que la fase en la que el tensioactivo fuera preferentemente soluble, constituiría la fase continua de la emulsión. En 1949, Griffin [Griffin, 1949] propuso el concepto de número *HLB* (hydrophilic-lipophilic balance),  $N_{HLB}$ , una escala semiempírica arbitraria que indicaba el comportamiento hidrófilo de los tensioactivos y, por lo tanto, el tipo de emulsiones que se podría obtener con ellos. Esta escala de Griffin indica que tensioactivos que presenten  $N_{HLB} > 10$  generalmente son hidrófilos y se utilizarán para preparar emulsiones O/W y que con tensioactivos que tengan  $N_{HLB} < 10$  generalmente se prepararán emulsiones W/O. En la Tabla 1.1, se muestran diferentes rangos de  $N_{HLB}$  y sus posibles aplicaciones. Dicha escala se ha utilizado ampliamente para estimar el comportamiento de tensioactivos para la

formulación de diversos sistemas. No obstante, no tiene en cuenta parámetros muy importantes como la temperatura, la fuerza iónica, el uso de cotensioactivos, el aceite utilizado, etc. Por lo tanto, esta escala solamente es aproximada y orientativa.

**Tabla 1.1** Campos de aplicación de los tensioactivos según la escala Griffin [Griffin, 1949].

$N_{HLB}$	Aplicación
4 – 6	Emulsificante W/O
7 – 9	Agente humectante
8 – 18	Emulsificante O/W
13 – 15	Detergente
15 – 18	Solubilizante

En el caso de tensioactivos no iónicos, el  $N_{HLB}$  se obtiene a partir del porcentaje en peso de los segmentos hidrófilos y lipófilos del tensioactivo (Ecuación 1.2).

$$N_{HLB} = \frac{H}{H + L} \cdot 20 \tag{Ecuación 1.2}$$

donde  $H$  y  $L$  son el porcentaje en peso de las secciones hidrófila y lipófila del tensioactivo, respectivamente.

En el caso específico de tensioactivos no iónicos etoxilados, la ecuación se simplifica (Ecuación 1.3).

$$N_{HLB} = \frac{E}{5} \tag{Ecuación 1.3}$$

donde  $E$  es el porcentaje en peso de la sección hidrófila.

Cuando se utilizan mezclas de tensioactivos, se puede calcular el  $N_{HLB}$  correspondiente como la media ponderada, a partir de las fracciones en peso,  $x_i$ , y el valor del número  $HLB$  de cada tensioactivo,  $N_{HLB,i}$  (Ecuación 1.4).

$$N_{HLB} = \sum x_i N_{HLB,i} \tag{Ecuación 1.4}$$

Posteriormente a Griffin, Davies [Davies, 1957] determinó empíricamente la contribución aproximada de distintos grupos funcionales al valor total del  $N_{HLB}$  de la molécula, para el cálculo del  $N_{HLB}$  de tensioactivos iónicos (Ecuación 1.5). Algunos ejemplos se muestran en la Tabla 1.2.

$$N_{HLB} = 7 + \sum(N_{HLB} \text{ del grupo hidrófilo}) - \sum(N_{HLB} \text{ del grupo lipófilo}) \tag{Ecuación 1.5}$$

**Tabla 1.2**  $N_{HLB}$  de diversos grupos funcionales.

Tipo de tensioactivo / grupo funcional	$N_{HLB}$
<b>Hidrófilo</b>	
-SO <sub>4</sub> Na <sup>+</sup>	38,7
-COO <sup>-</sup>	21,2
-COONa	19,1
N (amina ternaria)	9,4
<b>Lipófilo</b>	
-CH-, -CH <sub>2</sub> -, -CH <sub>3</sub>	0,475

Los métodos presentados por Griffin o Davies no tienen en consideración aspectos importantes en el campo de las emulsiones como el tipo y concentración de fase acuosa y oleosa o la temperatura. Shinoda y Arai [Shinoda, 1964; Arai, 1967; Shinoda, 1967] introdujeron el concepto temperatura de inversión de fases, temperatura a la cual una emulsión O/W invierte fases a una emulsión W/O. Kunieda y Shinoda [Kunieda, 1985], relacionaron el  $N_{HLB}$  de tensioactivos no iónicos etoxilados con la temperatura de inversión de fases (*PIT*), mostrada en la Ecuación 1.6, en el que se tiene en cuenta la hidrofiliidad del aceite. Dicha relación muestra como a mayor  $N_{HLB}$  del tensioactivo, la temperatura de inversión de fases incrementa [Shinoda, 1967].

$$PIT = K_{oil}(N_{HLB} - N_{oil}) \quad \text{Ecuación 1.6}$$

donde  $K_{oil}$  es una constante igual a 17 °C para la mayoría de aceites y  $N_{oil}$  es un parámetro que indica la hidrofiliidad de un aceite.

### 1.2.2 Formación de emulsiones

El proceso de emulsificación o formación de emulsiones conlleva la mezcla de una fase oleosa, otra fase acuosa y un tensioactivo. Durante este proceso, las moléculas de tensioactivo se adsorben en la interfase líquido-líquido y se produce una disminución de la tensión interfacial. Dicha disminución de la tensión interfacial tiene dos efectos: favorecer la emulsificación y estabilizar las emulsiones. En términos generales, la emulsificación requiere el aporte de energía para llevarse a cabo. Dicha energía es necesaria debido a que durante el proceso de emulsificación el área interfacial se incrementa considerablemente. Si el área interfacial a  $t = 0$  h es  $A_0$  y a  $t = t$  es  $A_t$ ,  $A_t \gg A_0$  y por lo tanto, la variación de la energía interfacial es positiva,  $\Delta A\gamma > 0$ , siendo  $\gamma$  la tensión interfacial. Además, la formación de gotas durante la emulsificación produce un incremento de entropía ( $\Delta S$ ). Generalmente,  $\Delta A\gamma$  y  $\Delta S$  serán de diferente orden de

magnitud, siendo  $\Delta A\gamma \gg \Delta S$ . Dicha diferencia implica que la energía libre de formación en estos sistemas ( $\Delta G^{form}$ ) sea positiva (Ecuación 1.7) y por lo tanto, la formación de emulsiones no es espontánea y son sistemas termodinámicamente inestables.

$$\Delta G^{form} = \Delta A\gamma - T\Delta S \cong \Delta A\gamma > 0 \quad \text{Ecuación 1.7}$$

donde  $T$  es la temperatura.

El proceso de emulsificación conlleva un incremento del área interfacial del sistema por la formación de las gotas de la emulsión. Dicho incremento es debido a un aporte de energía que puede tener un origen externo o interno a la emulsión y se clasifican como métodos de alta y baja energía, respectivamente.

### 1.2.2.1 Métodos de dispersión o de alta energía

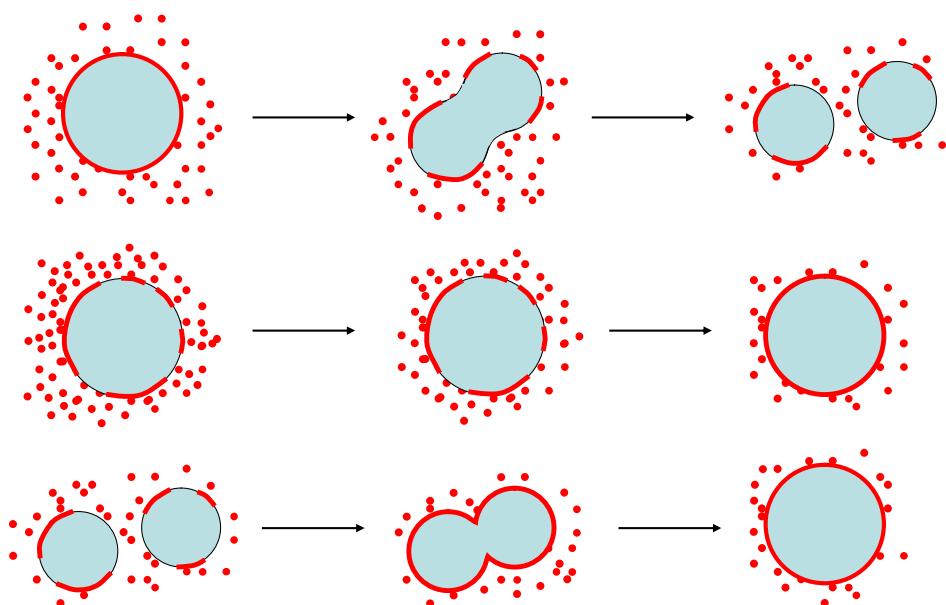
Los métodos de alta energía requieren el aporte de energía externa al sistema mediante el uso dispositivos mecánicos. El proceso de emulsificación produce la deformación de la interfase agua-aceite que da lugar a la formación de gotas. Durante dicho proceso, la deformación y ruptura de las gotas debido a un proceso de cizalla genera gotas de menor tamaño. Según la ecuación de Laplace (Ecuación 1.8), para que se produzca dicha deformación y ruptura, la cizalla aplicada debe ser superior a la presión de Laplace para poder reducir el tamaño de gota. No obstante, gran parte de la energía se disipa en forma de calor durante el proceso de emulsificación. Hay que tener en consideración el tamaño de gota requerido o deseado en el proceso de emulsificación. Según la ecuación de presión de Laplace (Ecuación 1.8), la diferencia entre la presión interna y externa de una gota, a menor tamaño de gota la  $\Delta p$  es superior. Esto implica que sería necesario un mayor aporte de energía y/o un incremento de la cantidad de tensioactivo para obtener gotas de menor tamaño.

$$\Delta p = \gamma \left( \frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right) \xrightarrow[\substack{\text{Considerando gotas esféricas} \\ r_1=r_2=r}]{\hspace{10em}} \Delta p = \frac{2\gamma}{r} \quad \text{Ecuación 1.8}$$

donde  $r_1$  y  $r_2$  son los radios de curvatura principales de una gota.

En el proceso de aporte de energía durante la formación de la emulsión, se produce un fenómeno de deformación de las gotas en el que éstas dejan de tener una forma esférica

y adoptan una forma elipsoidal. En algunos casos, se produce la ruptura de la interfase y se obtienen gotas de menor tamaño. La Figura 1.6 muestra diversos procesos que pueden tener lugar durante la formación de una emulsión. Aquí el tensioactivo tiene un rol muy importante. Al producir una disminución de la tensión interfacial, el aporte de energía necesario es menor y por lo tanto, la presión aplicada para la deformación y posterior ruptura de la interfase de las gotas es inferior, obteniéndose tamaños de gota menores con el mismo aporte de energía. Además, durante la emulsificación, el tensioactivo que se encuentra en la fase continua va adsorbiéndose en la interfase. De esta manera, la función del tensioactivo es la de estabilizar la interfase de las gotas y una vez formadas, evitar que haya procesos de coalescencia al producirse colisiones entre gotas (Figura 1.6).



**Figura 1.6** Diversos procesos que pueden tener lugar durante la emulsificación por métodos de agitación. Los puntos rojos indican las moléculas de tensioactivo en la fase continua de la emulsión y las líneas rojas gruesas el tensioactivo adsorbido en la interfase. Adaptado de [Walstra, 1998].

Relacionado con el papel del tensioactivo durante la emulsificación, existen otros mecanismos para evitar la coalescencia durante la formación de la emulsión. El efecto Gibbs-Marangoni [Van den Tempel, 1960; Lucassen-Reynders, 1994; Wilde, 2004] se produce cuando la interfase de dos gotas no está completamente cubierta por el tensioactivo. Al aproximarse, las moléculas de tensioactivo se posicionan en la interfase de cada gota, pero no es un proceso homogéneo y se produce un gradiente de tensión interfacial. Dicho gradiente produce un desplazamiento de las moléculas de tensioactivo

de la región de mayor a menor tensión interfacial y a su vez, un desplazamiento de la fase acuosa en la misma dirección, evitando de esta manera la coalescencia.

Otro aspecto a considerar durante la emulsificación es la fracción en volumen de fase dispersa ( $\phi$ ). El incremento de  $\phi$  durante la formación de una emulsión puede producir diversos efectos sobre el tamaño de gota. La probabilidad de colisión entre gotas es mayor durante el proceso de emulsificación, hecho que facilita la coalescencia. El aumento de  $\phi$  también genera un incremento del área interfacial. Si la concentración de tensioactivo es suficiente, el incremento de  $\phi$  puede dar lugar a una reducción de la concentración de tensioactivo en la interfase que produzca un incremento de la tensión interfacial ( $\gamma$ ). Por lo tanto, el aumento de  $\phi$  durante el proceso de emulsificación también puede producir a su vez un aumento del diámetro de gota y favorecer el proceso de coalescencia. Dichos parámetros y efectos se deberán tener en cuenta en el proceso de formación de emulsiones.

Los dispositivos basados en métodos de dispersión permiten aplicar diferentes grados de energía de agitación al sistema, desde un flujo por tubería (agitación baja) hasta molinos coloidales u homogeneizadores de alta presión (agitación alta), sin olvidar dispositivos con una agitación baja-intermedia o intermedia como son agitadores estáticos, rotores con palas agitadoras o agitadores de alta velocidad como Ultra-Turrax [Walstra, 1998; Tadros, 2009b]. Los métodos de dispersión han sido los más utilizados en la preparación de emulsiones altamente concentradas. La presente tesis se ha centrado en este tipo de emulsiones, que se explicarán en profundidad en el apartado 1.3. Estos métodos de preparación suelen producir emulsiones polidispersas debido al elevado porcentaje de fase dispersa que no permite una deformación de la gota y la posterior ruptura para la formación de gotas de menor tamaño.

Las características finales de la emulsión no sólo dependerán del dispositivo de agitación escogido, sino que también se deberá considerar el tipo de régimen que presenta el sistema. La cizalla generada por la agitación puede originar flujos laminares o turbulentos y esto dependerá del número de Reynolds,  $R_e$  (Ecuación 1.9).

$$R_e = \frac{v \rho}{\eta} \quad \text{Ecuación 1.9}$$

donde  $v$  es la velocidad lineal,  $\rho$  es la densidad del líquido y  $\eta$  es su viscosidad.

Flujos laminares presentan  $R_e$  inferiores a 1000 y flujos turbulentos valores próximos o superiores a 1000. El tipo de flujo dependerá de diversos factores principales: la escala del dispositivo de agitación, la velocidad del flujo y su viscosidad [Binks, 1998; Walstra, 1998]. A escala de laboratorio, uno de los principales parámetros que influirán en las características finales de la emulsión será la viscosidad de las fases dispersa y continua. Un incremento de viscosidad de la fase dispersa ( $\eta_D$ ) provocará un incremento del tiempo de emulsificación ( $\tau_{def}$ ) para obtener el mismo tamaño de gota, ya que aumenta el tiempo necesario para deformar la gota a una cizalla determinada ( $\sigma_{ext}$ ), como indica la Ecuación 1.10. No obstante, el incremento de viscosidad de la fase continua puede favorecer la ruptura de las gotas y dar lugar a una reducción de su tamaño. [Walstra, 1983, 1998; Miras, 2013a, 2013b; Martínez-Rodríguez, 2014].

$$\tau_{def} = \frac{\eta_D}{\sigma_{ext}} \quad \text{Ecuación 1.10}$$

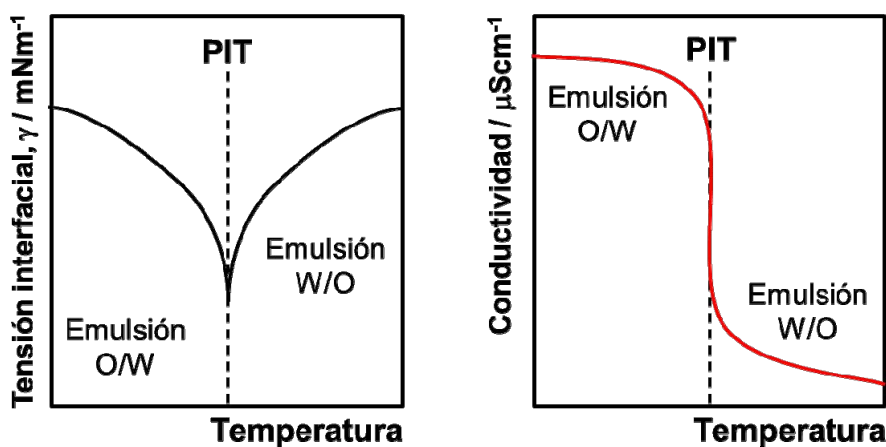
Generalmente, los métodos de dispersión o de alta energía son adecuados para la preparación de emulsiones altamente concentradas con distribuciones de gota en la escala micrométrica, que ha sido el objetivo de la presente tesis. Para sistemas que necesiten rangos de tamaño de gota inferiores (nanométricos), se utilizan métodos de baja energía.

### ***1.2.2.2 Métodos de condensación o de baja energía***

La formación de emulsiones mediante métodos de baja energía consiste en la utilización de la energía química interna del sistema para producir la emulsificación. Se basan en transiciones de fase producidas durante el proceso de emulsificación que producen un cambio espontáneo de la curvatura de los tensioactivos [Solans, 2012] y dan lugar a la formación de gotas de emulsión de manera espontánea o con un mínimo aporte de energía [Esquena, 2006]. Estos sistemas permiten obtener emulsiones con gotas de menor tamaño y menor polidispersidad que los métodos de alta energía. Las dos vías



principales de emulsificación por métodos de baja energía son mediante: la variación de composición manteniendo la temperatura constante (*PIC*) [Forgiarini, 2001; Solè, 2006] o variando la temperatura a composición constante (*PIT*) [Shinoda, 1969; Solans, 2005]. Concretamente, el método *PIT* de emulsificación ha sido utilizado en la preparación de emulsiones altamente concentradas [Pons, 1994; Kunieda, 1996; Esquena, 2003, 2006]. Mediante un incremento de temperatura y en determinadas condiciones, se puede producir la inversión de fases de una emulsión O/W a otra W/O o viceversa. La temperatura a la que tiene lugar dicho proceso es la temperatura de inversión de fases o *PIT*, descrita en la Ecuación 1.6 y válida para tensioactivos no iónicos etoxilados [Shinoda, 1967, 1969]. Se puede realizar un seguimiento del proceso y determinar la *PIT* mediante medidas de tensión interfacial ( $\gamma$ ) o conductividad en función de la temperatura (Figura 1.7). Al aproximarse al valor de la *PIT*, la tensión interfacial y la conductividad de una emulsión O/W disminuyen hasta producirse un cambio de tendencia. A partir de la *PIT*, la tensión interfacial empieza a aumentar de nuevo y la conductividad sigue disminuyendo, aunque con una pendiente inferior, indicando la formación de una emulsión W/O.



**Figura 1.7** Inversión de fases de una emulsión O/W a una W/O mediante el incremento de la temperatura, caracterizado mediante medidas de tensión interfacial ( $\gamma$ ) y conductividad.

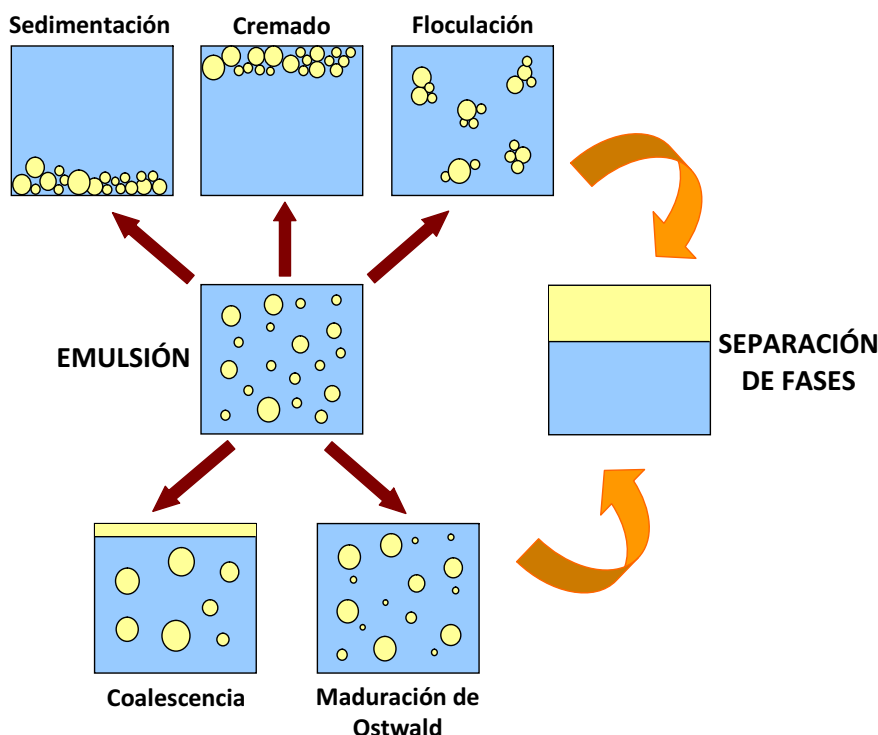
Estos resultados también indican que la preparación de emulsiones a una temperatura próxima a la *PIT*, valor en el que la tensión interfacial muestra un mínimo absoluto, permitiría obtener emulsiones con un tamaño de gota inferior. Además, la inversión de fases también es un método de emulsificación adecuado para la preparación de emulsiones O/W de reducido tamaño de gota, como ya demostró Shinoda *et al.* [Shinoda, 1969]. El proceso consiste en la preparación de una emulsión W/O a una

temperatura superior a la *PIT*, seguido de un rápido enfriamiento para producir una emulsión O/W estable. Al disminuir la temperatura y aproximarse a la *PIT*, la tensión interfacial se reduce y la flexibilidad de la interfase aumenta. Esta elevada flexibilidad en la *PIT* permite el cambio de curvatura y da lugar a la inversión de fases de una emulsión W/O a una O/W.

Una vez preparada una emulsión, el principal aspecto a considerar es su estabilidad. Como se ha comentado anteriormente, las características del sistema escogido y el procedimiento de emulsificación seleccionado afectarán a la estabilidad de las emulsiones, pudiendo tener lugar diversos procesos de desestabilización. Dichos procesos se definen y discuten en el siguiente apartado.

### **1.2.3 Estabilidad de emulsiones**

El término estabilidad de una emulsión se refiere a la variación de sus propiedades en función del tiempo, conocido como estabilidad cinética. En función del sistema estudiado, la escala temporal puede variar de pocos segundos a años. Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables que tienden a la total separación de fases. Existen diversos procesos que pueden tener lugar de forma individual, simultánea o consecutiva que producen la desestabilización de una emulsión y la posterior separación de fases: sedimentación, cremado, floculación, coalescencia y maduración de Ostwald. De manera esquemática, éstos se representan en la Figura 1.8.



**Figura 1.8** Esquema de los procesos de desestabilización de una emulsión que pueden conllevar a la total separación de fases.

### 1.2.3.1 Sedimentación / Cremado

La sedimentación o cremado se presenta principalmente en sistemas diluidos, con  $\phi < 0,2$ , debido al efecto de la gravedad por la diferencia de densidad entre las fases dispersa y continua. En dichos procesos, se produce un desplazamiento de las gotas a la zona superior de la emulsión (cremado) cuando la fase dispersa presenta una viscosidad inferior a la continua. Generalmente, es el caso de emulsiones O/W donde el aceite suele poseer una viscosidad inferior a la fase acuosa. El proceso de sedimentación es el caso opuesto. La viscosidad de la fase dispersa es superior a la de la fase continua produciendo un gradiente de concentración de las gotas, aumentando su concentración en la zona inferior de la emulsión. En ambos procesos, el tamaño de gotas no se modifica y es un proceso reversible al aplicar energía al sistema. Considerando gotas aisladas (emulsión diluida), esféricas de radio  $r$  moviéndose a través de un fluido de densidad  $\rho_0$  y comportamiento newtoniano con densidad  $\eta_0$ , se puede cuantificar la velocidad de sedimentación o cremado, también conocida como velocidad de Stokes, de un sistema (Ecuación 1.11) [Stokes, 1851].

$$v_s = \frac{2r^2(\rho_0 - \rho)g}{9\eta_0} \quad \text{Ecuación 1.11}$$

La velocidad de sedimentación o cremado puede reducirse al aplicar diversos métodos. Si las densidades de las fases dispersa y continua son muy parecidas ( $\rho_0 - \rho \sim 0$ ) entonces,  $v_s \sim 0$ . La reducción del tamaño de gota de la emulsión produce una disminución de la velocidad de Stokes. El uso de espesantes de la fase continua como goma xantana [Sun, 2007], hidroxietilcelulosa o alginatos, polímeros de alto peso molecular, produce un incremento de la viscosidad y un comportamiento pseudoplástico del sistema que evita o reduce procesos de sedimentación o cremado.

En el caso de emulsiones concentradas y altamente concentradas, al producirse un incremento de la viscosidad por el aumento de la fracción en volumen de la fase dispersa, tiene lugar una reducción importante de la velocidad de sedimentación o cremado. Este comportamiento implica que en emulsiones altamente concentradas el proceso de desestabilización por sedimentación o cremado sea prácticamente despreciable [Tadros, 2004a].

### 1.2.3.2 Floculación

El proceso de floculación consiste en la formación de agregados de las gotas de una emulsión, en el que se mantiene la unidad de las gotas, como resultado de la acción de fuerzas de atracción de van der Waals. Este proceso puede ser reversible o irreversible, en función de si las fuerzas atractivas son débiles o fuertes, respectivamente. Este proceso se produce cuando la fuerza de repulsión entre gotas no es suficiente para mantenerlas a cierta distancia entre sí, ya que dichas fuerzas atractivas incrementan al reducirse la distancia entre gotas. Hamaker [Hamaker, 1937] determinó la relación entre estas fuerzas de atracción de van der Waals ( $G_A$ ) con la distancia ( $h$ ) entre gotas monodispersas de radio  $R$  a través de la constante efectiva de Hamaker ( $A$ ), mostrada en la Ecuación 1.12, que depende del número de átomos o moléculas por unidad de volumen de las dos gotas que interaccionan,  $q$ , y del coeficiente de interacción,  $\beta$  (Ecuación 1.13).

$$G_A = -\frac{AR}{12h} \quad \text{Ecuación 1.12}$$

$$A = \pi^2 q^2 \beta$$

Ecuación 1.13

Si no existe repulsión entre gotas, éstas tenderán a flocular. Para evitar este proceso, es necesaria la presencia de fuerzas de repulsión. Dichas fuerzas se pueden introducir en el sistema mediante dos vías, en función del tensioactivo utilizado. El uso de tensioactivos iónicos produce la formación de una doble capa sobre las gotas que evita la floculación, dando lugar a repulsiones electrostáticas [Von Smoluchowski, 1906; Fuchs 1934; Derjaguin, 1941]. Por otro lado, el uso de tensioactivos no iónicos o copolímeros de bloque produce repulsiones de tipo estérico entre las gotas, al repelerse entre sí las cadenas de tipo etoxilado del tensioactivo presente en la interfase de las gotas. Una posible excepción al proceso de floculación son las emulsiones concentradas, en las que la estructura característica tipo gel estabiliza las gotas. El proceso de floculación tiende a producirse en mayor porcentaje en emulsiones polidispersas que en monodispersas. Al presentar diferentes tamaños, éstas también podrían presentar diferentes velocidades de cremado o sedimentación y la posibilidad de formación de agregados debido a la proximidad entre gotas sería mayor [Tadros, 2009a].

### *1.2.3.3 Coalescencia*

La coalescencia se produce cuando dos gotas se unen y el film o interfase de separación entre ellas sufre un proceso de adelgazamiento y ruptura, dando lugar a gotas de mayor tamaño. Este proceso de aproximación, unión y ruptura del film es el resultado de un balance de fuerzas de atracción y repulsión. Existen repulsiones electrostáticas y estéricas y atracciones de van der Waals. Generalmente, siempre que las fuerzas repulsivas sean superiores a las atractivas, el film externo de las gotas será estable y el proceso de coalescencia no se producirá. Otro parámetro a considerar será la elasticidad de la interfase de la gota la cual está relacionada con el tamaño de gota. A menor tamaño de gota, mayor elasticidad de la interfase. Esta propiedad explica la estabilidad de las nano-emulsiones (diámetro de gota entre 20 y 200 nm) frente a coalescencia [Delmas, 2011].

Pueden aplicarse diferentes métodos para incrementar la estabilidad de una emulsión frente a la coalescencia. El tipo de tensioactivo utilizado influye en gran medida en el comportamiento de la emulsión. Diversas publicaciones [Tadros, 2004b, 2004c; 2009a;

Khristov, 2010] proponen que el uso de tensioactivos poliméricos incrementa la estabilidad de las emulsiones frente a la coalescencia. La formación de films rígidos de tensioactivos poliméricos en la interfase entre las fases dispersa y continua disminuye el adelgazamiento y ruptura de dicha interfase, que da lugar a coalescencia. El mismo efecto se producen cuando se utilizan mezclas de tensioactivos, por ejemplo no iónicos con aniónicos. Otra manera de evitar la coalescencia es mediante la formación de emulsiones con estructuras de cristal líquido laminar en la fase continua de las emulsiones. Las bicapas de tensioactivo proporcionan interfaces rígidas y de grosor elevado y por lo tanto, dan lugar a emulsiones estables a la coalescencia [Friberg, 1976; Engels, 1998; Sjöblom, 2003; Santos, 2011].

Emulsiones preparadas con el método *PIT* muestran una óptima estabilidad cuando la *PIT* es de 20 a 65 °C superior a la temperatura de almacenamiento. No obstante, emulsiones preparadas cerca de la *PIT* tienden a presentar coalescencia debido a los bajos valores de tensión interfacial. Dicho mecanismo de desestabilización puede evitarse si la emulsión, una vez preparada, experimenta un proceso rápido de enfriamiento, produciéndose un incremento de la tensión interfacial y evitando así procesos rápidos de coalescencia. Este es un método utilizado en la preparación de emulsiones de tamaño de gota reducido [Shinoda, 1969; Kunieda, 1987; Kabalnov, 1996; Babak, 2002].

La coalescencia se puede estudiar en función del tiempo mediante diferentes modelos. Deminière [Deminière, 1998] propuso la formación de agujeros críticos en la interfase entre gotas adyacentes que producen la ruptura de la interfase y el consiguiente proceso de coalescencia. Deminière propuso un modelo aplicable a emulsiones monodispersas y concentradas. La variación del diámetro de gota con el tiempo se ajusta de manera lineal como se muestra en la Ecuación 1.14.

$$1/r^2 = 1/r_0^2 - (3\pi/8)\omega t \quad \text{Ecuación 1.14}$$

donde  $r$  es el radio de gota a un tiempo  $t$ ,  $r_0$  el radio de gota inicial y  $\omega$  es la frecuencia de ruptura del film por unidad de superficie.

No obstante, otros autores [Cockbain, 1953; Lee, 1982; Tadros, 2010b] han propuesto otros modelos, basados en una cinética de primer orden (Ecuación 1.15), en la que a

partir de la representación gráfica del logaritmo del diámetro de gota ( $\log d$ ) vs. el logaritmo del tiempo ( $\log t$ ) se obtiene el valor de velocidad de coalescencia ( $k$ ) a partir de la pendiente mediante ajuste lineal.

$$d = d_0 \exp(kt) \quad \text{Ecuación 1.15}$$

donde  $d$  es el diámetro de gota a tiempo  $t$ ,  $d_0$  el diámetro a tiempo  $t = 0$  y  $k$  es la velocidad de coalescencia.

#### 1.2.3.4 Maduración de Ostwald

La desestabilización de una emulsión debido a maduración de Ostwald se produce por diferencias de solubilidad entre gotas de diferente diámetro. La ecuación de presión de Laplace (Ecuación 1.8) permite predecir que las gotas de menor tamaño presentan mayor presión y por lo tanto, una mayor solubilidad de su fase interna hacia la fase externa que las gotas de mayor diámetro. El concepto de solubilidad de gotas en función del diámetro fue introducido por Lord Kelvin [Thompson, 1871] (Ecuación 1.16).

$$S(r) = S(\infty) \exp\left(\frac{2\gamma V_m}{rRT}\right) \quad \text{Ecuación 1.16}$$

donde  $S(r)$  es la solubilidad de la fase dispersa en gotas de radio  $r$ ,  $S(\infty)$  es la solubilidad de la fase dispersa en la fase continua,  $\gamma$  es la tensión interfacial,  $V_m$  el volumen molar de la fase dispersa,  $R$  es la constante de los gases ideales y  $T$  la temperatura.

La maduración de Ostwald puede determinarse cuantitativamente mediante el ajuste lineal de la representación radio de gota al cubo ( $r^3$ ) frente al tiempo ( $t$ ) según la Ecuación 1.17, conocida como la teoría LSW (Lifshitz-Slyozov-Wagner) [Lifshitz, 1961; Wagner, 1961].

$$r^3 - r_0^3 = \frac{8}{9} \left[ \frac{S(\infty)\gamma V_m D}{\rho RT} \right] t \quad \text{Ecuación 1.17}$$

donde  $r$  es el radio de gota a tiempo  $t$ ,  $r_0$  es el radio de gota a tiempo inicial,  $D$  es el coeficiente de difusión a la fase dispersa en la fase continua y  $\rho$  es la densidad de la fase dispersa.

La maduración de Ostwald en una emulsión puede reducirse o eliminarse mediante diversas vías: la utilización de una fase dispersa insoluble en la fase continua, la reducción de la tensión interfacial ( $\gamma$ ) o el uso selectivo de tensioactivos poliméricos de

tipo copolímero de bloque solubles en una de las fases [Kabalnov, 1992; Tadros, 2009b; Atanase, 2013].

#### 1.2.4 Aplicaciones

Las emulsiones han sido ampliamente utilizadas en diversos campos debido a su interesante propiedad de contener dos fases de distinta naturaleza, una acuosa y otra oleosa. Esto ha permitido utilizarlas como solubilizante de compuestos hidrófilos y lipófilos. Muchos productos farmacéuticos se basan en emulsiones ya que, utilizando proporciones adecuadas de fase acuosa y fase oleosa pueden incorporar principios activos que posteriormente serán liberados [Gallarate, 1999; Tamilvanan, 2004; Besnard, 2013]. Se utilizan como lubricantes en frío en la industria metalúrgica con diferentes funciones: lubricación, protección de superficies metálicas y disipación de calor [Shashidhara, 2010]. Las emulsiones también son utilizadas como agentes de acabado en textiles para conferirles un mejor confort del tejido en contacto con la piel o proporcionar propiedades adicionales al tejido como protección UV [Nasr, 2009].

Debido a sus propiedades estructurales y sus potenciales aplicaciones, la presente tesis se ha centrado en las emulsiones altamente concentradas (Figura 1.5) como medios de reacción para la preparación de espumas. A continuación, dichas propiedades se explicarán en mayor detalle.

### 1.3 EMULSIONES ALTAMENTE CONCENTRADAS

#### 1.3.1 Características generales

Las emulsiones altamente concentradas se caracterizan por presentar una fracción de volumen de fase dispersa ( $\phi$ ) superior a  $\phi_c = 0,74$ , valor crítico o máximo teórico para gotas esféricas monodispersas. Un empaquetamiento superior a 0,74 se alcanza si las gotas son poliédricas y/o polidispersas. En cualquier caso, aumentan los puntos de contacto entre las gotas, separadas por una fina capa de fase continua [Lissant, 1966; Princen, 1979; Solans, 2003; Solans, 2004]. Este tipo de emulsiones presentan una estructura y propiedades reológicas específicas y se caracterizan por mostrar un comportamiento de tipo viscoelástico o puramente elástico por lo que también se las



conoce como emulsiones de tipo gel [Kunieda, 1987; Ruckenstein, 1989; Pons, 1995; Ozawa, 1997]. Dicho comportamiento es debido al alto empaquetamiento de las gotas de la fase dispersa.

La caracterización reológica de sistemas coloidales ha sido ampliamente utilizada desde hace décadas. En concreto, la reología es una técnica muy útil en la caracterización de emulsiones. Los ensayos reológicos proporcionan información detallada sobre la estructura de las emulsiones o las posibles interacciones entre las partículas/gotas que forman estas emulsiones que pueden dar lugar a procesos de desestabilización. La reología también es utilizada para proporcionar información sobre aspectos de textura en productos cosméticos o para estudiar diferentes aspectos en la aplicación de diversos productos como las pinturas. Debido a la versatilidad de esta técnica, se han realizado diferentes ensayos reológicos en la presente tesis. Las propiedades estructurales y la estabilidad cinética de las emulsiones utilizadas como medios de reacción se determinaron mediante ensayos de flujo y oscilatorios. Además, la propia reacción para la obtención de materiales porosos, se caracterizó mediante ensayos de fluencia y oscilatorios. Diversos conceptos sobre el comportamiento reológico de un sistema y los distintos ensayos utilizados en esta tesis se comentan en mayor detalle a continuación.

### 1.3.2 Estudio de propiedades mediante reología

El término reología fue introducido por el Profesor Bingham y utilizado desde la fundación de la Sociedad Americana de Reología en 1929 [Barnes, 1993]. La reología se define como el estudio de la deformación de la materia. No obstante, los términos elementales de elasticidad y viscosidad fueron introducidos siglos antes por Robert Hooke e Isaac Newton, respectivamente. Hooke en 1678 desarrolló la “*True Theory of Elasticity*” en la que postuló que “un esfuerzo aplicado (fuerza por unidad de área,  $F/A$ ) es proporcional a la deformación relativa producida”. De esta manera, introdujo las bases sobre el comportamiento elástico o sólido de un sistema. Por otro lado, en 1687, Newton publicó su teoría sobre líquidos en “*Principia*” en la que afirmó que “la resistencia surgida de la falta de deslizamiento de un fluido, si el resto de factores se mantienen constantes, es proporcional a la velocidad a la que las partes de un fluido son separadas entre sí”. Esta resistencia es conocida como viscosidad y es equivalente a la resistencia de un líquido a fluir debido a fricciones internas. A mayor fricción, mayor es

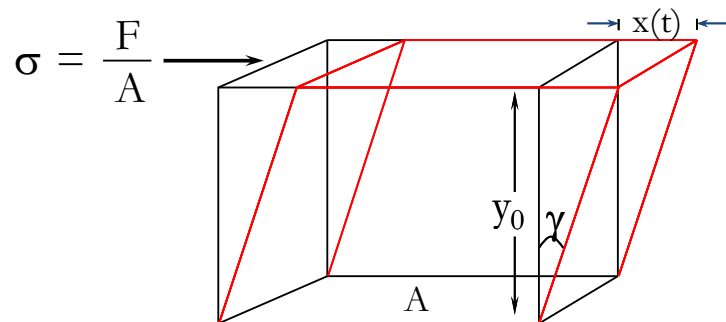
la fuerza necesaria para producir el flujo del material. A esta fuerza se la conoce como esfuerzo de cizalla ( $\sigma$ ), la cual es proporcional a la velocidad a la que se aplica dicha fuerza (velocidad de cizalla,  $\dot{\gamma}$ , Ecuación 1.19) para producir una deformación ( $\gamma$ ). Esta deformación es el ángulo formado tras la aplicación de un esfuerzo, en la que su tangente al ser un valor bajo coincide con el valor del ángulo ( $\tan \gamma = \gamma$ , Ecuación 1.18). Dicho proceso se presenta de forma esquemática en la Figura 1.9 en el que Newton relacionó dichos parámetros con la viscosidad ( $\eta$ ) de un líquido (Ecuación 1.20).

$$\tan \gamma = \gamma = \frac{x(t)}{y_0} \quad \text{Ecuación 1.18}$$

$$\dot{\gamma} = \frac{1}{y_0} \frac{dx(t)}{dt} \quad \text{Ecuación 1.19}$$

$$\sigma = \eta \dot{\gamma} \quad \text{Ecuación 1.20}$$

donde  $y_0$  es el grosor de la muestra.



**Figura 1.9** Representación esquemática del flujo de un líquido entre dos planos paralelos al aplicar una fuerza por unidad de área.

En resumen, Hooke y Newton postularon los principios sobre los conceptos de elasticidad y viscosidad de sólidos y líquidos, respectivamente. En el modelo de Hooke o de la ley de la elasticidad, al representar el esfuerzo ( $\sigma$ ) frente a la deformación ( $\gamma$ ) se obtiene una relación lineal a la que se nombró módulo elástico ( $G'$ ), como se puede observar en la Figura 1.10. A los materiales que presentan un módulo de cizalla constante independiente de la deformación aplicada se les denomina sólidos de Hooke.

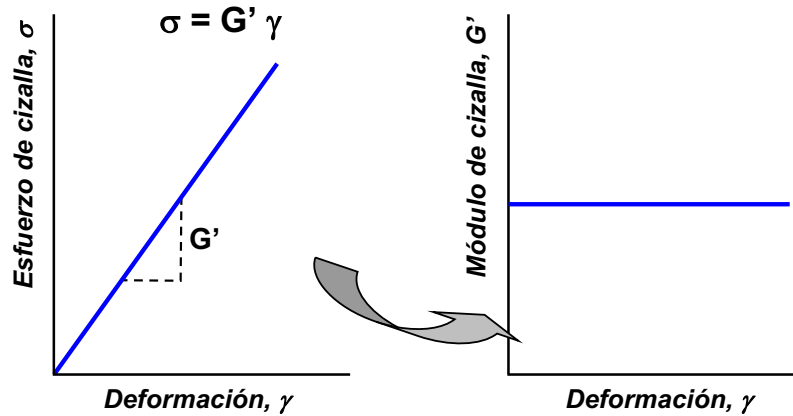


Figura 1.10 Ley de Hooke de la elasticidad.

En el caso de Newton y el concepto de viscosidad para líquidos, como indica la Ecuación 1.20, la viscosidad también es una relación lineal entre el esfuerzo aplicado ( $\sigma$ ) y la velocidad de deformación ( $\dot{\gamma}$ ) en este caso (Figura 1.11). Un sistema que cumple esta relación se denomina fluido newtoniano.

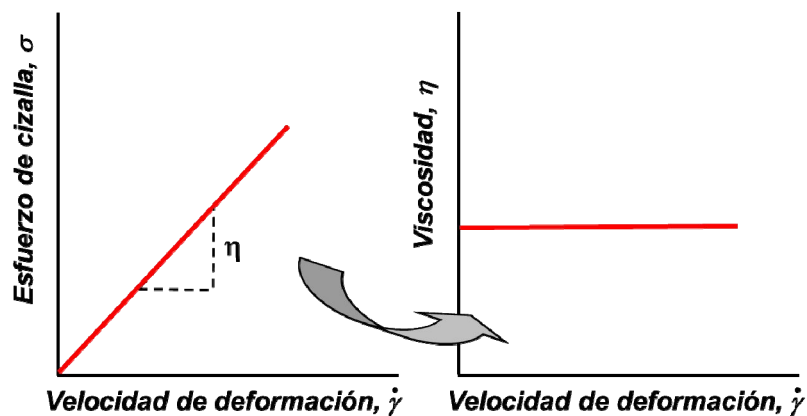
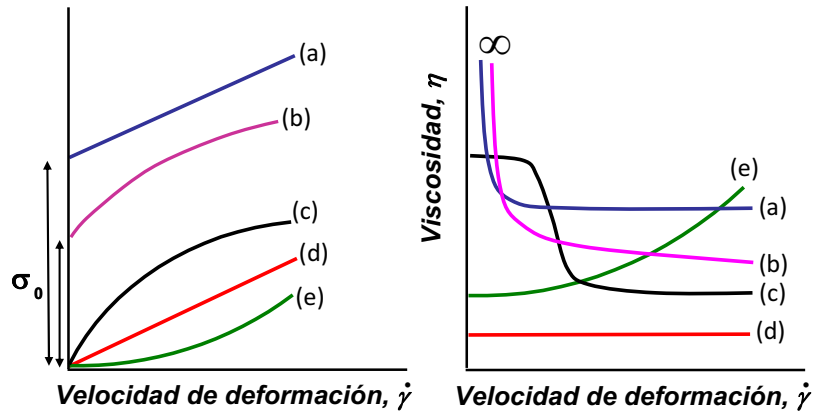


Figura 1.11 Ley de Newton de la viscosidad.

### 1.3.2.1 Ensayos de flujo

No todos los materiales presentan un comportamiento puramente líquido (viscoso) o puramente sólido (elástico). Gran multitud de materiales presentan un comportamiento intermedio conocido como viscoelástico en los que la ley de Newton no será aplicable, ya que la relación entre esfuerzo y velocidad de deformación deja de ser lineal. Son fluidos no newtonianos. En la Figura 1.12 se representan las conocidas como curvas de

flujo (esfuerzo de cizalla vs. velocidad de cizalla) y las correspondientes gráficas viscosidad vs velocidad de deformación de los sistemas viscoelásticos más representativos, que se pueden obtener mediante ensayos de flujo. Éstos se comparan a su vez con el comportamiento de un sistema newtoniano (Figura 1.12d).



**Figura 1.12** Curvas de flujo (izquierda) y gráficas viscosidad – velocidad de deformación (derecha) de los sistemas viscoelásticos más representativos: (a) Bingham (Newtoniano con esfuerzo de fluencia), (b) plástico de Bingham (pseudoplástico o *shear thinning* con esfuerzo de fluencia), (c) pseudoplástico, (d) newtoniano, (e) dilatante o *shear thickening*.

La Figura 1.12 muestra esquemáticamente los diferentes comportamientos viscoelásticos. El más parecido al newtoniano es el Bingham o newtoniano con esfuerzo de fluencia ( $\sigma_0$ ), un esfuerzo mínimo necesario para que la muestra comience a fluir (Figura 1.12 a, Ecuación 1.21). La Figura 1.12 c y Figura 1.12 e muestran las curvas de flujo correspondientes a fluidos pseudoplásticos y dilatantes, respectivamente. Este tipo de materiales siguen la ley de potencia (Ecuación 1.22), donde  $k$  es el índice de consistencia y  $n$  el índice de comportamiento. Si  $n$  es menor a 1, el fluido es pseudoplástico o *shear thinning* (Figura 1.12 c) y la viscosidad disminuye con la velocidad de cizalla y si  $n$  es superior a 1, el fluido es dilatante (Figura 1.12 e) y la viscosidad incrementa con la velocidad de cizalla.

$$\sigma = \sigma_0 + \eta \dot{\gamma} \quad \text{Ecuación 1.21}$$

$$\sigma = k \dot{\gamma}^n \quad \text{Ecuación 1.22}$$

En el caso de no cumplir ninguna de las ecuaciones anteriores, éstos pueden ajustarse a un modelo de plástico de Bingham o plástico general. También se conoce como modelo general de Herschel-Bulkley (Ecuación 1.23).

$$\sigma = \sigma_0 + k\dot{\gamma}^n \quad \text{Ecuación 1.23}$$

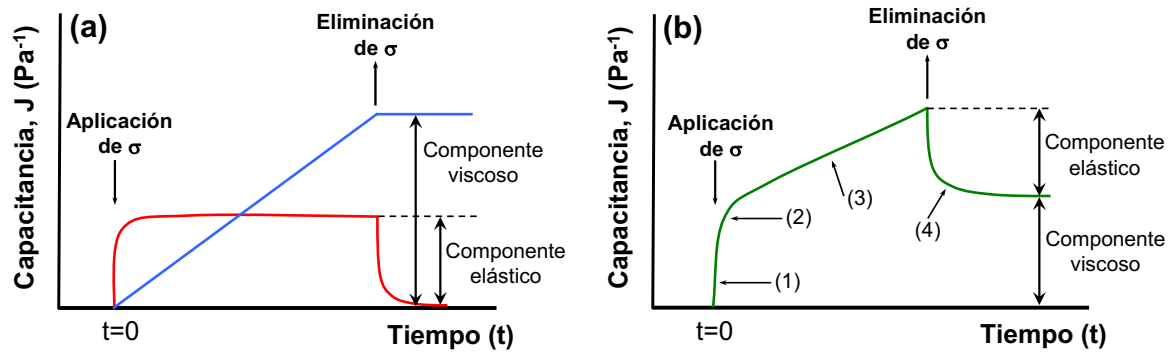
Este modelo engloba a los anteriormente mostrados. Cuando  $n = 1$ , coincide con el modelo de Bingham (Ecuación 1.21). Si  $\sigma_0 = 0$ , la ecuación corresponde a la ley de potencia (Ecuación 1.22). Si cumple las dos premisas anteriores,  $n = 1$  y  $\sigma_0 = 0$ , el modelo coincide con el modelo de Newton (Ecuación 1.20). Este modelo de tres parámetros es ampliamente utilizado al presentar mejores ajustes que los anteriormente mostrados, principalmente en sistemas pseudoplásticos [Ma, 1994; Luckham, 1999; Marcotte, 2001; Bécu, 2006; Sun, 2007; Foudazi, 2011].

### 1.3.2.2 Ensayos de fluencia

En los ensayos de fluencia o “*creep*” se aplica un esfuerzo ( $\sigma$ ) constante sobre una muestra y se mide la capacitancia o “*compliance*” ( $J$ ) como la deformación ( $\gamma$ ) producida por el esfuerzo aplicado durante un periodo de tiempo (Ecuación 1.24). Tras este periodo, el esfuerzo deja de aplicarse y la deformación o capacitancia es medida durante un determinado periodo de tiempo. Este tipo de ensayos permite identificar la naturaleza viscosa, viscoelástica o elástica ya que la variación de la capacitancia o deformación obtenida será característica para cada tipo de material (Figura 1.13).

$$J = \gamma / \sigma \quad \text{Ecuación 1.24}$$

donde  $J$  es la capacitancia ( $\text{Pa}^{-1}$ ),  $\gamma$  la deformación medida y  $\sigma$  el esfuerzo aplicado.



**Figura 1.13** Esquema de una curva de fluencia de una muestra viscosa (a, línea azul), elástica (a, línea roja) y viscoelástica (b): (1) Respuesta elástica instantánea, (2) Respuesta retardada, (3) Estado estacionario, (4) Curva de recuperación [Tadros, 2004a].

Los materiales viscosos muestran un característico incremento lineal de la capacitancia debido a la aplicación del esfuerzo (Figura 1.13 a) hasta que éste cede después de un tiempo  $t$ . Las muestras viscosas no presentan ninguna disminución de la capacitancia durante la etapa de recuperación, tras la eliminación del esfuerzo aplicado. En el caso opuesto, los materiales elásticos muestran un menor incremento de la capacitancia para un mismo valor de esfuerzo aplicado a tiempo  $t = 0$ , el cual a continuación se mantiene constante durante el periodo de tiempo del ensayo. Cuando el esfuerzo se deja de aplicar, la recuperación de la muestra es completa al obtenerse valores de capacitancia muy próximos o iguales a cero. Los materiales viscoelásticos (Figura 1.13 b) muestran un incremento abrupto de la capacitancia al aplicar un esfuerzo a  $t=0$ , conocido como respuesta elástica instantánea (Punto 1), seguido de una reducción progresiva de la pendiente capacitancia/tiempo (Puntos 2 y 3). Al dejar de aplicar el esfuerzo (Punto 4), se observa una reducción exponencial de la capacitancia, durante la etapa de recuperación. Los materiales viscoelásticos no presentan una recuperación total de la estructura ( $J = 0$ ). La curva de recuperación proporciona información sobre la componente elástica (recuperación elástica de la muestra) y la componente viscosa (pérdida de recuperación por la energía disipada al presentar un comportamiento viscoso).

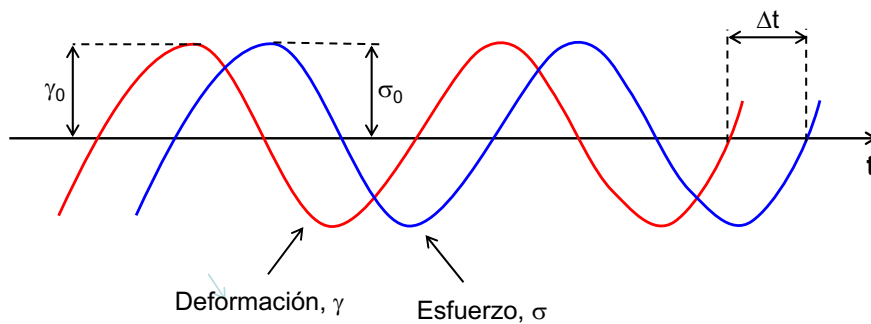
### 1.3.2.3 Ensayos oscilatorios (dinámicos)

En los ensayos oscilatorios, un esfuerzo sinusoidal ( $\sigma$ ) con amplitud  $\sigma_0$  es aplicado sobre un sistema y una deformación ( $\gamma$ ) con amplitud  $\gamma_0$  es medida simultáneamente

(Figura 1.14). De esta manera, se produce un desplazamiento temporal ( $\Delta t$ ) entre las amplitudes del esfuerzo y la deformación a una frecuencia determinada ( $\omega$ ). De los parámetros desplazamiento temporal ( $\Delta t$ ) y frecuencia ( $\omega$ ) se obtiene el ángulo de fase ( $\delta$ ), cuya relación se muestra en la Ecuación 1.25.

$$\delta = \omega \Delta t \quad \text{Ecuación 1.25}$$

El ángulo de fase indica el tipo de sistema analizado:  $\delta = 0$  (Sólido elástico),  $\delta = 90^\circ$  (Líquido viscoso) y  $0 < \delta < 90^\circ$  (Sistema viscoelástico).



**Figura 1.14** Curvas sinusoidales para un esfuerzo oscilatorio aplicado y su respuesta en forma de deformación en un sistema viscoelástico.

A partir de  $\gamma_0$ ,  $\sigma_0$  y  $\delta$ , se obtienen los parámetros reológicos: módulo complejo,  $|G^*|$  (Ecuación 1.26), módulo elástico o de almacenamiento,  $G'$  (Ecuación 1.27), y módulo viscoso o de pérdida,  $G''$  (Ecuación 1.28). La relación entre los módulos elástico y viscoso se denomina tangente  $\delta$  (Ecuación 1.29). Este parámetro indica el comportamiento viscoelástico de un material ya que a menores valores mayor elasticidad.

$$|G^*| = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \quad \text{Ecuación 1.26}$$

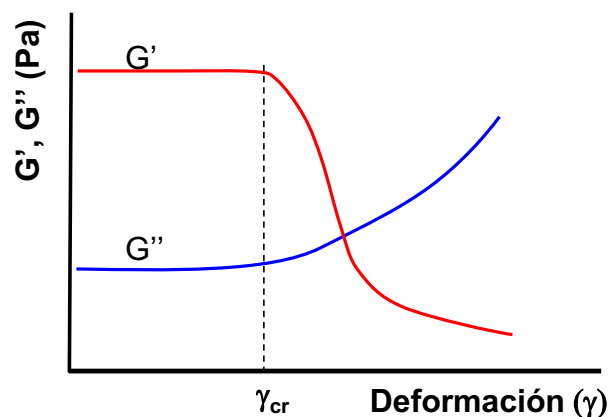
$$G' = |G^*| \cdot \cos \delta \quad \text{Ecuación 1.27}$$

$$G'' = |G^*| \cdot \sin \delta \quad \text{Ecuación 1.28}$$

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad \text{Ecuación 1.29}$$

Este tipo de ensayos oscilatorios se puede dividir en dos categorías: ensayos oscilatorios de deformación o de frecuencia. En los ensayos de deformación, se fija la frecuencia ( $\omega$ ,

rad/s o  $f$ , Hz siendo  $\omega = 6,28f$ ) y la temperatura y se realiza un barrido en deformación mientras que los valores de  $G'$  y  $G''$  son registrados. Generalmente, se detectan dos regiones claramente diferenciadas en función de los valores de  $G'$  y  $G''$  (Figura 1.15). La primera región, conocida como zona de viscoelasticidad lineal (LVR), es aquella en la que los valores de  $G'$  se mantienen prácticamente constantes e independientes de la deformación aplicada. La segunda región se produce a partir de un determinado valor de deformación crítica,  $\gamma_{cr}$ , en el que los valores de  $G'$  y  $G''$  muestran un comportamiento no lineal y  $G'$  disminuye con el incremento de la deformación. Este valor crítico indica a partir de qué deformación la estructura del material empieza a desestabilizarse de manera irreversible.



**Figura 1.15** Representación de la respuesta a una deformación de un sistema viscoelástico en un ensayo oscilatorio a una frecuencia determinada.

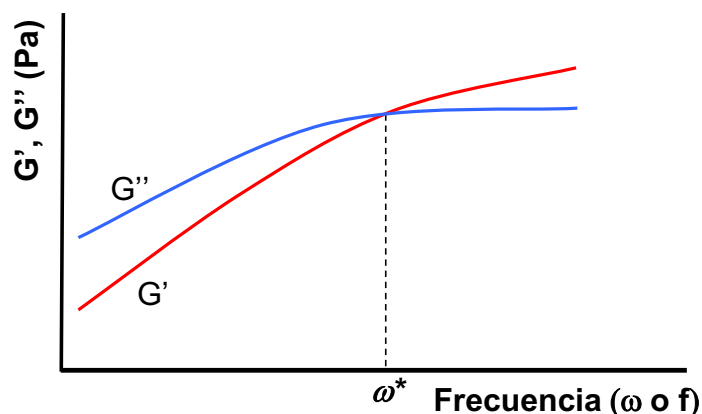
A partir del valor de deformación crítica ( $\gamma_{cr}$ ) y del correspondiente valor del módulo elástico en la zona de viscoelasticidad lineal ( $G'_{LVR}$ ) se puede calcular la densidad de energía de cohesión (*cohesive energy density*),  $E_c$ , como se muestra en la Ecuación 1.30 [Sohm, 1989; Tadros, 1990].

$$E_c = \frac{1}{2} \gamma_{cr}^2 G'_{LVR} \quad \text{Ecuación 1.30}$$

El valor de densidad de energía de cohesión es un parámetro muy útil para determinar cuantitativamente el grado de estructuración de un sistema. En emulsiones altamente concentradas, este parámetro depende de la fracción en volumen de fase dispersa, de la distribución de tamaño de gota y de la posible interacción entre las gotas.



El comportamiento viscoelástico de un sistema también puede ser estudiado a través de ensayos oscilatorios de frecuencia. En este tipo de ensayos se fija una deformación dentro de la zona de viscoelasticidad lineal (es necesario realizar un ensayo de deformación previo) y la temperatura. En este caso, los valores de  $G'$  y  $G''$  son determinados en función de la frecuencia (Figura 1.16).



**Figura 1.16** Representación de la respuesta de un sistema viscoelástico en un ensayo oscilatorio de frecuencia a una determinada deformación.

Como se puede apreciar en el esquema de la Figura 1.16, se identifican dos regiones de frecuencia. A valores de frecuencia inferiores a un valor característico de cada sistema,  $\omega^*$ ,  $G'' > G'$ , el comportamiento del sistema es más viscoso que elástico. Sin embargo, a valores de frecuencia superiores a  $\omega^*$ ,  $G' > G''$ , el sistema presenta un comportamiento más elástico que viscoso. El tiempo de relajación se calcula como el inverso de  $\omega^*$ .

### 1.3.3 Caracterización y propiedades reológicas de las emulsiones: Viscoelasticidad y estabilidad cinética

Las emulsiones altamente concentradas son sistemas estructurados debido a su alta fracción en volumen de fase dispersa ( $\phi > 0,74$ ). Este tipo de sistemas generalmente muestran un comportamiento no lineal pseudoplástico en ensayos de curvas de flujo (Figura 1.12) y se caracterizan por presentar valores del módulo elástico ( $G'$ ) independientes de la deformación aplicada ( $\gamma$ ) en un amplio rango al realizar ensayos oscilatorios [Tadros, 1994; Mason, 1996; Pal, 1996; Langenfeld, 1999; Pal, 1999; Malkin, 2004; Masmoudi, 2006; Pal, 2006; Masalova, 2011].

Princen fue de los primeros autores en estudiar las propiedades reológicas de las emulsiones altamente concentradas [Princen, 1979, 1983, 1985, 1986]. Definió un módulo de cizalla estático ( $G$ ) para emulsiones altamente concentradas a partir de una ecuación semiempírica que relaciona la tensión interfacial ( $\gamma$ ),  $R_{32}$  el radio promedio de Sauter ( $R_{32} = \sum r_i^3 / \sum r_i^2$ ), donde  $r_i$  es el radio de cada gota, y la fracción en volumen de fase dispersa ( $\phi$ ), como se muestra en la Ecuación 1.31.

$$G = a \frac{\gamma}{R_{32}} \phi^{1/3} (\phi - b) \quad \text{Ecuación 1.31}$$

donde  $a = 1,769$  y  $b = 0,712$  son parámetros de ajuste para emulsiones polidispersas aceite en agua con una fracción en volumen de fase dispersa ( $\phi$ ) superior a 0,712.

Los principales parámetros que afectan a las propiedades reológicas de una emulsión son la tensión interfacial, la fracción en volumen de la fase dispersa ( $\phi$ ), la distribución de tamaño de gota y las interacciones atractivas y/o repulsivas que puedan haber entre las gotas de la emulsión [Mason, 1996; Pal, 1996, 1999; Malkin, 2004; Derkarch, 2009; Tadros, 2010b; Masalova, 2011; Miras, 2013b]. A nivel de caracterización, las propiedades reológicas de una emulsión tienen una relación directa con su estabilidad cinética y los posibles procesos de desestabilización que se produzcan. Por ello, la reología es una técnica muy útil para estudiar las propiedades viscoelásticas de una emulsión y la correspondencia con su estabilidad cinética, que puede presentar una relación directa con la variación de tamaño de gota, según cuál sea el proceso de desestabilización involucrado. Las curvas de flujo ( $\eta$ ) o los valores de los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) de un sistema pueden variar en función del tiempo si dicho sistema no presenta cierta estabilidad cinética. A través de ensayos reológicos, en función del tiempo, puede determinarse si un sistema es estable y si no lo es, identificar el mecanismo de desestabilización puede tener lugar. De los diferentes mecanismos presentados en el apartado 1.2.3, en el caso específico de emulsiones altamente concentradas, los procesos de sedimentación o cremado serán poco importantes debido a la alta viscosidad de este tipo de emulsiones [Tadros, 2004a]. Los principales mecanismos que podrán tener lugar son floculación, coalescencia y maduración de Ostwald. Para un determinado valor de volumen de fase dispersa ( $\phi$ ), la variación de  $\eta$ ,  $G'$  y  $G''$  depende principalmente de la variación del tamaño de gota en función del tiempo. Los mecanismos de maduración de Ostwald y coalescencia producen un

desplazamiento de la distribución de tamaño de gota a valores superiores. Esto produce una reducción de la viscosidad y de la relación  $G'/G''$ . En el caso de los ensayos de fluencia, el incremento del tamaño de gota provoca un incremento de la capacitancia ( $J$ ) o de la deformación ( $\gamma$ ) para un mismo esfuerzo aplicado ( $\sigma$ ). La desestabilización por floculación de una emulsión, producida por la presencia de interacciones atractivas entre gotas, genera la formación de agregados o flóculos y, en este caso, un incremento de los parámetros reológicos  $\eta$ ,  $G'$  y  $G''$ . Sin embargo, la formación de estos agregados provoca que la deformación producida por un determinado esfuerzo aplicado disminuya. Por lo tanto, la capacitancia en procesos de floculación decrece en función del tiempo [Pal, 1996; Tadros, 2004a].

### 1.3.4 Aplicaciones

Las emulsiones concentradas y/o altamente concentradas han sido utilizadas ampliamente a lo largo de los años. Ejemplos cotidianos se pueden encontrar en la industria alimentaria, como la mayonesa que es una emulsión concentrada de tipo O/W. En la industria farmacéutica o cosmética, la incorporación de emulsiones altamente concentradas permite un mayor control de la cinética de liberación de fármacos, debido a la posibilidad de regular la difusión entre las fases dispersa y continua o permitir la solubilización de principios activos hidrófilos y/o lipófilos [Calderó, 2010; Llinàs, 2013]. Al presentar altos porcentajes de fase dispersa ( $\phi$ ), este tipo de emulsiones posee la capacidad de solubilizar concentraciones elevadas de compuestos solubles en dicha fase. En la última década, las emulsiones altamente concentradas han mostrado un gran interés para la industria de la construcción. En concreto, en el asfaltado de carreteras, al aplicar emulsiones bituminosas con dos objetivos: reducir la viscosidad del betún y su temperatura de aplicación. De esta manera, facilita su aplicación y reduce el coste energético y por consiguiente, económico [Gutiérrez, 2012; Arenas-Calderón, 2014; Martínez-Rodríguez, 2014]. Como se comentó en los anteriores apartados, las emulsiones altamente concentradas presentan una estructura de gotas poliédricas al utilizar fracciones en volumen de fase dispersa elevadas ( $\phi$ ). Dichas propiedades confieren a este tipo de emulsiones características únicas para su utilización como medios de reacción en la preparación de espumas altamente porosas. Sobre esta aplicación se centra el próximo apartado, al realizar un breve resumen sobre los diferentes métodos de obtención, caracterización y aplicaciones de dichos materiales.

## **1.4 EMULSIONES ALTAMENTE CONCENTRADAS COMO MEDIOS DE REACCIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE MATERIALES POROSOS**

Las emulsiones altamente concentradas utilizadas como medios de reacción han generado en las últimas décadas un gran interés. Al presentar fracciones de volumen de fase dispersa elevadas, es posible obtener materiales con una elevada porosidad y baja densidad. Tras una reacción de polimerización y/o entrecruzamiento de la fase continua de la emulsión y la posterior eliminación de la fase dispersa, se produce el denominado efecto plantilla y se obtiene una réplica de la estructura de la emulsión en un material poroso o espuma.

### **1.4.1 Aspectos generales**

Los primeros trabajos sobre la obtención de materiales porosos utilizando emulsiones altamente concentradas fueron publicados por Bartl y von Bonin [Bartl, 1962] y, posteriormente, por Barby y Haq [Barby, 1982]. Estos trabajos reflejaron el potencial que presentaban este tipo de emulsiones en la preparación de materiales porosos y la diversidad de materiales que podían obtenerse utilizando dichas emulsiones como medios de reacción. Inicialmente, se estudió la formación de materiales orgánicos macroporosos de poliestireno mediante polimerización de la fase continua de la emulsión [Ruckenstein, 1988; Williams, 1988; Hainey, 1991; Ruckenstein, 1992; Cameron, 1996] o materiales de óxidos inorgánicos mediante procesos sol-gel [Imhof, 1997]. Dichos sistemas se caracterizaron por presentar una alta porosidad con bajas densidades (inferior a  $0,1 \text{ g/cm}^3$ ). Posteriormente, diversos trabajos mostraron la gran versatilidad de estos sistemas para la obtención de materiales porosos con diferentes tipos de morfologías y/o porosidad. A continuación se describen los procesos más utilizados para la preparación de este tipo de materiales, comentando sus ventajas e inconvenientes.

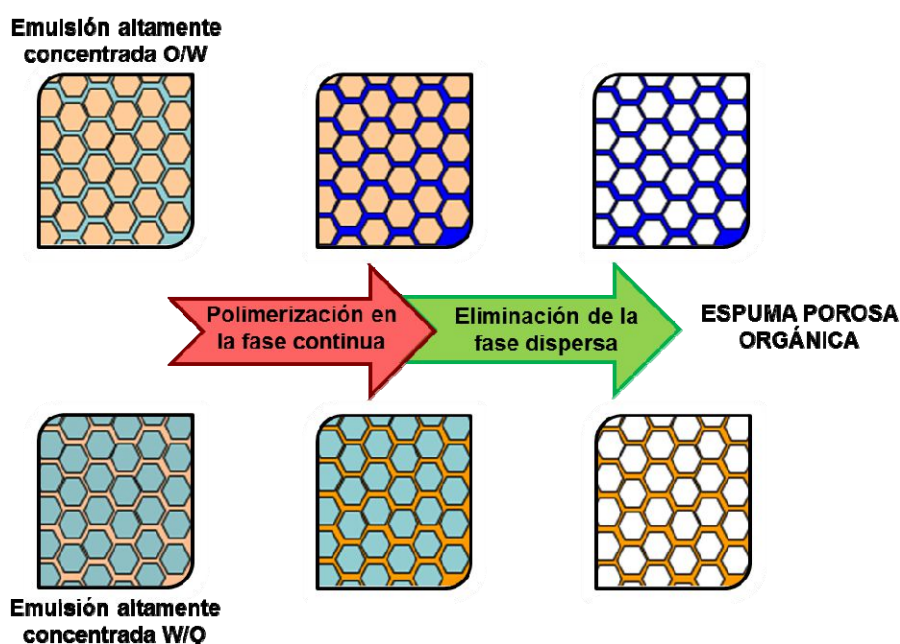
### 1.4.2 Materiales macroporosos, mesoporosos y materiales duales meso/macroporosos: obtención y caracterización

En la última década, las emulsiones altamente concentradas han sido utilizadas ampliamente para la obtención de diversos materiales porosos con diferentes estructuras, obtenidos mediante una gran variedad de métodos. Una de las principales clasificaciones de este tipo de materiales se basa en el tamaño de los poros. Según IUPAC [Sing, 1985], los materiales macroporosos presentan tamaños de poro superiores a 50 nm, los mesoporosos se encuentran entre 2 y 50 nm y con poros inferiores a 2 nm, los materiales son microporosos. En los primeros trabajos, la síntesis de materiales orgánicos macroporosos se centró en la obtención de espumas macroporosas de polímeros orgánicos, principalmente de poliestireno, utilizando divinilbenceno como entrecruzante, como refleja la gran variedad de artículos publicados por diversos grupos de investigación hasta la actualidad [Esquena, 2003; Solans, 2003; Barbetta, 2004; Carnachan, 2006; Haibach, 2006; Zhang, 2007; Molina, 2009; Abbasian, 2011; Wong, 2013; Ceglia, 2014]. A partir de los resultados obtenidos con poliestireno, otros monómeros como acrilatos fueron utilizados en la obtención de materiales porosos. Estos materiales, al utilizar monómeros hidrófobos, se obtuvieron a partir de emulsiones agua en aceite (W/O). Diferentes parámetros, como el tipo de aceite utilizado, que pueden afectar a la estabilidad de las emulsiones utilizadas como medios de reacción, han sido investigados en profundidad para estudiar su influencia en las propiedades porosas de estos materiales. En estos sistemas, la adición de sales puede reducir la solubilidad de la fase oleosa en la fase acuosa, evitando la maduración de Ostwald. Otro aspecto importante son las propiedades mecánicas de estos materiales. Algunos trabajos han propuesto la incorporación al sistema de partículas para incrementar dichas propiedades.

La incorporación de monómeros o polímeros hidrófilos en la fase continua de las emulsiones también ha sido estudiada en profundidad. Debido a la naturaleza hidrófila de dichos compuestos, se utilizaron emulsiones aceite en agua (O/W), llevándose a cabo un proceso de polimerización y/o entrecruzamiento en la fase acuosa (continua) de las emulsiones [Ruckenstein, 1988]. Este tipo de sistemas abrió la posibilidad de incorporar polímeros solubles en solución acuosa, de origen natural y/o biocompatibles, como quitosano, dextrano, poli[N-isopropilacrilamida] (pNIPAAm), alginato o gelatina

[Barbetta, 2005; Dickinson, 2009; Zhou, 2012a, 2012b, 2013; Miras, 2013a, 2013b; Oh, 2014], en emulsiones altamente concentradas. De esta manera, se pudo controlar la porosidad de materiales biopoliméricos. Además, algunos de estos polímeros, al poseer cierta anfifilidad en determinadas condiciones, pueden estabilizar la interfase de la emulsión, haciendo innecesaria la adición de tensioactivo.

Este tipo de métodos de obtención de materiales macroporosos, basados tanto en emulsiones de tipo W/O como en O/W, se les conoce como métodos de una etapa [Esquena, 2006], representados de forma esquemática en la Figura 1.17. Se produce el proceso de polimerización o entrecruzamiento en la fase continua de las emulsiones, seguido de la eliminación de la fase dispersa y secado del material para obtener la espuma porosa orgánica.

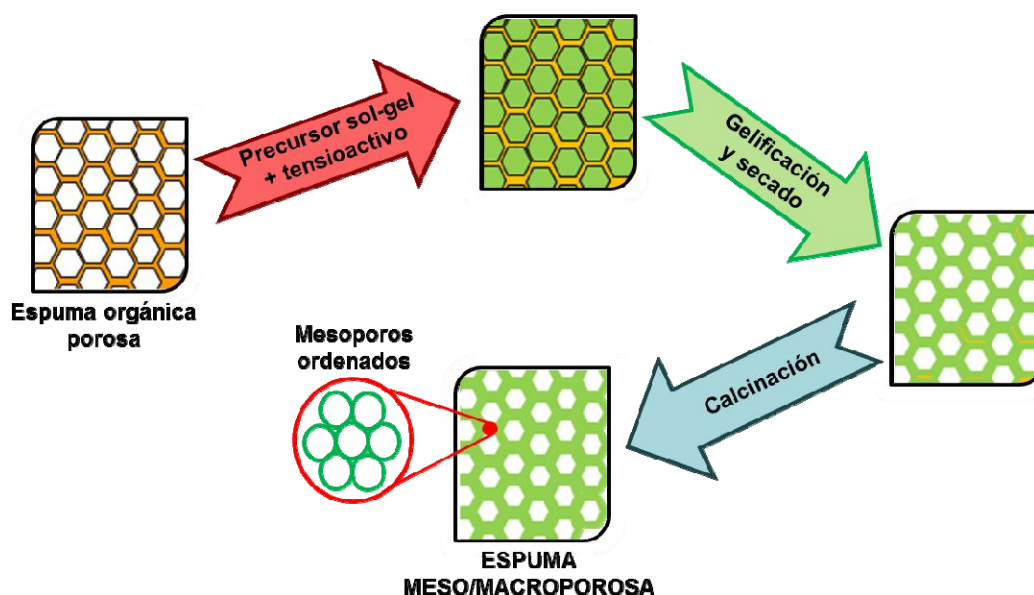


**Figura 1.17** Representación esquemática del proceso de obtención de materiales macroporosos con monómeros/polímeros hidrófobos o hidrófilos, a partir de emulsiones de tipo W/O o O/W, respectivamente.

Generalmente, los procesos de obtención de estos materiales conllevan la utilización de etapas de emulsificación por métodos de alta energía, obteniéndose materiales macroporosos y polidispersos. No obstante, como se comentó en el apartado 1.2.2.2, la utilización de métodos de baja energía como el método PIT permite obtener emulsiones de menor tamaño de gota y menor polidispersidad. A partir de este método de

emulsificación, es posible obtener materiales macroporosos de menor tamaño de poro y porosidad más uniforme [Esquena, 2006].

En los últimos años, se ha centrado el interés en la obtención de diversos materiales con porosidad dual. A partir de un material macroporoso orgánico, generalmente poliestireno, obtenido de una emulsión W/O, éste puede ser utilizado como plantilla y soporte para la preparación de materiales duales meso/macroporosos o, en determinadas condiciones, materiales micro/meso/macroporosos [Maekawa, 2003; Carn, 2004; Blin, 2006; Du, 2010; Santamaria, 2012; May-Masnou, 2013; Santamaria, 2014]. Este tipo de procesos se les conoce como procesos de dos etapas ya que la plantilla es una espuma sólida macroporosa previamente preparada [Esquena, 2006], mostrado de forma esquemática en la Figura 1.18. Dicho proceso implica la utilización de un tensioactivo para la obtención de la mesoestructura del material. El tensioactivo, junto a un precursor sol-gel inorgánico, se incorpora en solución a la plantilla macroporosa orgánica utilizada como soporte. Tras el proceso de gelificación y secado del material, se elimina la espuma orgánica utilizada como plantilla, generalmente por calcinación. De esta manera se obtiene un material dual meso/macroporoso producido por un efecto de doble plantilla: de la espuma macroporosa inicial y de la estructura mesoporosa formada por el tensioactivo.



**Figura 1.18** Representación esquemática del proceso de obtención de materiales meso/macroporosos a partir de materiales macroporosos orgánicos utilizados como plantilla.

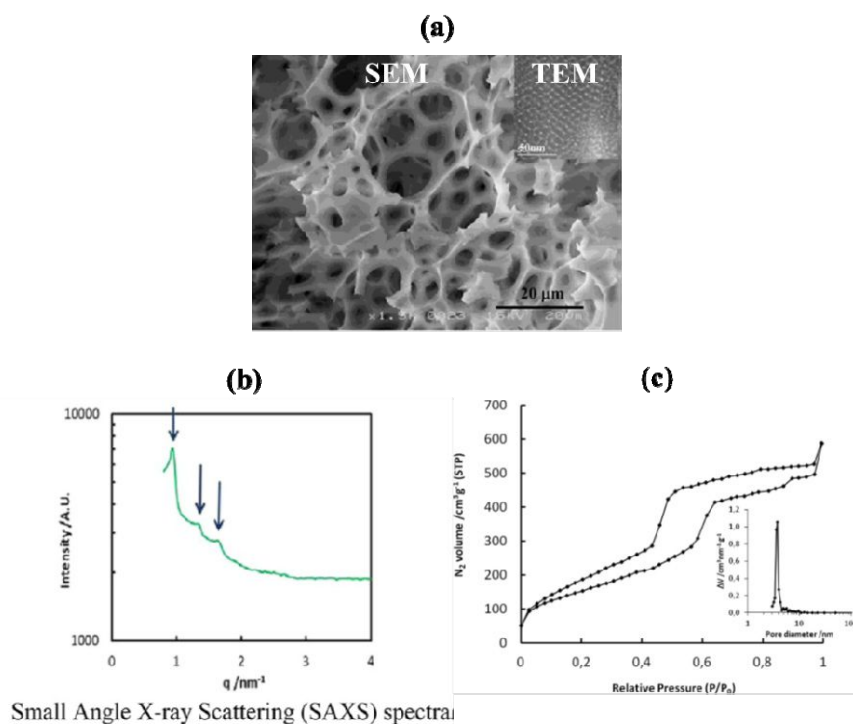
Estos sistemas duales presentan ciertas ventajas: poseen altos valores de superficie específica debido a la presencia de mesoporos y una gran capacidad de difusión de moléculas a través del material por la presencia de macroporos. La presencia de macroporos es importante sobretodo en procesos de difusión de moléculas de alto peso molecular, como polímeros o biomoléculas, donde las velocidades de difusión son bajas. Debido a esta naturaleza dual, estos materiales presentan un gran interés. No obstante, los procesos involucrados en la obtención de materiales meso/macroporosos pueden requerir numerosas etapas, que implican un periodo de tiempo demasiado prolongado para la obtención de dichos materiales en determinadas aplicaciones industriales. Diversos autores [Blin, 2007; Esquena, 2012; Nestor, 2013] han descrito la preparación de este tipo de materiales inorgánicos con porosidad dual mediante procesos de una sola etapa. Ello conlleva la utilización de emulsiones altamente concentradas con fase externa de cristal líquido, realizando el proceso sol-gel igualmente en la fase externa de la emulsión. De esta manera, se obtienen materiales duales meso/macroporosos utilizando como plantilla las gotas de la emulsión y la mesoestructura formada por el tensioactivo en fase de cristal líquido.

Otra opción para obtener materiales macroporosos con sistemas tensioactivos es la utilización de espumas. Por ejemplo, se ha descrito la utilización de CO<sub>2</sub> en condiciones supercríticas o gases como aire, nitrógeno o argón para obtener la espuma [Butler, 2001, 2003a; Palocci, 2007; Quignard, 2008; Barbeta, 2010]. Las principales ventajas de este método de preparación son que no necesita la utilización de fases oleosas, que posteriormente pueden ser difíciles de eliminar, y que el escalado industrial es muy simple. Sin embargo, las espumas generalmente proporcionan tamaños de poro mucho mayores que con la utilización de emulsiones. Además, el control del tamaño de poro es más fácil al utilizar emulsiones.

El proceso de caracterización de este tipo de sistemas obtenidos mediante la utilización de emulsiones altamente concentradas implica el estudio de las diversas fases tensioactivas formadas por el sistema escogido y su identificación por microscopía óptica y dispersión de rayos X a ángulo pequeño. Los materiales macroporosos obtenidos suelen mostrar poros con diámetros superiores a 1  $\mu\text{m}$ , los cuales pueden ser caracterizados mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). La microscopía electrónica de transmisión (TEM) también puede proporcionar información sobre la



interconectividad entre macroporos mediante análisis de cortes transversales del material a caracterizar. La macroporosidad de estos materiales también puede ser caracterizada mediante intrusión de mercurio, proporcionando la distribución de poros correspondiente. En el caso de materiales meso/macroporosos, éstos se pueden caracterizar mediante TEM y SAXS para analizar e identificar el tipo de mesoestructura. Este tipo de materiales duales suelen presentar valores de superficie específica relativamente altos. Dichos valores se determinan mediante la técnica de adsorción/desorción de nitrógeno, que proporciona además otros parámetros característicos como el volumen total de poro, la distribución de tamaño de poro (< 300 nm) o el tamaño de poro medio. Como ejemplo, se muestran en la Figura 1.19 algunos resultados obtenidos para materiales duales meso/macroporosos obtenidos mediante un proceso de una etapa utilizando emulsiones altamente concentradas con fase externa de cristal líquido cúbico [Nestor, 2013].

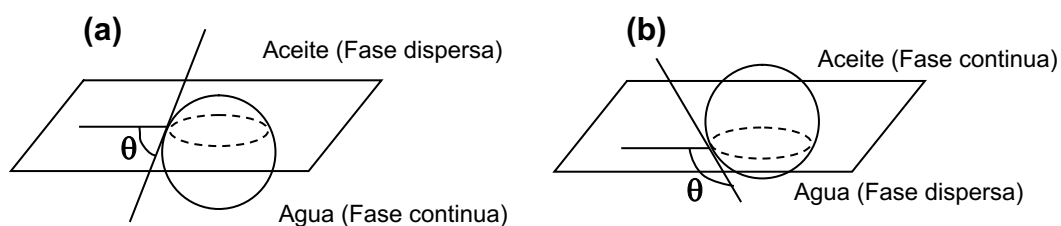


**Figura 1.19** Ejemplo de la caracterización de materiales meso/macroporosos obtenidos mediante un proceso de una etapa utilizando emulsiones altamente concentradas con fase externa de cristal líquido cúbico. Reproducido de [Nestor, 2013].

La caracterización mediante SEM (Figura 1.19 a) muestra la morfología característica de este tipo de sistemas con macroporos de relativa polidispersidad con una alta

interconectividad entre ellos. Debido al efecto plantilla producido por una fase de cristal líquido cúbico, se puede observar mediante TEM una estructura mesoporosa (Figura 1.19 a), la cual puede ser identificada mediante SAXS (Figura 1.19 b). Estas estructuras duales también se caracterizaron mediante adsorción/desorción de nitrógeno, para determinar los valores de superficie específica a partir de las isothermas y la distribución de tamaño de poro (Figura 1.19 c).

Gran parte de la literatura publicada sobre la obtención de materiales porosos a partir de emulsiones altamente concentradas se basa en la estabilización de dichas emulsiones mediante tensioactivos. Sin embargo, diversos autores mostraron la posibilidad de estabilizar emulsiones mediante la utilización de nanopartículas. Estas emulsiones son conocidas como emulsiones Pickering [Ramsden, 1903; Pickering, 1907]. Las nanopartículas deben tener un cierto carácter anfifílico para adsorberse en la interfase y estabilizar la emulsión. Se estableció que la fase en la que la partícula presentase mayor mojabilidad correspondería a la fase continua de una emulsión [Binks, 2002; Aveyard, 2003]. Por lo tanto, el ángulo de contacto ( $\theta$ ) entre la nanopartícula y la interfase aceite-agua de una emulsión permite predecir el tipo de emulsión formada. Nanopartículas que presenten ángulos de contacto inferiores a  $90^\circ$ , formarán emulsiones Pickering de tipo aceite en agua (Figura 1.20 a). Sin embargo, si el ángulo de contacto entre nanopartícula e interfase es superior a  $90^\circ$  darán lugar a emulsiones de tipo agua en aceite (Figura 1.20 b).



**Figura 1.20** Ángulo de contacto ( $\theta$ ) de nanopartículas utilizadas como estabilizantes en emulsiones (a) aceite en agua y (b) agua en aceite [Leal-Calderón, 2008].

Las nanopartículas utilizadas para la estabilización de este tipo de emulsiones pueden ser tanto de origen inorgánico (óxidos de hierro, silicio o titanio), como de origen orgánico (partículas de látex o microgeles), las cuales se adsorben en la interfase durante el proceso de emulsificación. Cuando la interfase no está completamente

cubierta, se produce un proceso de coalescencia parcial de las gotas de la emulsión, conocido como coalescencia limitada, hasta que toda la interfase queda cubierta por las partículas. De esta manera se crea una barrera física que genera que este tipo de emulsiones sean estables frente a coalescencia [Whitesides, 1995; Binks, 2001; Arditty, 2004; Leal-Calderón, 2008].

En los últimos años, los grupos de investigación de Dr. Schmitt [Arditty, 2003, 2004; Leal-Calderón, 2008; Destribats, 2012, 2013, 2014] y del Dr. Bismarck [Menner, 2007; Ikem, 2008, 2010; Wong, 2011; Vílchez, 2011; Zhou, 2012b; Wong, 2014; Vílchez, 2014] han publicado diversos trabajos en los que se describen la obtención de materiales en emulsiones Pickering. Las emulsiones Pickering presentan ciertas ventajas frente a la utilización de tensioactivos: no es necesario un proceso previo para la eliminación del tensioactivo, poseen mejores propiedades mecánicas y las partículas pueden ser funcionalizadas para conferir propiedades como magnetismo al material poroso y así, ampliar el abanico de aplicaciones. Sin embargo, este tipo de sistemas obtenidos mediante emulsiones Pickering presentan estructuras porosas de mayor diámetro y de poros cerrados. Este mayor diámetro es debido a que la incorporación de partículas no produce una reducción importante de la tensión interfacial. Además, la adsorción de las partículas sobre la interfase genera una barrera física que dificulta la interconexión entre poros. Estudios realizados en los últimos años han mostrado que la interconectividad entre poros puede incrementarse, mejorando la permeabilidad de este tipo de materiales, aunque es necesaria la incorporación de bajas concentraciones de tensioactivo [Wong, 2011; Vílchez, 2011, 2014].

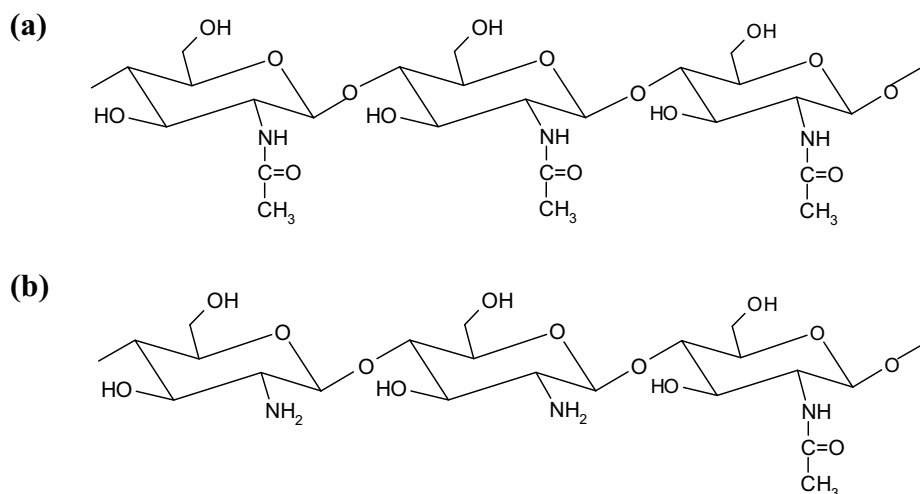
Los sistemas poliméricos obtenidos a partir de hidrogeles son ampliamente utilizados en diferentes campos: ingeniería química, biotecnología e industria farmacéutica [Peppas, 1999; Mi, 2001; de las Heras, 2005; Muzzarelli, 2007; Mano, 2008; Rinaudo, 2006, 2008]. Estos hidrogeles pueden presentar respuesta a estímulos externos como pH, temperatura, fuerza iónica o aplicación de un campo eléctrico [Brannon-Peppas, 1991; Lee, 1996; Gil, 2004; Rinaudo, 2006]. Como se comentó al inicio del apartado, la utilización de emulsiones altamente concentradas de tipo O/W como medios de reacción puede ser un método adecuado para la obtención de materiales porosos poliméricos, los cuales podrían ser sensibles a estímulos externos, en función del polímero utilizado. Por ello, la presente tesis se ha centrado en la obtención de este tipo de sistemas, utilizando

el biopolímero quitosano, un polímero con respuesta a cambios de pH, cuyo origen, principales características y aplicaciones se explican en mayor detalle en el siguiente apartado.

## 1.5 QUITOSANO: OBTENCIÓN, REACTIVIDAD, PROPIEDADES Y APLICACIONES

### 1.5.1 Aspectos generales

El quitosano es el polisacárido catiónico de origen natural más utilizado, obtenido a partir de la desacetilación de la quitina, principal componente del exoesqueleto de artrópodos (crustáceos e insectos) y de diversos hongos [Agulló, 2004; Rinaudo 2006]. Se trata además de un subproducto de varias industrias, como la pesquera [Agulló, 2004]. La quitina y el quitosano están formados por unidades de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina, unidas mediante enlaces  $\beta$  - [1 $\rightarrow$ 4]. Cuando el porcentaje de D-glucosamina es superior al 60 %, el producto es denominado quitosano [Rinaudo, 2006]. Las estructuras de la quitina y el quitosano se muestran en la Figura 1.21.



**Figura 1.21** Estructura de la quitina (a) y del quitosano (b).

El origen y el método de obtención determinan la longitud de las cadenas de ambos polímeros. Por este motivo, el grado de desacetilación, determinado por el porcentaje de grupos amino libres (-NH<sub>2</sub>), y el peso molecular son dos parámetros característicos del quitosano. Además, el grado de desacetilación está estrechamente vinculado con la

solubilidad del quitosano. Este polímero presenta un  $pK_a \sim 6,5$  [Rinaudo, 1999] y los grupos amino se protonan ( $-NH_3^+$ ) cuando el pH es inferior a dicho valor. Dicha protonación incrementa la hidrofiliidad del quitosano, siendo soluble en medio ácido [Claesson, 1992; Shahidi, 1999].

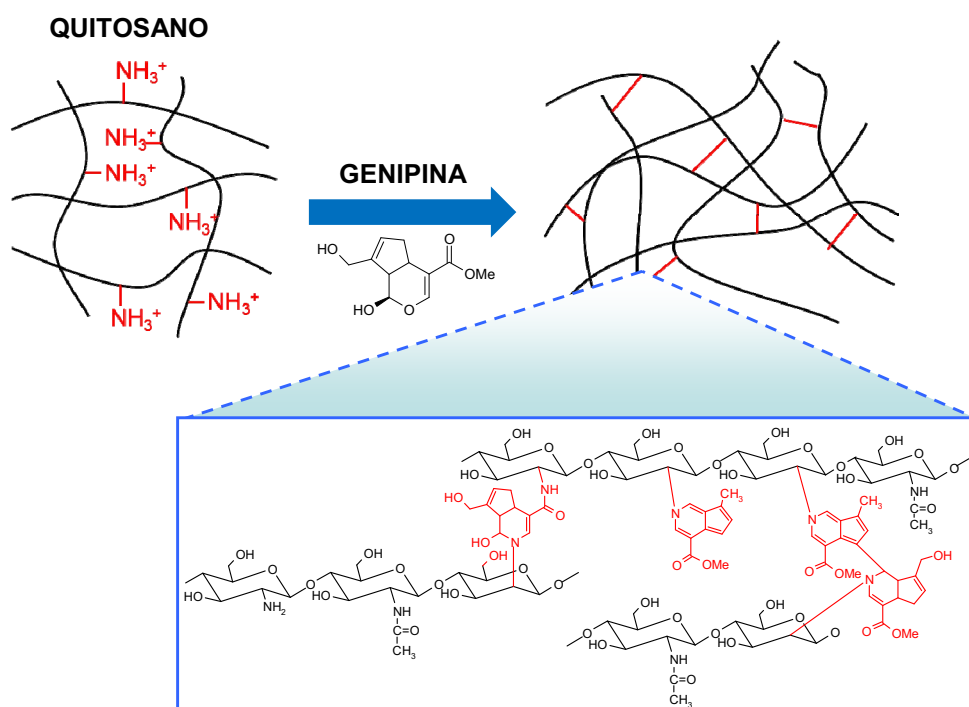
### 1.5.2 Aplicaciones del quitosano

Debido a las propiedades que presenta el quitosano, tales como no toxicidad, biodegradabilidad, biocompatibilidad, capacidad para formación de films y geles, propiedades de adsorción, hemostático, actividad antimicrobiana y antioxidante [Claesson, 1992; Furusaki, 1996; Rinaudo, 2006; Goycoolea, 2007; Rinaudo, 2008; Muzzarelli, 2012], se considera un polímero versátil. Éste se ha utilizado como polímero con respuesta a cambios externos de pH en diversas áreas, tales como agricultura, alimentación [González-Aguilar, 2009; Gómez-Estaca, 2010], como absorbente en el tratamiento de aguas residuales para la eliminación de colorantes y metales pesados [Guibal, 2004; Crini, 2008a; Azlan, 2009; Gupta, 2009; Srinivasan, 2010; Pratt, 2013], industria cosmética, farmacéutica y medicina [Boucard, 2007; Rinaudo, 2008; Fernandes, 2009; Harris, 2010; Ladet, 2011; Pastor, 2011; Zhou, 2011; Muzzarelli, 2012] y en diversas formas: membranas, films, hidrogeles, fibras o esponjas [Rinaudo, 2006]. Además, el quitosano es utilizado en la industria textil para modificar la superficie de las fibras textiles [Jocic, 2005a; Vílchez, 2008] y proporcionar nuevas propiedades como repulsión al agua, aceites o microorganismos [Nasr, 2009] o para su aplicación en apósitos como sistemas de liberación de principios activos [Gupta, 2010; Kulkarni, 2010].

### 1.5.3 Reactividad del quitosano

El quitosano presenta dos grupos funcionales, los grupos amino ( $-NH_2$ ) e hidroxilo ( $-OH$ ), a partir de los cuales pueden obtenerse diversos derivados como el carboximetilquitosano [Guo, 2007; Aranaz, 2010]. Además, a partir de dichos grupos funcionales, es posible obtener sistemas reticulados con diversos compuestos. La reticulación del quitosano es un método ampliamente utilizado para modificar las propiedades de un sistema, tales como la rigidez, mojabilidad y estabilidad [Remuñán-López, 1997; Berger, 2004; Yi, 2005; Stulzer, 2009; Vílchez, 2009]. Diversos

entrecruzantes pueden utilizarse para reaccionar con los grupos amino del quitosano, como glutaraldehído, formaldehído o compuestos epoxi [Chen, 2005; Yin, 2007]. No obstante, estos compuestos presentan toxicidad fisiológica. Por ello, en la presente tesis se ha utilizado un entrecruzante de origen natural llamado genipina (Figura 1.22), obtenido de los frutos de la *Gardenia jasminoides* ELLIS, que presenta una toxicidad entre 5000-10000 veces inferior al glutaraldehído [Nishi, 1995]. La genipina puede reaccionar con los grupos amino protonados ( $-\text{NH}_3^+$ ), entrecruzando las cadenas de quitosano, en condiciones ambientales y a un pH intermedio. Se propusieron dos mecanismos de reacción entre la genipina y el grupo amino del quitosano [Mi, 2000]: el grupo carboximetilo de la genipina puede reaccionar con el grupo amino para formar una amida secundaria o puede producirse un ataque nucleófilo de los grupos amino del quitosano en un carbón olefinico de la genipina produciéndose una abertura del anillo dihidropirano de la genipina en una etapa intermedia, dando lugar a la formación de una amida ternaria. Diversos autores [Mi, 2000; Butler, 2003b] también han sugerido que la genipina forma dímeros y trímeros durante el proceso de entrecruzamiento. Este proceso se muestra de forma esquemática en la Figura 1.22, en la que se presentan diversas uniones entre cadenas de quitosano, representadas como líneas rojas, y la estructura química de la reacción de entrecruzamiento entre quitosano y genipina.



**Figura 1.22** Representación esquemática del proceso de entrecruzamiento del quitosano con la genipina (Adaptado de [Mi, 2000]).

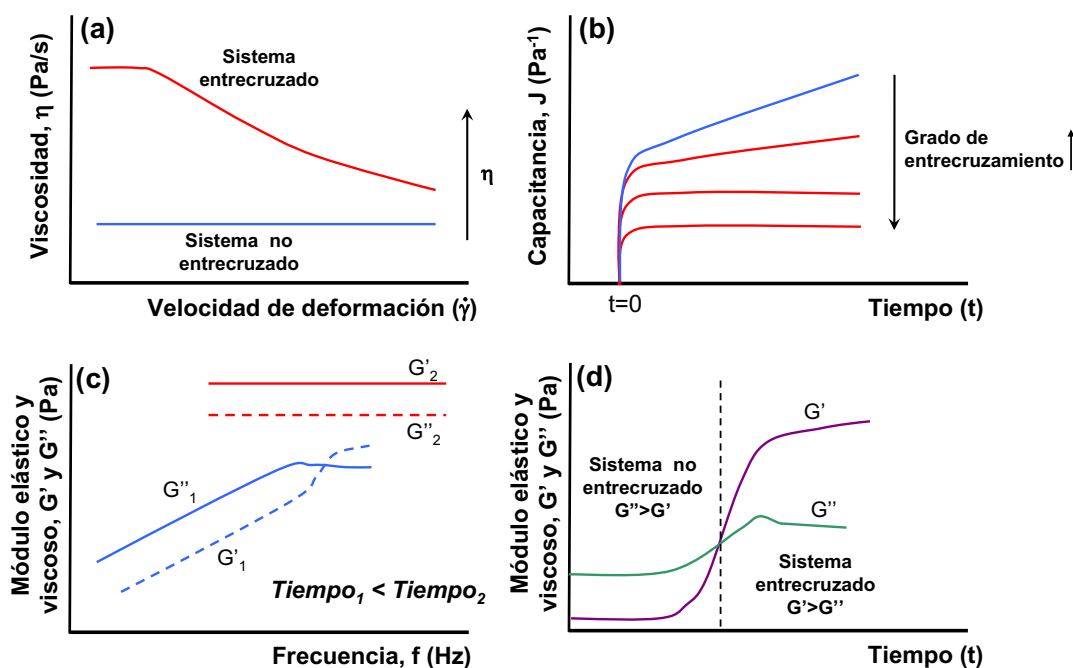
La formación de un sistema entrecruzado, ya sea con quitosano o con cualquier otro tipo de polímero como alginato o dextrano, es un proceso dependiente de las condiciones de reacción utilizadas, tales como la temperatura o concentración de entrecruzante que influirán en la cinética del proceso de entrecruzamiento. La cinética de estos procesos es de gran importancia en función de las aplicaciones que tenga el sistema entrecruzado utilizado, por ejemplo para aplicaciones médicas en procesos de entrecruzamiento *in situ* [Matricardi, 2008]. En la presente tesis, se ha utilizado la genipina como entrecruzante del quitosano presente en la fase continua de las emulsiones utilizadas como medios de reacción. Por ello, uno de los puntos principales ha sido la caracterización del proceso de entrecruzamiento y cómo este proceso modificaba las características estructurales de las emulsiones. Una de las técnicas más utilizadas para caracterizar el proceso de entrecruzamiento es la reología. Las medidas reológicas permiten caracterizar el proceso de entrecruzamiento modificando los diversos parámetros experimentales involucrados de una forma eficaz y reproducible. A continuación, se explicarán los diferentes procedimientos reológicos para caracterizar el proceso de entrecruzamiento de un sistema polimérico.

### *1.5.3.1 Caracterización mediante reología*

Diversos ensayos pueden ser realizados para estudiar el entrecruzamiento de un sistema y evaluar las diversas variables experimentales implicadas. Dichos ensayos se basan en el cambio de estructura interna de un sistema polimérico al producirse la unión de cadenas de polímero por la reacción con el entrecruzante. Este proceso produce un cambio de comportamiento en el sistema, de viscoso a viscoelástico o elástico, en función de las condiciones experimentales utilizadas, que es detectado mediante ensayos reológicos, caracterizando así el proceso de entrecruzamiento. Generalmente, este tipo de ensayos al ser procesos cinéticos, se realizan en función del tiempo y/o la temperatura.

Los ensayos reológicos de flujo, fluencia y oscilatorios, comentados con anterioridad en los apartados 1.3.2.1, 1.3.2.2 y 1.3.2.3, respectivamente, pueden ser aplicados en la caracterización de procesos de entrecruzamiento. Al producirse una evolución del comportamiento reológico de viscoso a viscoelástico o elástico, éste produce diversos

cambios en los valores de viscosidad, capacitancia y módulos elástico y viscoso como se muestra de forma esquemática en la Figura 1.23.



**Figura 1.23** Representación esquemática de los cambios en viscosidad, capacitancia y módulos elástico y viscoso, determinados en ensayos de flujo (a), fluencia (b) y oscilatorio (c y d), producidos por el proceso de entrecruzamiento.

En ensayos de flujo (Figura 1.23 a), la reestructuración interna de las cadenas poliméricas debido al proceso de entrecruzamiento da lugar a dos efectos principalmente: un incremento de la viscosidad y un cambio del comportamiento reológico del sistema. Como ejemplo se muestra la evolución de un sistema newtoniano no entrecruzado a un sistema pseudoplástico entrecruzado [Matricardi, 2008; Ma, 2010]. Los ensayos de fluencia también pueden ser utilizados para estudiar el entrecruzamiento de un polímero (Figura 1.23 b) mediante el análisis de la capacitancia o la deformación observada al aplicar un esfuerzo constante (Ecuación 1.24). El entrecruzamiento de un sistema produce una menor deformación a un mismo esfuerzo aplicado, que implica una reducción de la capacitancia en función del tiempo. Por último, los ensayos oscilatorios, mostrados como ejemplo en la Figura 1.23 c y d, son los más utilizados para la caracterización del proceso de entrecruzamiento de un sistema. A partir de la evolución de  $G'$  y  $G''$ , este tipo de ensayos permite cuantificar el tiempo en el cual se produce el cambio de comportamiento viscoso ( $G' < G''$ ) a viscoelástico o elástico ( $G' > G''$ ), caracterizado por una inversión de los valores de ambos módulos y conocido como



tiempo de gelificación [Butler, 2003b; Moura, 2007; Matricardi, 2008; Ma, 2010; Testouri, 2010; Bonino, 2011; Miras, 2013b].

Como se comentó anteriormente, la presente tesis se ha centrado en la obtención de espumas de quitosano, al incorporar dicho polímero en la fase externa de emulsiones altamente concentradas, las cuales se han utilizado como medios de reacción al producirse el entrecruzamiento del quitosano con la genipina.

### *1.5.3.2 Obtención de materiales porosos biopoliméricos mediante la utilización de emulsiones como medios de reacción*

El quitosano se ha utilizado en las últimas décadas como un polímero con respuesta a cambios de pH en diversas formas, tales como films, hidrogeles o fibras para cubrir un amplio rango de aplicaciones [Rinaudo, 2006, 2008; Zhou, 2011]. Sin embargo, en el caso de los hidrogeles, no se han descrito en la literatura de forma extensa procedimientos para la preparación de materiales porosos, con volúmenes de poro elevados y con porosidad y distribuciones de poro controladas. En este sentido, la utilización de emulsiones altamente concentradas como medios de reacción podría ser un método apropiado para la preparación de materiales porosos con una estructura porosa controlada. Dicha técnica permitiría combinar las ventajas de algunos hidrogeles (por ejemplo, propiedades de respuesta a cambios externos de pH, como el quitosano) con la capacidad de proporcionar un control de la porosidad al utilizar emulsiones como medios de reacción. Ambas características permitirían controlar las capacidades de adsorción de este tipo de sistemas en función de la aplicación requerida.

Se han utilizado emulsiones altamente concentradas en la preparación de materiales poliméricos porosos de origen natural (biopolímeros) utilizando emulsiones de tipo CO<sub>2</sub> supercrítico en agua. Mediante esta técnica se han podido obtener espumas de alginato, polivinil alcohol (PVA), quitosano o gelatina a través de procesos de quelación con calcio o procesos de entrecruzamiento con polietilenglicol (PEG), glutaraldehído o (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)) carbodiimida o EDC, respectivamente [Partap, 2006; Lee, 2007; Barbeta, 2010; Dehghani, 2011]. Este tipo de sistemas permite obtener distribuciones de poro estrechas. Sin embargo, es difícil obtener tamaños de poro inferiores a 2  $\mu\text{m}$ , probablemente debido a la presencia de una interfase gas-líquido.

Además, estos sistemas tienden a presentar procesos de desestabilización producidos por la diferencia de densidades entre ambas fases. Por ello, este tipo de sistemas es principalmente utilizado para la obtención de materiales porosos en procesos de entrecruzamiento con una cinética de reacción rápida, para evitar estos procesos de desestabilización [Dehghani, 2011].

En los últimos años, también se han obtenido materiales porosos biopoliméricos a partir de congelación y liofilización directa de emulsiones concentradas o altamente concentradas. Una vez la emulsión ha sido preparada, ésta es congelada rápidamente en nitrógeno líquido para mantener su estructura inicial. Principalmente, este método ha sido utilizado en la obtención de soportes porosos para aplicaciones farmacéuticas o de ingeniería de tejidos. Es el caso de copolímeros de ácido láctico y glicólico (PLGA), polímeros de  $\epsilon$ -caprolactama, carboximetilcelulosa sódica (SCMC) o polivinil alcohol [Baker, 2009; Qian, 2009, 2013]. No obstante, este tipo de procesos no permite preparar grandes volúmenes, debido a que la congelación de la emulsión no sería homogénea y rápida. Este inconveniente dificultaría la producción a mayor escala de este tipo de sistemas.

A partir de las diferentes opciones para la preparación de materiales porosos, se decidió que el uso de emulsiones altamente concentradas de tipo aceite en agua (O/W) era el idóneo para la obtención de materiales porosos en un amplio rango de tamaños de poro, desde mesoporos a macroporos. Por esta razón, el presente trabajo se ha centrado en la utilización de emulsiones altamente concentradas para la preparación de materiales porosos de quitosano, tras realizar un proceso de entrecruzamiento del quitosano y la eliminación de la fase dispersa de las emulsiones.



*Capítulo 2*

# **Objetivos y Plan de trabajo**



## 2.1 OBJETIVOS

La gran diversidad de trabajos de investigación sobre síntesis de materiales porosos refleja un interés creciente en la obtención de materiales porosos, utilizando emulsiones altamente concentradas como medios de reacción. La utilización de este tipo de sistemas permite la obtención de materiales, orgánicos o inorgánicos, de elevada porosidad y baja densidad, tanto macroporosos como con porosidad dual, meso/macroporosos. Además, las emulsiones altamente concentradas presentan las ventajas, respecto a las espumas, que permiten obtener materiales macroporosos de poros más pequeños, interconectados y con una distribución de poro controlada. Debido a ello, la utilización de emulsiones se ha extendido en la síntesis de materiales de origen natural, ampliando sus posibles aplicaciones.

El quitosano es un polisacárido catiónico de origen natural, que posee diversas propiedades muy interesantes, tales como no toxicidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad y actividad antimicrobiana. Éstas, junto con la capacidad de formación de films y geles, han hecho que sea un polímero ampliamente utilizado en la preparación de gran variedad de materiales. No obstante, la obtención de materiales porosos de quitosano en emulsiones ha sido muy poco estudiada. Por ello, la presente tesis se ha desarrollado con el **objetivo principal** de:

**Estudiar el uso de emulsiones altamente concentradas como medios de reacción en la obtención de espumas de quitosano mediante métodos de una sola etapa, caracterizando las propiedades de los materiales obtenidos y evaluando sus posibles aplicaciones.**

La obtención de dicho objetivo principal implica los siguientes **objetivos parciales**:

- Seleccionar el sistema tensioactivo, estudiando el comportamiento fásico de diversos sistemas tensioactivos y caracterizando los autoagregados tensioactivos formados.
- Obtener emulsiones altamente concentradas de tipo aceite en agua (O/W) en presencia de quitosano en la fase externa.

- Estudiar la estabilidad de las emulsiones, determinando los posibles mecanismos de desestabilización y la influencia de los componentes de la fase acuosa en la estabilidad cinética y la distribución de tamaño de gota de dichas emulsiones.
- Obtener y caracterizar las espumas de quitosano para determinar la influencia de los diversos parámetros involucrados en sus propiedades estructurales.
- Preparar y caracterizar nanofilms de quitosano entrecruzados como sistema modelo para el estudio de la respuesta al pH de las espumas de quitosano.
- Estudiar la potencial aplicación de las espumas de quitosano en la eliminación de colorantes.

## 2.2 PLAN DE TRABAJO

Para llevar a cabo los objetivos anteriormente mencionados se desarrolló el siguiente **plan de trabajo**:

1. Realización de los diagramas de fases de sistemas ternarios tipo Fase acuosa / Tensioactivo no iónico / Fase oleosa, y determinar el tensioactivo no iónico más adecuado para su utilización en la preparación de las espumas de quitosano. Para ello, se caracterizaron dichos sistemas mediante su observación visual (aspecto, viscosidad, birrefringencia, etc.) y SAXS (dispersión de rayos X a ángulo pequeño).
2. Preparación de emulsiones altamente concentradas mediante métodos de alta energía con un dispositivo de agitación de palas, en ausencia y presencia de quitosano. Las emulsiones se prepararon a diferentes velocidades de agitación (700, 900 y 1200 rpm) o a diferente concentración de tensioactivo (2 y 9 %), utilizando dichas emulsiones como medios de reacción.
3. Selección de las condiciones experimentales a través de un estudio preliminar de la estabilidad cinética de las emulsiones y de la cinética del proceso de entrecruzamiento mediante microscopía óptica, tensión interfacial y reología.
4. Estudio de la influencia de la composición de la fase continua de las emulsiones y las condiciones experimentales del proceso de emulsificación en la estabilidad de dichas emulsiones. Este estudio se realizó mediante las técnicas de microscopía óptica, SAXS y reología. Se determinó qué parámetros eran estadísticamente

significativos en el diámetro de gota a través del análisis de los resultados mediante el software STATA<sup>®</sup>.

5. Estudio de la influencia de las propiedades de las emulsiones, utilizadas como medios de reacción, en las características finales de las espumas de quitosano: morfología, superficie específica, volumen y tamaño de poro mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y obtención de las isothermas de adsorción/desorción de nitrógeno.
6. Evaluación de la respuesta al pH y del grado de entrecruzamiento de films de quitosano entrecruzados mediante la caracterización de su mojabilidad e hinchamiento en función del pH a través de ángulo de contacto dinámico, microbalanza de cuarzo con determinación de la disipación (QCM-D) y microscopía de fuerza atómica (AFM).
7. Estudio de la respuesta al pH de las espumas de quitosano al determinar la cinética de adsorción/desorción de colorantes y su capacidad máxima de adsorción mediante espectroscopía UV-Vis.





*Capítulo 3*  
**Experimental**

---



A continuación se presentan los apartados de materiales, aparatos e instrumental y métodos y técnicas experimentales utilizados en la presente tesis.

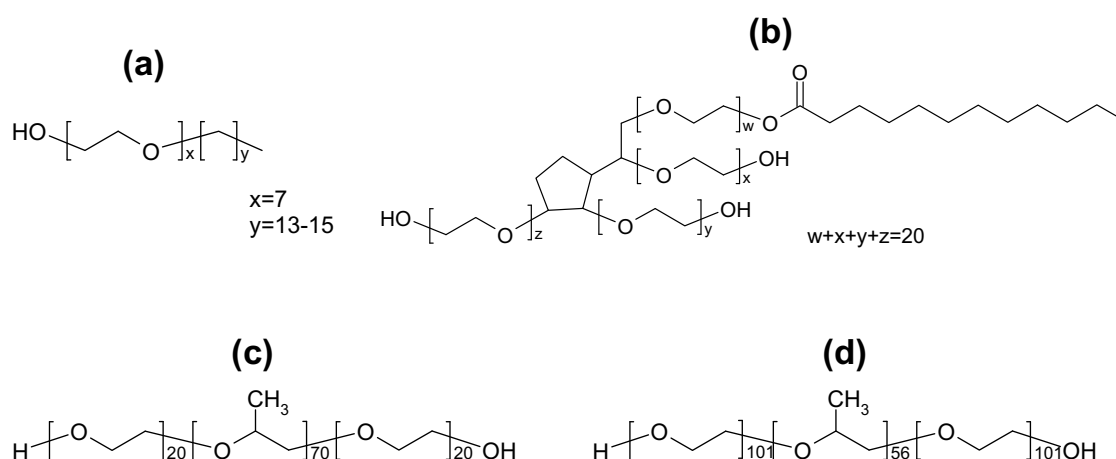
### 3.1 MATERIALES

La sección de materiales se ha dividido en cuatro subapartados: tensioactivos, fase oleosa, fase acuosa y otros productos y materiales.

#### 3.1.1 Tensioactivos

Se utilizaron cuatro tensioactivos no iónicos, todos ellos de grado comercial:

- Synperonic A7 (C<sub>13-15</sub>EO<sub>7</sub>). Tensioactivo etoxilado compuesto de 13 a 15 cadenas alquílicas y 7 cadenas de óxido de etileno (Figura 3.1 a), con HLB de 12,2 suministrado por Uniqema.
- Tween 20. Tensioactivo etoxilado de tipo éster de sorbitol, conocido también como polisorbato 20 o monooleato de polioxitileno sorbitan (Figura 3.1 b), con HLB de 16,7 suministrado por Sigma-Aldrich. Posee un grado de etoxilación de 20 unidades de óxido de etileno.
- Pluronic<sup>®</sup> F127 y P123. Dos tensioactivos de tipo copolímero de tribloque, compuestos por unidades de etilenglicol (EO) y propilenglicol (PO) (Figura 3.1 c y d), EO<sub>97</sub>PO<sub>69</sub>EO<sub>97</sub> correspondiente al F127 (HLB=22) y EO<sub>20</sub>PO<sub>70</sub>EO<sub>20</sub> para el P123 (HLB=7-12). Ambos tensioactivos fueron suministrados por BASF.



**Figura 3.1** Fórmulas de los tensioactivos utilizados: (a) Synperonic A7, (b) Tween 20, (c) Pluronic<sup>®</sup> P123, (d) Pluronic<sup>®</sup> F127.

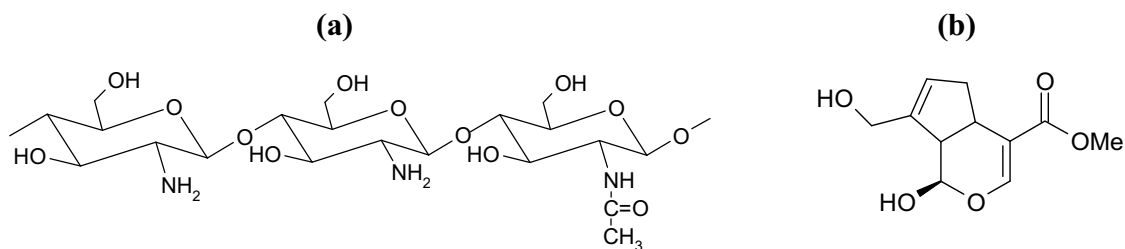
### 3.1.2 Fase oleosa

El componente oleoso utilizado fue decano ( $C_{10}H_{22}$ , con un pureza  $\geq 94$  %), suministrado por Merck.

### 3.1.3 Fase acuosa

La fase acuosa estaba compuesta por el biopolímero quitosano, solución reguladora de fosfatos pH=7,4, genipina y ácido acético glacial:

- Quitosano (Medium Molecular Weight, MMW), cuya molécula se muestra en la Figura 3.2a, con un peso molecular de  $M_w \approx 300$  kDa y con un grado de desacetilación del 85 %, suministrado por Sigma-Aldrich.
- Genipina (Figura 3.2b) con un peso molecular de 226 g/mol, suministrada por Challenge Bioproducts Co. (Taiwan). Se utilizó como entrecruzante.
- Solución reguladora de fosfatos a pH = 7,4 ( $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O / KH_2PO_4$ ):
  - $[Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O] = 11,875$  g/L
  - $[KH_2PO_4] = 9,078$  g/L.
- Ácido acético glacial ( $CH_3COOH$ ,  $\geq 99,5$  %) de Panreac.

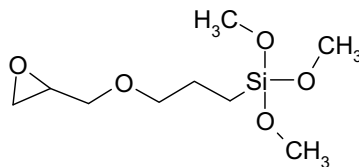


**Figura 3.2** Molécula de quitosano (a) y genipina (b).

Se utilizaron soluciones de quitosano del 1 y 2 % (p/v), disueltas en ácido acético al 1%vol, y soluciones de genipina del 1 o 1,4 % (p/p), disueltas en solución reguladora de fosfatos a pH = 7,4.

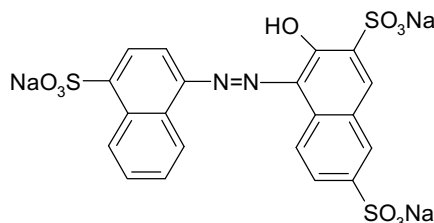
### 3.1.4 Otros productos utilizados

- [3-(2,3-epoxipropoxi)-propil]-trimetoxisilano (Figura 3.3), con una pureza  $\geq 97\%$  y suministrado por Merck.



**Figura 3.3** Molécula del [3-(2,3-epoxipropoxi)-propil]-trimetoxisilano.

- Líquido limpiador concentrado Hellmanex<sup>®</sup> III de Hellma Analytics.
- Obleas de silicio (Si) con orientación (100) suministradas por MEMC Electronics Materials SpA (Italia).
- Etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH,  $\geq 99,5\%$ ) suministrado por Panreac.
- Acetona (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O,  $\geq 99,9\%$ ) de VWR.
- Colorante Amaranth o rojo ácido 27 (acid red 27, índice de color (CI) 16185), C<sub>20</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>10</sub>S<sub>3</sub>. Colorante ácido purificado suministrado por la empresa Sigma (Figura 3.4), con un peso molecular de 604,48 g/mol y con una longitud de onda de máxima absorción a  $\lambda_{\max} = 521$  nm.















**Figura 3.4** Molécula del colorante rojo ácido 27.

- Solución reguladora de pH (Davies) [Davies, 1959], compuesta por ácido cítrico monohidrato (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O), dihidrógenofosfato potásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), tetraborato de sodio decahidratado (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O), tris(hidroximetil)aminometano (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>) y cloruro potásico (KCl) los cuales se mezclan en diferentes proporciones con ácido clorhídrico (HCl 0,4M) o hidróxido sódico (NaOH 0,4M) para obtener soluciones en un rango de pH entre 2 y 12.
- Agua desionizada filtrada (Ultra-pure Millipore water system, Milli-Q<sub>plus</sub> 185 filter).


### 3.2 APARATOS E INSTRUMENTAL



Los equipos e instrumental utilizados se enumeran a continuación, con una breve descripción y fotografía de los mismos.

Equipo	Descripción y fotografía
<b>Balanzas</b>	<p>Balanza analítica Mettler Toledo AB204-S/FACT con precisión de <math>\pm 10^{-4}</math> g (capacidad máxima 220 g). </p> <p>Balanza granataria Sartorius CPA3202-S con precisión de <math>\pm 10^{-2}</math> g (capacidad máxima 3000 g). </p>
<b>Baño termostatzado con criostato</b>	<p>Termostato Haake DC10 con una precisión de 0,01 °C y un rango de trabajo de -30 a 100 °C, acoplado a una cubeta de policarbonato. </p> <p>Criostato Haake EK20, con una capacidad de enfriamiento de hasta -20 °C. </p>
<b>Centrífuga</b>	<p>Eppendorf modelo 5804R, velocidad máxima de 5000 rpm con una temperatura máxima de trabajo de 40 °C. </p>
<b>Placa agitadora y calefactora</b>	<p>Heidolph modelo MR Hei-Standard, con control de temperatura mediante una sonda Heidolph EKT3001. Capacidad de agitación máxima 2500 rpm. </p>

<p><b><i>Agitador de palas</i></b></p>	<p>Heidolph RZR 2041, con un rango de velocidades de 40 a 2000 rpm, acoplado a una varilla de palas tipo hélice de 4 cm de diámetro.</p>	
<p><b><i>Microscopio óptico</i></b></p>	<p>Olympus modelo BX51TRF-6. Permite la observación de muestras en reflexión y transmisión y puede trabajar en campo claro, campo oscuro, contraste de fases, contraste interferencial, polarización y fluorescencia. Está acoplado a una cámara digital Olympus DP73 controlada a través de un software de captura de imágenes/videos, Stream Essentials de Olympus.</p>	
<p><b><i>Microscopio confocal espectral*</i></b></p>	<p>Leica TCS-SP5. Se utiliza como microscopio de alta resolución, controlado a través del software Leica LAS AF Lite.</p>	
<p><b><i>Espectrómetro de difracción de luz láser</i></b></p>	<p>Malvern Instruments modelo Mastersizer 2000, equipado con unidad de dispersión Hydro 2000G (Malvern Instruments) y láseres de luz roja y azul de 640 y 466 nm, respectivamente, con un campo de medida de 0,1 a 1000 <math>\mu\text{m}</math>.</p>	
<p><b><i>Espectrómetro de rayos X a ángulo pequeño (SAXS)</i></b></p>	<p>HECUS modelo S3 (Hecus X-ray Systems GmbH), equipado con bomba de vacío y control de temperatura. Opera a una potencia de radiación de 50 kV y 1 mA.</p>	
<p><b><i>Tensiómetro de volumen de gota</i></b></p>	<p>Micrómetro Hormuta-Vetter acoplado a una jeringa calibrada Hamilton de 1 mL.</p>	



<p><b>Reómetro</b></p>	<p>AR-G2 de esfuerzo controlado (TA Instruments). Para evitar la evaporación de la muestra, se utiliza una geometría con trampa para disolventes.</p>	
<p><b>Batería de mantas calefactoras</b></p>	<p>Modelo 6014206, de Selecta. Para extracción sólido-líquido de tipo Soxhlet.</p>	
<p><b>Liofilizadora</b></p>	<p>Christ Alpha 2-4 LD Plus, con presión y temperatura de trabajo de ~0,03 mbar y -85 °C, respectivamente.</p>	
<p><b>Equipo de fluidos supercrítico (SCF)</b></p>	<p>Planta para el secado supercrítico con CO<sub>2</sub> con un reactor de 300 mL, acoplado a una bomba de vacío MiltonRoy mod D. Ensayos realizados en MATGAS (Cerdanyola del Vallès).</p>	
<p><b>Goniómetro**</b></p>	<p>PG-X+ (FIBRO system ab, Suecia). Permite determinar ángulo de contacto y volumen de gota de manera continua a través de una videocámara controlada mediante software (PG v.2.0).</p>	
<p><b>Microbalanza de cristal de cuarzo (QCM)**</b></p>	<p>QCM-D E4 suministrado por Q-Sense (Suecia). Las muestras se preparan sobre discos de silicio de 1 cm de diámetro.</p>	

<p><b>Microscopio de fuerza atómica (AFM)**</b></p>	<p>Modelo Multimode Nanoscope III (Bruker). Se utilizaron puntas de nitruro de silicio (<math>\text{Si}_3\text{N}_4</math>) de forma triangular (Scanasyt-Fluid+, Bruker), con una constante elástica nominal de 0,7 N/m y una frecuencia de resonancia de 150 kHz.</p>	
<p><b>Microscopios electrónicos de rastreo (SEM)*</b></p>	<p>Se utilizaron dos microscopios SEM de tipo field emission: (a) Hitachi 4100 y (b) Jeol JSM-7100F. Las muestras se recubrieron con carbón para su observación y éstas fueron realizadas a 15 kV.</p>	
<p><b>Equipo de adsorción / desorción de nitrógeno</b></p>	<p>Autosorb-iQ de Quantachrome. El proceso de desgasificación de las muestras se realizó a 55°C durante 12 h.</p>	
<p><b>Picnómetro de helio*</b></p>	<p>AccuPyc 1330 de Micromeritics.</p>	
<p><b>Equipo de disolución</b></p>	<p>Vision Elite 8TM (Hanson Corp.). Consta de 8 posiciones de medida con un baño termostatzado. Equipo disponible en la Facultad de Farmacia de la UB.</p>	
<p><b>Espectrómetros UV-Vis</b></p>	<p>Epoch de BioTeK (Disponible en la Facultad de Farmacia, UB). Permite la medida simultánea de hasta 96 muestras. Medidas realizadas a <math>\lambda=521</math> nm.</p> <p>Variant Cary 300 UV-Vis. Se llevaron a cabo barridos de longitud de onda de 800 a 200 nm.</p>	 

\* Equipos disponibles en el SCT-UB.

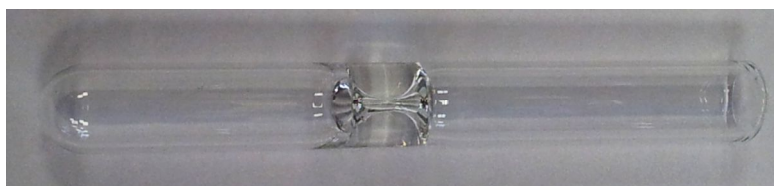
\*\* Dispositivos utilizados en el Real Instituto de Tecnología de Estocolmo (KTH).

### 3.3 MÉTODOS Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES

#### 3.3.1 Comportamiento fásico

Se realizó el estudio del comportamiento fásico de cuatro sistemas ternarios compuestos por Solución de quitosano 2% / Solución reguladora de pH (7,4) / Tensioactivo / Decano, utilizando los tensioactivos Synperonic A7, Tween 20, Pluronic<sup>®</sup> P123 y Pluronic<sup>®</sup> F127, mediante la elaboración de diagramas de fases. Para ello, según el sistema estudiado, se fijó un rango de concentraciones de decano entre 0 y 80 % y se varió el porcentaje de los componentes restantes para realizar el estudio entre 5 y 60 °C.

En este estudio se prepararon las muestras en tubos de constricción (Figura 3.5) para asegurar la mezcla de los componentes mediante centrifugación, debido a la alta viscosidad de algunas muestras. Los tubos fueron sellados a la llama y posteriormente congelados. Finalmente, las muestras se introdujeron en un baño termostatzado y se dejaron en reposo hasta alcanzar el equilibrio para realizar el estudio del diagrama ternario. Se considera que se ha obtenido el equilibrio de fases cuando se observa una o más fases transparentes separadas por interfases.

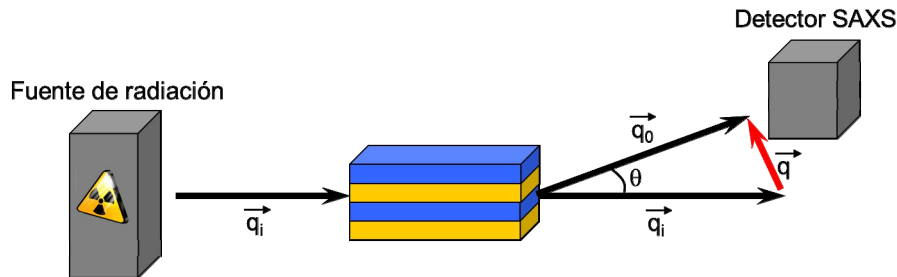


**Figura 3.5** Tubo de constricción utilizado para comportamiento fásico.

Las composiciones seleccionadas para el estudio de los diagramas de fases se observaron visualmente para analizar su transparencia, viscosidad, birrefringencia (propiedad característica de ciertas muestras que giran el ángulo de polarización de la luz, que produce la aparición de un cierto brillo de la muestra al observarla a través de polarizadores cruzados) y su evolución con el tiempo. Además, las muestras que presentaban un aspecto altamente viscoso fueron caracterizadas por dispersión de rayos X a ángulo pequeño (SAXS) para determinar la presencia y tipo de cristal líquido. Para su caracterización, estas muestras se prepararon en capilares de 1 mm de diámetro, sellados a la llama para evitar posibles evaporaciones y variaciones en la composición.

### 3.3.1.1 Dispersión de rayos X a ángulo pequeño (SAXS)

La técnica de SAXS es muy útil para la caracterización de estructuras de cristal líquido en sistemas tensioactivos. Dicha técnica consiste en hacer incidir radiación de rayos X sobre una muestra y estudiar la dispersión que provoca su estructura a ángulos de dispersión ( $\theta$ ) pequeños (Figura 3.6).

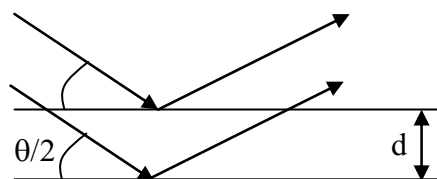


**Figura 3.6** Representación esquemática de la dispersión de rayos X a ángulo pequeño ( $\theta$ ) indicando el vector de dispersión  $\vec{q}$ , el ángulo de dispersión ( $\theta$ ) y el vector de difracción  $\vec{q}_0$ .

Los cristales líquidos presentan planos de simetría y cuando la distancia entre ellos es del orden de la longitud de onda de la radiación,  $\lambda$ , se produce una interferencia constructiva del haz dispersado para determinados ángulos, produciendo la aparición de picos de difracción. A partir de estos picos de difracción y de la ley de Bragg (Ecuación 3.1), se obtiene la distancia entre planos,  $d$  (Figura 3.7) [Lindner, 1991].

$$n\lambda = 2d \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad \text{Ecuación 3.1}$$

donde  $n$  es un número entero,  $\lambda$  la longitud de onda y  $d$  la distancia entre planos o distancia de Bragg.



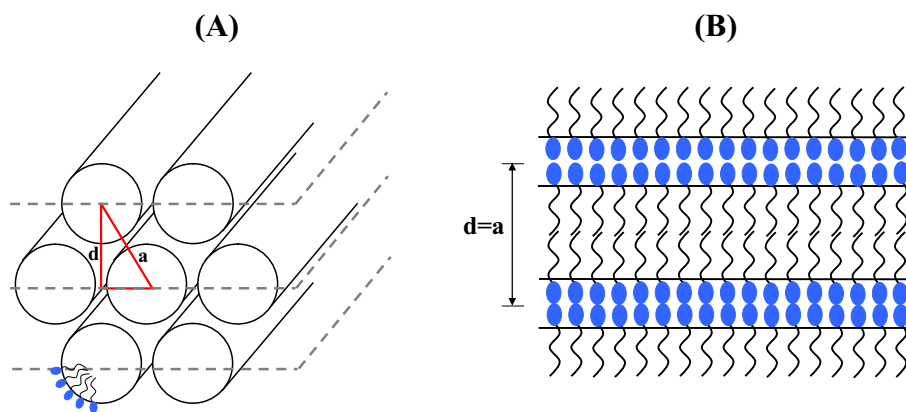
**Figura 3.7** Esquema de la reflexión de la radiación entre planos de simetría y enunciado de la ley de Bragg de la difracción.

A partir de la relación de la distancia entre planos,  $d$ , de la ley de Bragg (Ecuación 3.1) y del módulo del vector de dispersión,  $q$  (Ecuación 3.2), se obtiene una nueva ecuación (Ecuación 3.3) que proporciona el valor de la distancia de Bragg.

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\theta/2) \quad \text{Ecuación 3.2}$$

$$d = \frac{2\pi}{q} \quad \text{Ecuación 3.3}$$

Estas ecuaciones muestran que la distancia entre planos es inversamente proporcional al ángulo de dispersión. En cristales líquidos, los planos de simetría se encuentran a distancias relativamente largas, y por lo tanto, dispersan a ángulos pequeños,  $\theta < 8^\circ$ . Por ello, las fases de cristal líquido se caracterizaron mediante SAXS. A ángulos superiores, esta técnica se denomina WAXS (*Wide Angle X-ray Scattering* o dispersión de rayos X a ángulo grande) y proporciona información sobre distancias más cortas. A partir de la secuencia de los picos de difracción obtenidos mediante SAXS, característicos para cada tipo de cristal líquido, se obtiene la distancia entre planos. Por ejemplo, cristales líquidos laminares presentan una secuencia 1:2:3, mientras que cristales líquidos hexagonales presentan una secuencia  $1:\sqrt{3}:\sqrt{4}:\sqrt{7}$  [Larsson, 1976]. La Figura 3.8 muestra de forma esquemática la morfología de un cristal líquido laminar (a) y un cristal líquido hexagonal (b), mostrando la distancia entre planos ( $d$ ). A partir de la distancia entre planos, se obtiene la distancia de repetición ( $a$ ) que por razones geométricas coincide en cristales líquidos laminares ( $a = d$ ) pero no en hexagonales ( $a = 2d/\sqrt{3}$ ).



**Figura 3.8** Esquemas de un cristal líquido hexagonal (A) y un cristal líquido laminar (B), indicando las correspondientes distancia entre planos ( $d$ ) y distancia de repetición ( $a$ ).

El equipo utilizado para las medidas de SAXS (HECUS, modelo S3) fue un espectrómetro con fuente de radiación monocromática producida por un ánodo de Cu ( $\lambda = 1,542$  nm), en el que el haz dispersado ( $\theta = 0.2 - 8^\circ$  para este equipo) es recogido en un

detector PSD, detector sensible a la posición del haz (del inglés “*Position Sensing Detector*”).

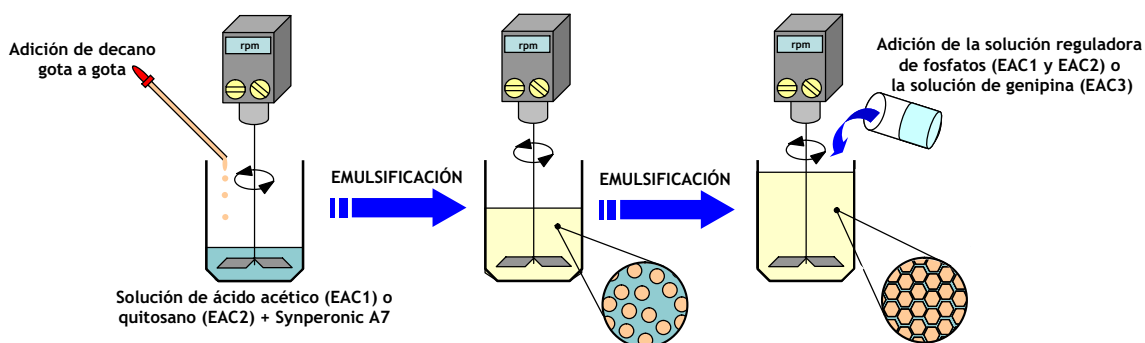
### 3.3.2 Preparación de emulsiones altamente concentradas

Se prepararon emulsiones altamente concentradas del tipo aceite en agua (O/W) con dos sistemas tensioactivos: Synperonic A7 (Tabla 3.1) y Pluronic<sup>®</sup> P123 (Tabla 3.2), manteniendo la relación fase dispersa:fase continua constante a 80:20 y obteniendo 150 g de emulsión por ensayo. En ambos casos, el proceso de emulsificación se realizó mediante un agitador mecánico (Heidolph RZR2041), acoplado a una varilla de palas de tipo hélice.

**Tabla 3.1** Composición (% p/p) de las emulsiones altamente concentradas utilizando Synperonic A7 como tensioactivo.

	Synperonic A7	Ácido acético 1%vol	Quitosano 2% (p/v)	Decano	Solución reguladora de fosfatos pH 7,4	Genipina 1% (p/p)
<b>EAC1</b>	2	9	-	80	9	-
<b>EAC2</b>	2	-	9	80	9	-
<b>EAC3</b>	2	-	9	80	-	9

En las emulsiones preparadas con el tensioactivo Synperonic A7 (Tabla 3.1) se estudiaron dos parámetros: la influencia de la velocidad de agitación en el proceso de emulsificación al preparar las tres composiciones (EAC1, EAC2 y EAC3) a 700, 900 y 1200 rpm y la influencia de la presencia de quitosano (EAC2). Dicho proceso de emulsificación se realizó a 25 °C y consistió en añadir inicialmente el tensioactivo con la solución de ácido acético (EAC1) o de quitosano (EAC2 y EAC3). A continuación, se incorporó el decano (fase dispersa) gota a gota y finalmente, se añadió la solución reguladora de fosfatos (EAC1 y EAC2) o la genipina disuelta en la solución reguladora de fosfatos (EAC3), como se muestra en la Figura 3.9.



**Figura 3.9** Esquema del proceso de obtención de las emulsiones altamente concentradas con el tensioactivo Synperonic A7.

Para las emulsiones obtenidas con el tensioactivo Pluronic® P123 (Tabla 3.2), se determinó la influencia de la concentración de tensioactivo al preparar emulsiones altamente concentradas al 2 y 9 % de tensioactivo. El sistema de preparación de las emulsiones altamente concentradas con el tensioactivo P123 difiere ligeramente al utilizado con el tensioactivo Synperonic A7. El tensioactivo P123 es sólido a temperatura ambiente, por ese motivo fue necesario fundirlo previamente. El proceso de emulsificación se inició con un 0,5 % de tensioactivo, al cual se incorporó la solución de ácido acético 1 %vol (9 % para EAC4 y 5,5 % para EAC7) o la solución de quitosano (9 % para EAC5 y EAC6 y 5,5 % para EAC8 y EAC9). El proceso de emulsificación para las composiciones estudiadas se realizó a una velocidad de agitación de 700 rpm.

**Tabla 3.2** Composición (% p/p) de las emulsiones altamente concentradas utilizando Pluronic® P123 como tensioactivo.

	Pluronic® P123	Ácido acético 1%vol	Quitosano 2% (p/v)	Decano	Solución reguladora de fosfatos pH 7,4	Genipina 1% (p/p)	Genipina 1,4% (p/p)
EAC4	2	9	-	80	9	-	-
EAC5	2	-	9	80	9	-	-
EAC6	2	-	9	80	-	9	-
EAC7	9	5,5	-	80	5,5	-	-
EAC8	9	-	5,5	80	5,5	-	-
EAC9	9	-	5,5	80	-	-	5,5

En la Figura 3.10 se muestra de forma esquemática el procedimiento utilizado para la preparación de emulsiones utilizando como tensioactivo el Pluronic<sup>®</sup> P123. El decano se incorporó gota a gota en dos etapas. Inicialmente, se añadió un 25-30 % de decano, respecto a la composición final de la emulsión. En este punto, la emulsión presentaba un aspecto elástico. A continuación, el proceso de emulsificación se diferenció entre los sistemas con una composición de un 2 o 9 % de P123 final, debido a la alta viscosidad en presencia de un 9 % de tensioactivo. En el caso del 2 % de P123, se añadió el tensioactivo hasta llegar al 2 % correspondiente. A continuación, se incorporó el resto de decano para finalmente, añadir la solución reguladora de fosfatos (EAC4 y EAC5) o la solución de genipina 1 % (EAC6). Sin embargo, para el sistema con una composición final del 9 % de P123 (EAC7, EAC8 y EAC9), tras añadir el 25-30 % de decano, la emulsión presentaba un comportamiento muy elástico. Esto dificultó la adición del decano al impedir una buena agitación de la emulsión. Por ello, se incorporó parte de la solución reguladora de fosfatos (~30 %). De esta manera, se consiguió añadir el decano restante. A continuación, se incorporó el resto de la solución reguladora de fosfatos (EAC7 y EAC8) o la solución de genipina 1,4 % (EAC9) para finalmente, añadir el tensioactivo hasta alcanzar el 9 % correspondiente a la composición de las emulsiones. En la composición EAC9, al adicionar la solución reguladora de fosfatos en dos etapas, fue necesario incrementar la concentración final de genipina del 1 al 1,4 % para mantener constante la relación en peso final de quitosano:genipina.



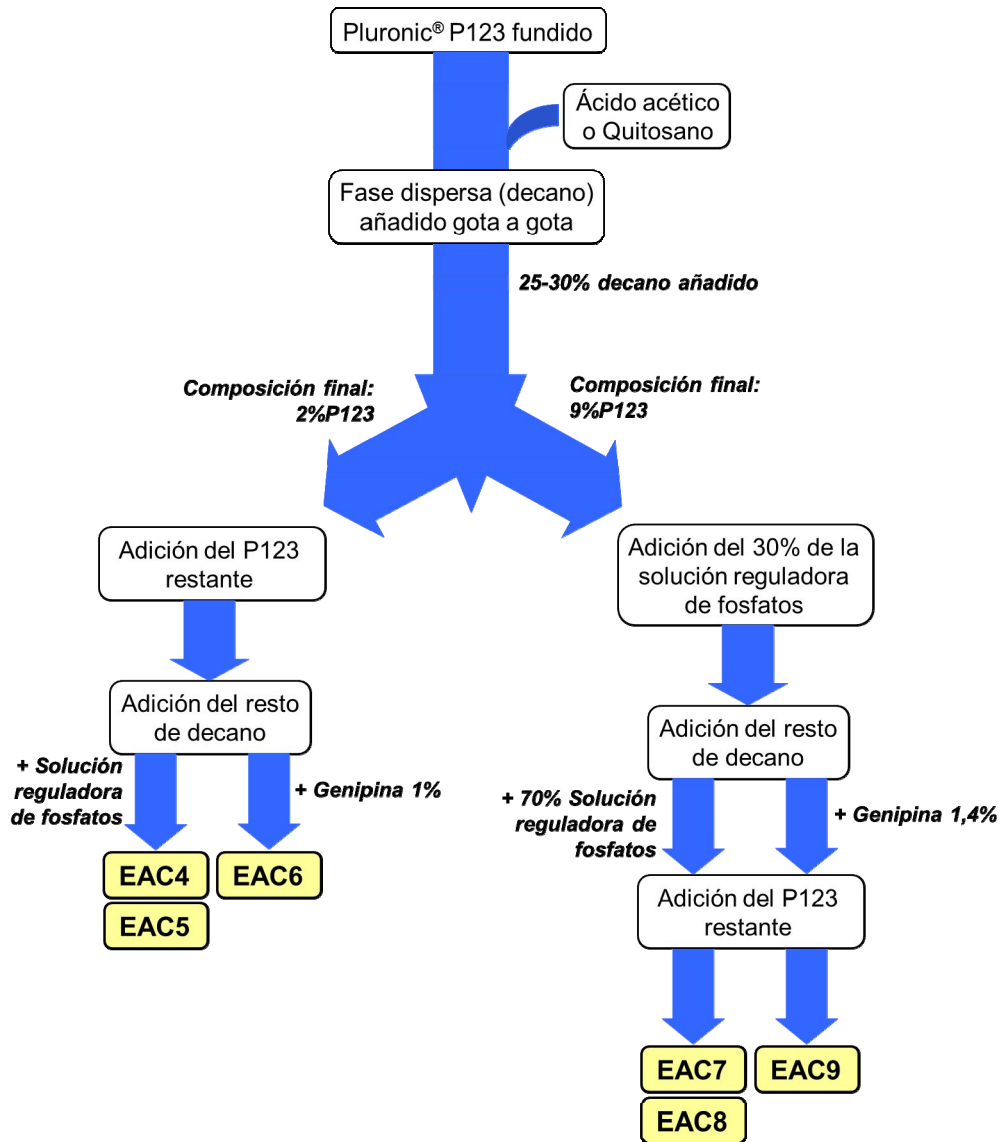


Figura 3.10 Procedimiento para la preparación de emulsiones con el tensioactivo Pluronic® P123.

Finalmente, las emulsiones altamente concentradas, en cualquiera de sus composiciones, se mantuvieron termostalizadas a 40 °C durante un periodo de 72 h. Además, las emulsiones correspondientes a la composición EAC1, del sistema con el tensioactivo Synperonic A7, también se mantuvieron a 25 °C durante 72 h para estudiar el efecto de la temperatura en el tamaño de gota de las emulsiones.

### 3.3.3 Caracterización de emulsiones altamente concentradas

Las técnicas utilizadas para la caracterización de las emulsiones se han clasificado en función de la presencia de genipina como entrecruzante en la composición de la emulsión.

### 3.3.3.1 Emulsiones sin entrecruzante

Estas emulsiones corresponden a las composiciones EAC1, EAC2, EAC4, EAC5, EAC7 y EAC8, de las cuales se estudiaron diversas propiedades:

#### Determinación de la tensión interfacial

Se utilizó el método del volumen de gota para determinar la tensión interfacial entre las fases aceite - agua y aceite - solución de quitosano, con el objetivo de estudiar la influencia de la presencia del quitosano en el sistema con el tensioactivo Synperonic A7 (Tabla 3.1). Para ello, se seleccionó un rango de concentraciones de tensioactivo entre 0 y 0,1 %, alrededor de la concentración micelar crítica ( $cmc = 0,0026 \%$ ) para los sistemas Agua/Decano y Quitosano-Solución reguladora de fosfatos/Decano, correspondiente a las composiciones EAC1 y EAC2 (Tabla 3.1). Además, para estudiar la posible influencia de la solución reguladora de fosfatos, se determinó la tensión interfacial en el sistema solución reguladora de fosfatos /decano.

El método experimental se basa en medir el volumen de una gota de un líquido formada en el seno de otro líquido. El proceso consiste en llenar un vial con la fase de menor densidad (decano) y por otra parte, una jeringa de 1 mL (Hamilton, Suiza) con la fase más densa (agua, solución reguladora de fosfatos o solución de quitosano con solución reguladora de fosfatos), la cual tiene acoplado un micrómetro. A continuación, se introduce la aguja de la jeringa a una profundidad mínima de 0,5 cm en el vial que contiene decano y se forma una gota de fase acuosa dentro de la fase de decano. Finalmente, teniendo en cuenta la posición inicial y final del micrómetro, se determina el volumen de la gota ( $V_D$ ). A partir de este valor, puede ser calculada la tensión interfacial,  $\gamma$  (Ecuación 3.4), teniendo en cuenta el radio externo de la aguja ( $r$ ), la diferencia de densidades entre ambas fases ( $\Delta\rho$ ) y la gravedad ( $g$ ). Además, es necesario introducir un factor de corrección ( $f_D$ ) debido a que parte de la gota no se desprende y permanece en la aguja. Este factor es función de  $r/V_D^{1/3}$  [Harkins, 1919]. El valor de tensión interfacial para cada sistema se obtiene como un valor medio de 20 réplicas.

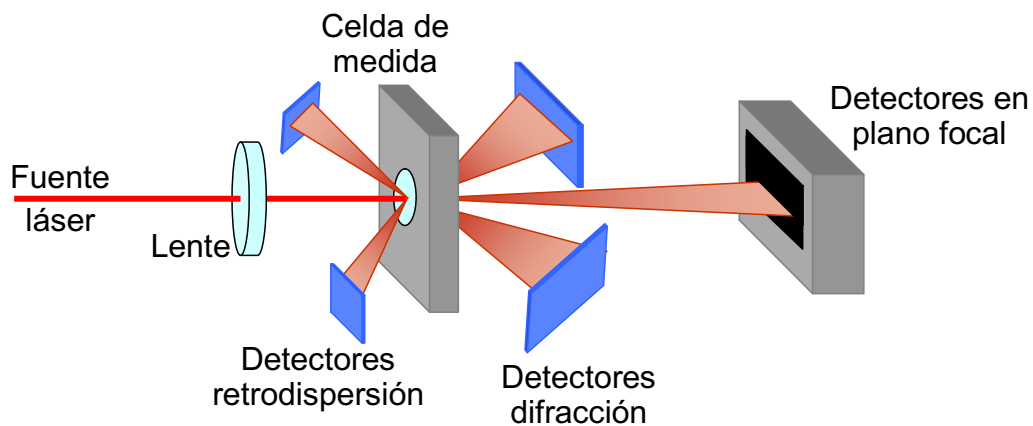
$$\gamma = \frac{V_D \Delta \rho g}{2\pi f_D r}$$

**Ecuación 3.4**

Tras la preparación de las emulsiones, éstas fueron caracterizadas en función del tiempo (0, 24, 48 y 72 h) mediante difracción de luz láser y microscopía óptica para determinar su distribución de tamaño de gota.

*Obtención de los histogramas de tamaño de gota mediante difracción de luz láser*

La técnica de difracción de luz láser consiste en incidir un haz monocromático sobre una muestra (Figura 3.11) y analizar la intensidad retrodispersada o reflejada y difractada a diferentes ángulos por las partículas presentes en la muestra. A mayor ángulo de difracción, menor tamaño de partícula [de Boer, 1987].



**Figura 3.11** Representación esquemática del proceso de medida mediante difracción de luz láser.

El espectrómetro de difracción de luz láser utilizado proyecta un haz monocromático de luz roja ( $\lambda = 640 \text{ nm}$ ) y a continuación, otro de luz azul ( $\lambda = 466 \text{ nm}$ ). Las medidas de difracción de luz láser realizadas se basan en la teoría Mie [Mie, 1908], que parte de la aproximación que las partículas son esféricas y considera la dispersión y la absorción de parte de la radiación que incide en la partícula. Los cálculos son precisos para tamaños de partícula menores a  $50 \mu\text{m}$ , y respecto al límite inferior, generalmente se considera que el error aumenta cuando el tamaño es inferior a  $0,5 \mu\text{m}$ . De todas formas, es necesario conocer las propiedades ópticas de la muestra a analizar (índice de refracción y absorbancia) y del medio de dispersión (fase externa). En el caso que una muestra presente tamaños de partícula superiores a  $50 \mu\text{m}$ , el equipo permite utilizar la teoría Mie o la teoría Fraunhofer, que no necesita conocer las propiedades ópticas de una muestra, para la obtención de las distribuciones de tamaño. Sin embargo, la utilización de esta última teoría conlleva ciertos errores cuando se utiliza como medio de dispersión

un líquido, cuando el diámetro de partícula es inferior a la longitud de onda del haz incidente o cuando los índices de refracción entre ambas fases son similares [de Boer, 1987].

A partir de las distribuciones de intensidad y los ángulos de difracción, se obtiene la distribución en volumen de las esferas equivalentes del sistema a analizar frente al diámetro de partícula. De dichas distribuciones en volumen, se calculan los parámetros característicos diámetro medio de Brouckere,  $D[4,3]$  (Ecuación 3.5), y polidispersidad,  $Span$  (Ecuación 3.6).

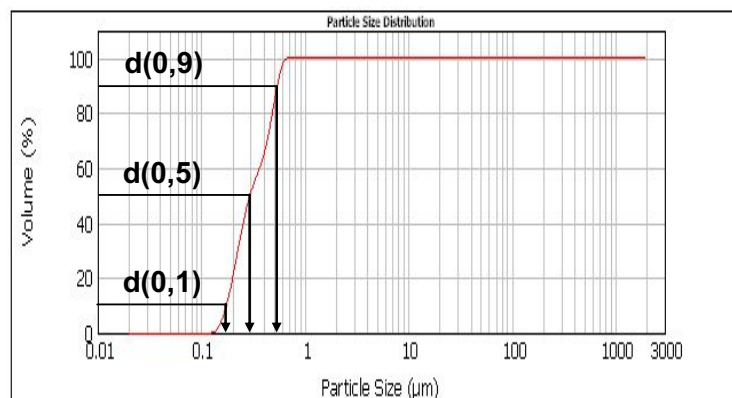
$$D[4,3] = \frac{\sum d^4}{\sum d^3} \quad \text{Ecuación 3.5}$$

donde  $d$  es el diámetro de gota ( $\mu\text{m}$ ).

$$Span = \frac{d(0,9) - d(0,1)}{d(0,5)} \quad \text{Ecuación 3.6}$$

donde  $d(0,1)$ ,  $d(0,5)$  y  $d(0,9)$  son las distribuciones de volumen acumulado al 10, 50 y 90 %, respectivamente.

Como ejemplo, se muestra en la Figura 3.12 una distribución en volumen acumulado indicando los valores al 10, 50 y 90 %, utilizados para el cálculo del  $Span$ . Dichos valores indican el tamaño de partícula que presenta el 10, 50 y 90 %, respectivamente, del total de la distribución en volumen.



**Figura 3.12** Representación de la distribución en volumen (%) acumulativa, indicando el 10, 50 y 90%.

Para la determinación del tamaño de gota mediante difracción láser, las emulsiones fueron diluidas con una solución del correspondiente tensioactivo a la concentración

micelar crítica (CMC), 0,0026 y 0,0025 %, para el Synperonic A7 y el Pluronic® P123, respectivamente. Este proceso se realizó para evitar la dispersión múltiple que puede producirse en muestras concentradas. Se utilizó un índice de refracción para la fase continua (agua) de 1,33 y para la fase dispersa (decano) de 1,41. A partir de estas medidas se obtuvieron la distribución de tamaño de gota en volumen (%) y los parámetros  $D[4,3]$  (Ecuación 3.5) y  $Span$  (Ecuación 3.6).

Obtención de los histogramas de tamaño de gota mediante microscopía óptica

Mediante microscopía óptica, también se obtuvo la distribución de tamaño de gota, en volumen (%) y en número (%). A partir de la distribución en número (%), se calcularon los valores de la media geométrica del diámetro de gota,  $D_{m.g.}$  (Ecuación 3.7) y el intervalo de confianza,  $IC$  (Ecuación 3.8). En algunas de las composiciones con el tensioactivo Pluronic® P123 (EAC7 y EAC8), también fue necesaria la dilución de la emulsión con la solución a la concentración de la CMC para caracterizarla mediante microscopía óptica, debido a su elevada viscosidad. Se midieron de manera aleatoria ~1000 gotas en diferentes imágenes de microscopía utilizando el software de análisis de imágenes Image J. En este caso, también se calcularon los valores de  $D[4,3]$  y  $Span$  (Ecuación 3.5 y Ecuación 3.6), con el fin de comparar los resultados obtenidos por ambas técnicas y discutir las posibles diferencias, ventajas o inconvenientes que pudieran presentar.

$$D_{m.g.} = \sqrt[n]{\prod_{i=1}^n D_i} = \sqrt[n]{D_1 \cdot D_2 \cdot \dots \cdot D_n} \quad \text{Ecuación 3.7}$$

$$IC = D_{m.g.} \pm z_{\alpha/2} \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad \text{Ecuación 3.8}$$

donde  $n$  es el número de gotas medidas por microscopía óptica y  $D_i$  su diámetro correspondiente,  $z_{\alpha/2}$  es el cuantil de la distribución normal que deja una probabilidad de  $\alpha/2$  a lado y lado,  $\sigma$  la desviación estándar y  $n$  el número de gotas medidas.

El valor experimental de diámetro de gota,  $D_{m.g.}$ , a  $t = 0$  h se comparó con un valor de diámetro teórico ( $D_{teórico}$ ) [Vilasau, 2011] obtenido a partir de la Ecuación 3.9 para evaluar la eficacia del proceso de emulsificación.

$$D_{teórico} = \frac{6\phi}{a_s \cdot N_A \cdot \left( \frac{[S]}{M} + CMC(\phi - 1) \right)} \quad \text{Ecuación 3.9}$$

donde  $\phi$  es la fracción en volumen de fase dispersa ( $\phi = 0,8$  para las emulsiones caracterizadas),  $a_s$  ( $\text{nm}^2/\text{molécula}$ ) es el área superficial por molécula de tensioactivo obtenidos en literatura [Alexandridis, 1994; Wanka, 1994; Rosen, 2004],  $N_A$  es el número de Avogadro ( $6,023 \cdot 10^{23}$  moléculas/mol),  $[S]$  la concentración de tensioactivo ( $\text{g}/\text{nm}^3$ ),  $M$  el peso molecular del tensioactivo ( $\text{g}/\text{mol}$ ),  $CMC$  es la concentración micelar crítica ( $\text{mol}/\text{nm}^3$ ).

#### Viscosidad, viscoelasticidad y estabilidad cinética

Las propiedades reológicas se determinaron utilizando un reómetro de esfuerzo controlado AR-G2 (TA Instruments). Se estudió la influencia de la presencia de quitosano en la viscosidad de la fase continua de las emulsiones preparadas con Synperonic A7 (Tabla 3.1) y Pluronic<sup>®</sup> P123 (Tabla 3.2). Estas medidas se realizaron mediante ensayos de flujo estacionario a 25 °C con una geometría de cono-plato de 40 mm de diámetro, un ángulo de cono de 4° y una distancia entre geometrías (gap) de 105  $\mu\text{m}$ . Como referencia, también se determinó la viscosidad del agua, en este caso utilizando cilindros concéntricos (gap = 4000  $\mu\text{m}$ ).

Las propiedades viscoelásticas de las emulsiones se determinaron a 40 °C durante 72 h y utilizando una geometría plato-plato de 20 mm de diámetro con trampa para disolventes, para evitar la evaporación. Se realizaron ensayos oscilatorios en los que los valores del módulo elástico fueron tomados en la zona de viscoelasticidad lineal ( $G'_{LVR}$ ), donde éstos son independientes de la deformación aplicada, a los tiempos 0,5, 2, 4, 6, 24, 48 y 72 h. Se realizaron medidas a tiempos intermedios (2, 4 y 6 h), respecto a las medidas mostradas por microscopía óptica, para hacer un estudio exhaustivo del comportamiento de la emulsión a tiempos cortos. Con este objetivo, la deformación fue gradualmente aumentada, del 0,01 a 20 % para las emulsiones sin presencia de quitosano en la fase continua y del 0,05 al 20 % para las emulsiones con quitosano. Ambos ensayos se realizaron a una frecuencia de 1 Hz y una distancia entre geometrías (gap) de 1000  $\mu\text{m}$  para las emulsiones preparadas con el tensioactivo Synperonic A7 y a 1400  $\mu\text{m}$  para las emulsiones con Pluronic<sup>®</sup> P123. Finalmente, los valores de  $G'_{LVR}$  fueron comparados en función del tiempo para determinar la estabilidad de dichas emulsiones. A partir de los valores de  $G'_{LVR}$ , también se obtuvieron los valores de densidad de energía de cohesión,

$E_c$  (Ecuación 3.10) [Sohm 1989, Tadros, 1990]. Estas medidas se realizaron por duplicado para obtener los valores medios de  $G'_{LVR}$  y  $E_c$ .

$$E_c = \frac{1}{2} \gamma_{cr}^2 G'_{LVR} \quad \text{Ecuación 3.10}$$

donde  $\gamma_{cr}$  es el valor de deformación crítico (límite de la región de viscoelasticidad lineal).

### Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico de la respuesta diámetro de gota de gota y módulo elástico ( $G'_{LVR}$ ) utilizando el software estadístico Release 12, de Stata<sup>®</sup>. Dicho análisis se realizó en colaboración con la Dra. M<sup>a</sup> José Bleda Hernández, del Instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC-CSIC). En primer lugar, se realizó un análisis descriptivo del diámetro de gota. Para describir los valores del diámetro obtenido, y debido a que la distribución de estos valores era asimétrica con cola hacia la derecha, se usó como medida de centralidad la media geométrica y su intervalo de confianza. La media aritmética no es tan adecuada cuando tenemos distribuciones de este tipo. Para mostrar gráficamente los datos se utilizaron diagramas de caja (*box-plots*) e histogramas. Para analizar la influencia de los factores (presencia de quitosano, velocidad de agitación, concentración de tensioactivo y tiempo) en el tamaño de gota se realizó un análisis univariante con el objetivo de estudiar las diferencias en el diámetro de gota para cada uno de los factores por separado. Se utilizaron pruebas no paramétricas: test de la suma de rangos de Wilcoxon [Wilcoxon, 1945] para factores con dos categorías y el test de Kruskal-Wallis [Kruskal, 1957] para factores con más de dos categorías. Para analizar la influencia en el diámetro de gota de los factores presencia de quitosano, velocidad de agitación y tiempo conjuntamente (sistema Synperonic A7) y los factores presencia de quitosano, concentración de tensioactivo y tiempo conjuntamente (sistema Pluronic<sup>®</sup> P123), se ajustó un modelo de regresión lineal múltiple incluyendo también las interacciones de segundo y tercer orden entre los factores [Kleinbaum, 1988; Peña, 2002; Mitchell, 2012]. Para poder aplicar un modelo de regresión lineal múltiple, la variable dependiente debe tener distribución Normal( $\mu, \sigma^2$ ). El diámetro de gota tenía una distribución asimétrica con cola hacia la derecha, por lo que se seleccionaron las transformaciones para normalizar la distribución del diámetro de gota. El logaritmo neperiano fue la transformación más adecuada y por ello, el modelo de regresión lineal múltiple se ajustó para el logaritmo neperiano del diámetro. Una vez ajustado el modelo

de regresión, se comprobaron las hipótesis básicas: linealidad, normalidad, homocedasticidad (varianza constante) e independencia. Además se analizó la bondad del ajuste del modelo evaluando la ausencia de multicolinealidad, detección de observaciones atípicas y/o influyentes, y que el tamaño de muestra fuese mayor al número de parámetros a estimar. Esta bondad del modelo se realizó analizando los residuos obtenidos después del ajuste del modelo y calculando otras medidas de bondad como la distancia de Cook, valores leverage y valores Deltabeta. Para expresar los resultados obtenidos del modelo de regresión, en términos de la variable original, las estimaciones obtenidas y los intervalos de confianza se exponenciaron.

#### *Determinación de las estructuras de agregados tensioactivos*

Las emulsiones preparadas con Pluronic<sup>®</sup> P123 que presentaban estructura de cristal líquido en la fase continua fueron caracterizadas mediante dispersión de rayos X a ángulo pequeño (SAXS) a 25 y 40 °C. En este caso, las muestras para SAXS fueron preparadas utilizando un porta muestras metálico cilíndrico con una ventana de 5 mm de largo y 2 mm de ancho donde se colocó la muestra entre dos films Kallebrat (Kalle Austria GmbH) transparentes a la radiación.

#### **3.3.3.2 Emulsiones con entrecruzante**

##### *Cinética del proceso de entrecruzamiento mediante reología*

Se estudió el proceso de entrecruzamiento del quitosano en las emulsiones con entrecruzante (genipina), que corresponden a EAC3, EAC6, y EAC9 (Tabla 3.1 y Tabla 3.2). Como en el caso de las emulsiones sin genipina, éstas se mantuvieron a 40 °C durante 72 h. En el caso de EAC3, ésta también se caracterizó a 25 °C durante 18 días. Este proceso de entrecruzamiento del quitosano con la genipina se caracterizó mediante dos tipos de ensayos reológicos en función del tiempo. Se realizaron ensayos oscilatorios en los que se determinó el módulo elástico en la zona de viscoelasticidad lineal ( $G'_{LVR}$ ) durante 72 h a una frecuencia de 2 Hz y en un rango de deformación entre 0,05 y 30 %. También se llevaron a cabo ensayos de fluencia-recuperación (*creep-recovery*) a esfuerzos de cizalla de 10 y 40 Pa y se determinó la variación de la capacitancia (Ecuación 3.11) en la región lineal durante 72 h.



$$J = \gamma / \sigma$$

Ecuación 3.11

donde  $\gamma$  es la deformación y  $\sigma$  el esfuerzo aplicado.

Se aplicó el esfuerzo durante 2 min, seguido de un proceso de recuperación durante 2 min más. Estas medidas fueron llevadas a cabo en función del tiempo de entrecruzamiento (0, 2, 4, 6, 24, 48 y 72 h). Se utilizó una geometría plato-plato de 20 mm de diámetro con trampa para disolventes, para evitar la evaporación, manteniendo constante la distancia entre geometrías (gap) a 2700  $\mu\text{m}$  en todas las medidas. Los resultados obtenidos en los ensayos oscilatorios y de fluencia se basan en medidas realizadas por duplicado, obteniendo un valor medio para  $G'_{LVR}$  y  $E_c$ .

#### Caracterización del proceso de entrecruzamiento mediante microscopía óptica

En el caso de las emulsiones preparadas con el tensioactivo Pluronic<sup>®</sup> P123, el proceso de entrecruzamiento también se caracterizó mediante microscopía óptica a los tiempos 0, 24, 48 y 72 h, para realizar un seguimiento de las estructuras formadas.

#### **3.3.4 Preparación de las espumas de quitosano**

Las espumas de quitosano se obtuvieron a partir de las composiciones EAC3, EAC6, y EAC9 (Tabla 3.1 y Tabla 3.2). Las emulsiones se prepararon a 25 °C y a continuación, se realizó el proceso de entrecruzamiento a 40 °C durante 72 h. Transcurrido este tiempo, se obtuvo un material con textura de gel, que fue lavado y secado para obtener la espuma de quitosano.

En primer lugar, el material fue lavado por extracción en Soxhlet para eliminar el tensioactivo y el aceite (decano). El proceso consistió en dos ciclos de lavado de 12 horas cada uno. El primero con etanol y el segundo con agua mQ<sup>®</sup>. Finalmente, el material fue liofilizado (Figura 3.13).

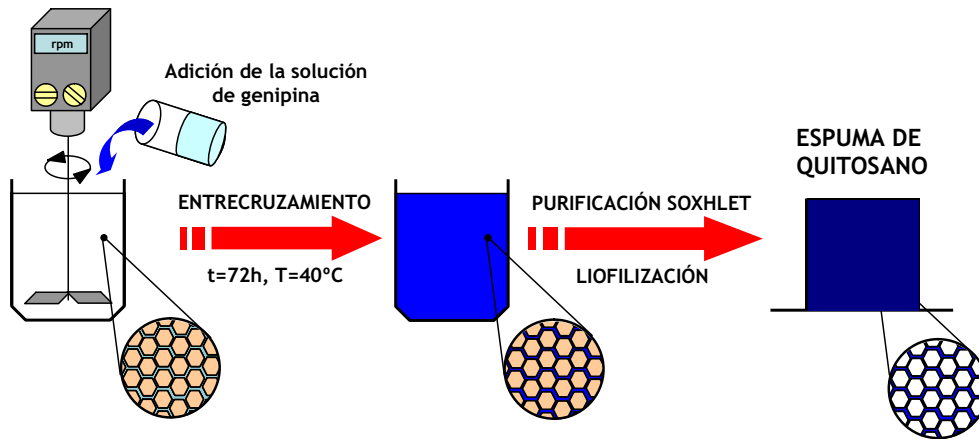


Figura 3.13 Esquema del proceso de obtención de las espumas de quitosano.

### 3.3.4.1 Lavado y secado de los materiales de quitosano mediante extracción con $CO_2$ supercrítico

El procedimiento de lavado y secado de los materiales de quitosano en condiciones supercríticas con  $CO_2$  consistió en varias etapas consecutivas:

1. La muestra fue introducida en el reactor y sumergida en 200 mL de decano.
2. La presión se incrementó a 100 bar y se introdujo  $CO_2$  a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos.
3. Se realizó un intercambio del decano líquido por el  $CO_2$  líquido a 100 bar y temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla  $CO_2$  + decano se extrajo por la parte inferior del reactor.
4. Se incrementó la temperatura a  $40^{\circ}C$ , manteniendo la presión a 100 bar y se realizó un intercambio de  $CO_2$  + decano por  $CO_2$  supercrítico durante 1 hora.
5. Finalizado el intercambio, se mantuvo la presión y temperatura constante durante 1 hora sin circulación de  $CO_2$ .
6. Finalmente, se despresurizó el reactor y se recuperó la muestra.

### 3.3.5 Caracterización de las espumas de quitosano

#### 3.3.5.1 Determinación del grado de entrecruzamiento

Se determinó el grado de entrecruzamiento de las espumas de quitosano mediante un proceso de extracción con Soxhlet con una solución de ácido acético al 5 % (p/v)

durante 48 h. A partir de los pesos inicial ( $w_0$ ) y final ( $w$ ) del material (Ecuación 3.12), se obtiene el grado de entrecruzamiento de la espuma [Chao, 2006].

$$\text{Grado de entrecruzamiento (\%)} = \left( \frac{w}{w_0} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 3.12}$$

### ***3.3.5.2 Estructura macroporosa: Microscopía electrónica de barrido***

La superficie porosa de las espumas de quitosano fue caracterizada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Las imágenes de SEM fueron adquiridas con un microscopio Hitachi 4100 o un Jeol JSM-7100F, equipos disponibles en los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona (SCT-UB). En el primer caso, las muestras fueron recubiertas con una fina capa de oro para proporcionar la necesaria conductividad eléctrica a la muestra para su observación. En el segundo caso, las muestras fueron recubiertas con carbón con el mismo objetivo que el caso anterior. Las observaciones fueron realizadas a 15kV.

### ***3.3.5.3 Mesoporosidad: Dispersión de rayos X a ángulo pequeño (SAXS)***

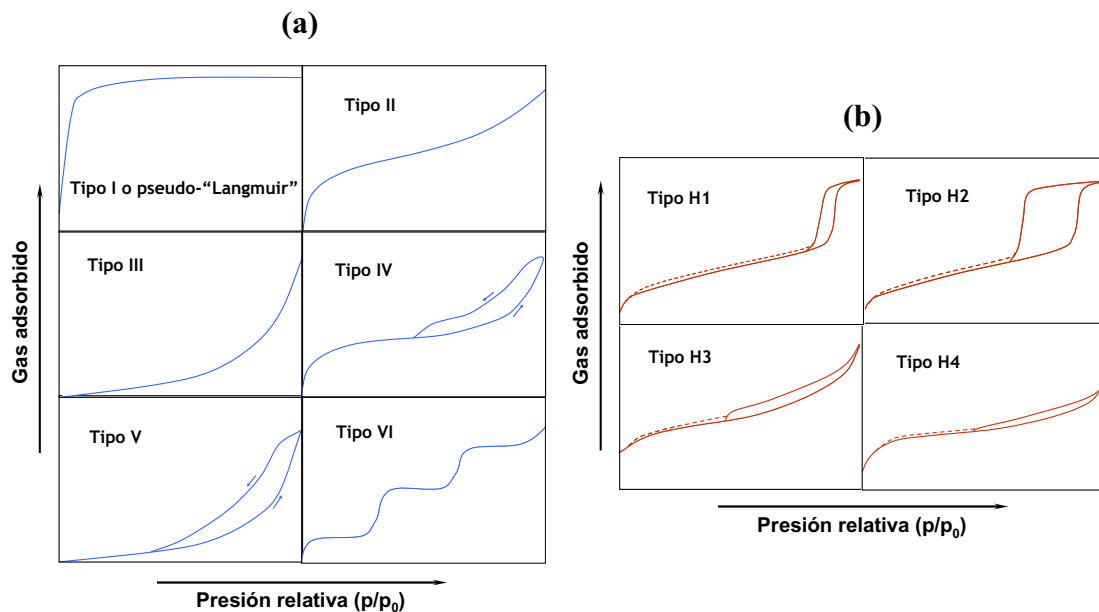
La estructura de las espumas de quitosano se caracterizó por SAXS. Como en el caso de las emulsiones que presentaban cristal líquido en la fase continua, las muestras en polvo se prepararon en portamuestras, tal como se ha descrito en el apartado 3.3.3.1 (subapartado: Determinación de las estructuras de agregados tensioactivos).

### ***3.3.5.4 Superficie específica, volumen y tamaño de poro mediante adsorción/desorción de nitrógeno***

Se determinaron las isothermas de adsorción/desorción de nitrógeno mediante un equipo de adsorción de gases. Previamente, las muestras fueron desgasadas a 55 °C durante 12 horas para eliminar cualquier componente volátil que tuviese la muestra y pudiese afectar a las medidas. Estas medidas se realizaron a una temperatura de 77,3 K, la temperatura del nitrógeno líquido.

Los procesos de adsorción y desorción en los poros de un material se producen mediante diferentes mecanismos. El proceso de llenado de los poros (adsorción) debido

a un incremento de la presión relativa,  $p/p_0$ , tiene lugar por un proceso de formación de multicapas de moléculas de nitrógeno sobre la superficie de los poros. Sin embargo, el proceso de vaciado (desorción) se produce mediante la formación de un menisco de nitrógeno líquido en el interior del poro [Lowell, 2006a]. Esta diferencia entre ambos mecanismos es la causante que generalmente, se observe un ciclo de histéresis en presencia de mesoporos, entre las isothermas de adsorción y desorción. La propia forma de las isothermas y de los ciclos de histéresis proporciona valiosa información sobre la naturaleza del material que se está analizando. En función de dicha forma, las isothermas se pueden clasificar en 6 tipos (Figura 3.14 a) y los ciclos de histéresis en 4 tipos (Figura 3.14 b), de acuerdo con las categorías establecidas por IUPAC [Sing, 1985].



**Figura 3.14** Clasificación de isothermas (IUPAC) en ciclos de adsorción/desorción (a) y de ciclos de histéresis (b). Las líneas discontinuas en (b) indican que el ciclo de histéresis puede cerrarse a presiones relativas bajas.

El perfil de las isothermas, la variación del gas adsorbido en función de la presión relativa y la presencia, forma y posición del ciclo de histéresis indican el tipo de porosidad de un material. A partir de la forma de las isothermas, éstas se agrupan en 6 categorías:

- Tipo I o pseudo-Langmuir: presenta una adsorción elevada a presiones relativas bajas debido a un proceso de adsorción fuerte producido en microporos, seguido

de un Plateau, que indica el completo llenado de los poros. Este tipo de isothermas la presentan materiales microporosos tipo carbones activados o ciertos óxidos porosos.

- Tipo II: característica de materiales macroporos o no porosos. El hombro o cambio de pendiente que se observa a presiones relativas bajas indica una interacción fuerte entre adsorbato-adsorbente y la formación de la monocapa durante el proceso de adsorción [Lowell, 2006a].
- Tipo III: No es muy común. La falta de cambio de pendiente a presiones relativas bajas indica interacciones débiles adsorbato-adsorbente.
- Tipo IV: La presencia de ciclo de histéresis indica la presencia de mesoporos y macroporos de diámetro reducido. Cuando el ciclo de histéresis se produce a presiones relativas próximas a 0,4, se atribuye a la presencia de mesoporos de diámetro bajo. Es una isoterma típica de materiales mesoporosos.
- Tipo V: No es común. Observado por algunos materiales mesoporosos con una interacción adsorbato-adsorbente débil.
- Tipo VI: Tampoco es habitual. El proceso de adsorción por etapas indica la adsorción por capas en materiales no porosos. La pueden presentar ciertos materiales carbonosos.

La posición y forma de los ciclos de histéresis proporciona información principalmente sobre el tamaño y tipo de poros que presenta un material. Se han agrupado en 4 tipos (clasificación IUPAC):

- Tipo H1: El perfil estrecho y vertical del ciclo de histéresis indica una distribución de tamaño de poro estrecha, de baja polidispersidad.
- Tipo H2: Una variante del tipo H1, pero con una distribución de tamaño de poro de mayor polidispersidad.
- Tipo H3: Ciclo presentado por estructuras que se disponen de forma laminar y producen poros con morfología de rendija, micro o mesoporosos.
- Tipo H4: Asociado con poros de rendija de diámetro reducido, con una forma de la isoterma que indica microporosidad en la estructura.

A partir de las isothermas, se aplicaron diversas ecuaciones o modelos matemáticos para el cálculo de los parámetros característicos de las espumas de quitosano estudiadas. En

primer lugar, se determinó la superficie específica ( $S_{BET}$ ) de la espuma mediante el método BET (Brunauer-Emmett-Teller) (Ecuación 3.13) [Brunauer, 1938].

$$\frac{1}{V \left[ \left( \frac{p_0}{p} \right) - 1 \right]} = \frac{1}{W_m C} + \frac{C-1}{W_m C} \left( \frac{p}{p_0} \right) \quad \text{Ecuación 3.13}$$

donde  $p$  y  $p_0$  son la presión de equilibrio y de saturación, respectivamente,  $V$  es el volumen de gas adsorbido,  $W_m$  es la cantidad de gas adsorbido en una monocapa y  $C$  es una constante relacionada con la entalpía de adsorción del gas.

Otro parámetro importante es el volumen total de poro,  $V_T$  (Ecuación 3.14), el cual se obtiene a una presión relativa próxima a 1 donde se considera que la gran mayoría de los poros del material están ocupados por nitrógeno.

$$V_T = \frac{P_a V_{ads} V_m}{RT} \quad \text{Ecuación 3.14}$$

donde  $P_a$  y  $T$  son la presión y temperatura,  $V_{ads}$  es el volumen de nitrógeno adsorbido a una presión relativa muy próxima a 1 y  $V_m$  es el volumen molar del líquido adsorbido (en el caso del nitrógeno, 34,7 cm<sup>3</sup>/mol).

A partir de los parámetros anteriormente descritos,  $S_{BET}$  y  $V_T$ , se calculó el valor del diámetro medio de poro ( $D$ ), Ecuación 3.15, suponiendo que el material presenta poros cilíndricos.

$$D = \frac{4V_T}{S_{BET}} \quad \text{Ecuación 3.15}$$

Por último, para este tipo de materiales, otro parámetro importante es la distribución de tamaño de poros. El método más ampliamente utilizado es el de Barrett, Joyner y Halenda (BJH) [Barrett, 1951], adecuado para materiales mesoporosos. Mediante esta técnica se pueden obtener distribuciones de tamaños entre 3 y 300 nm, aproximadamente.

### 3.3.5.5 Densidad y volumen de poro

La densidad de pared de las espumas de quitosano se determinó mediante picnometría de helio (equipo disponible en los SCT-UB). La densidad media se obtuvo tras realizar

cuatro réplicas de la medida. A partir de este valor, se calculó el volumen total de poro,  $V_p$  (Ecuación 3.16), que incluye el volumen de meso y macroporos.

$$V_p = \frac{\left( V_T - \frac{M}{\rho} \right)}{M} \quad \text{Ecuación 3.16}$$

donde  $V_T$  es el volumen total de la espuma,  $M$  es el peso y  $\rho$  es la densidad de pared de la espuma de quitosano, medida por picnometría de Helio.

### 3.3.6 Preparación de films de quitosano

La preparación y caracterización de films de quitosano se realizó en el grupo de Ciencia Superficial y de Corrosión del Real Instituto de Tecnología de Estocolmo (KTH), grupo dirigido por el Dr. Per Claesson y en colaboración durante los ensayos experimentales con el Dr. Chao Liu. Dicho trabajo se llevó a cabo gracias a la financiación obtenida en el marco de un proyecto InForm (FP7-CSA-CA 233533), coordinado por la Dra. Karin Persson del Instituto de Investigación Técnica de Suecia (SP).

Los films de quitosano se prepararon sobre distintos soportes de silicio (Si): obleas de Si cortadas de forma cuadrada de  $1 \times 1 \text{ cm}^2$  y discos de Si de 1 cm de diámetro. Dichos soportes fueron previamente lavados con una solución limpiadora de Hellmanex<sup>®</sup> al 2 %vol durante 1 h. A continuación, fueron lavados con agua mQ<sup>®</sup> y etanol y secados en una corriente de nitrógeno gas. Posteriormente, estos substratos se sumergieron en una solución de trimetoxisilano al 10 %vol en acetona durante 15 h a temperatura ambiente. Tras este periodo, los substratos fueron lavados con acetona y secados en atmósfera de nitrógeno. Finalmente, se sometieron a un proceso de calentamiento a 100 °C durante 1 h con el fin de anclar la capa silanizada en los soportes de Si. Este proceso previo permitió el anclaje del film de quitosano al substrato, mediante enlaces covalentes.

Se prepararon soluciones de quitosano del 1 %(p/v) en ácido acético al 1 %vol. Las soluciones se mantuvieron en agitación 24 h y para asegurar la eliminación de posibles impurezas no solubles, éstas fueron filtradas. La disolución de genipina fue preparada en una solución reguladora de fosfatos a pH = 7,4 para obtener una concentración de 0,05 %(p/p) al disolverse por agitación durante 1 h a temperatura ambiente.

Para la preparación de los films de quitosano entrecruzados con genipina, las soluciones de quitosano y genipina se mezclaron en agitación durante 15 min con una relación en peso de 1:1. Transcurrido este tiempo, los soportes de Si fueron sumergidos en la solución quitosano-genipina, controlando la humedad relativa externa ( $RH = 80\%$ ) para evitar una posible evaporación que pudiera influir en las reacciones silano-quitosano y/o quitosano-genipina.

Los soportes se mantuvieron sumergidos en la solución quitosano-genipina durante 1 h o durante 6 h, para estudiar la influencia del tiempo de entrecruzamiento en la respuesta al pH de los films. Se seleccionó un tiempo máximo de 6 h debido a que tiempos superiores producían un incremento considerable de la viscosidad que imposibilitaba la formación de films delgados sobre los sustratos. A modo comparativo, también se prepararon films de quitosano sin entrecruzar, sumergiendo los sustratos de Si en solución de quitosano durante 6 h. Posteriormente, los sustratos fueron lavados con agua mQ<sup>®</sup>, con el objetivo de eliminar el quitosano no adsorbido en la superficie, y secados durante 24 h a temperatura ambiente.

### **3.3.7 Respuesta al pH de los films de quitosano**

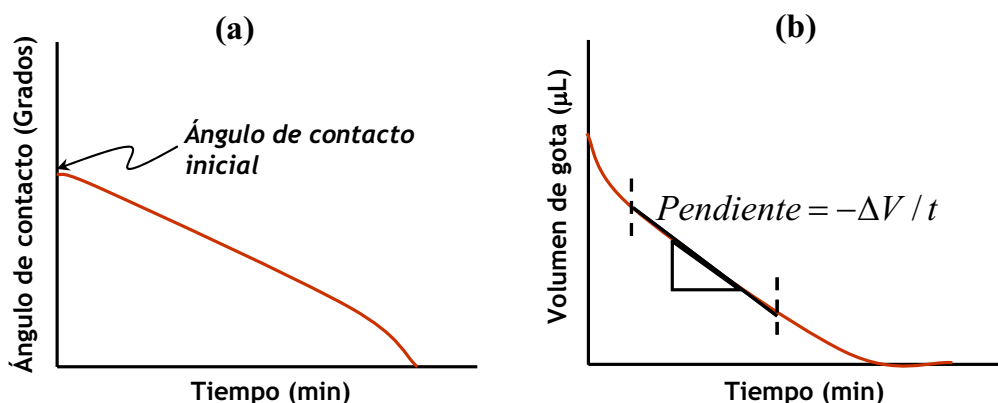
Se estudió la respuesta al pH de los films de quitosano utilizando soluciones de cloruro sódico (NaCl) 10 mM a pH 3, 6 y 9, para tiempos de entrecruzamiento de 1 h y 6 h. El pH se controló mediante la adición de HCl o NaOH. Este estudio se llevó a cabo mediante tres técnicas: ángulo de contacto dinámico, microbalanza de cristal de cuarzo con determinación de la disipación (QCM-D) y microscopía de fuerza atómica (AFM), que se describen a continuación.

#### ***3.3.7.1 Mojabilidad de los films***

La mojabilidad de los films de quitosano fue determinada mediante medidas de ángulo de contacto utilizando un goniómetro. Los ensayos consistían en medidas de 10 minutos en los cuales se capturaba la imagen de la gota sobre el film cada 2 segundos. De esta manera, se registraron la evolución del ángulo de contacto ( $\theta$ ) y el volumen de gota adsorbido ( $\mu\text{L}$ ). El ángulo de contacto es aquel comprendido entre la línea base de la gota y la tangente de la unión gota-film. Ambos parámetros fueron determinados



mediante un software de tratamiento de imágenes (PG version v2.0) suministrado por FIBRO system ab. A partir de estos datos, se compararon los valores del ángulo de contacto inicial (Figura 3.15 a) y la velocidad de penetración,  $\mu\text{L/s}$ , como la variación del volumen de la gota con el tiempo (Figura 3.15 b).



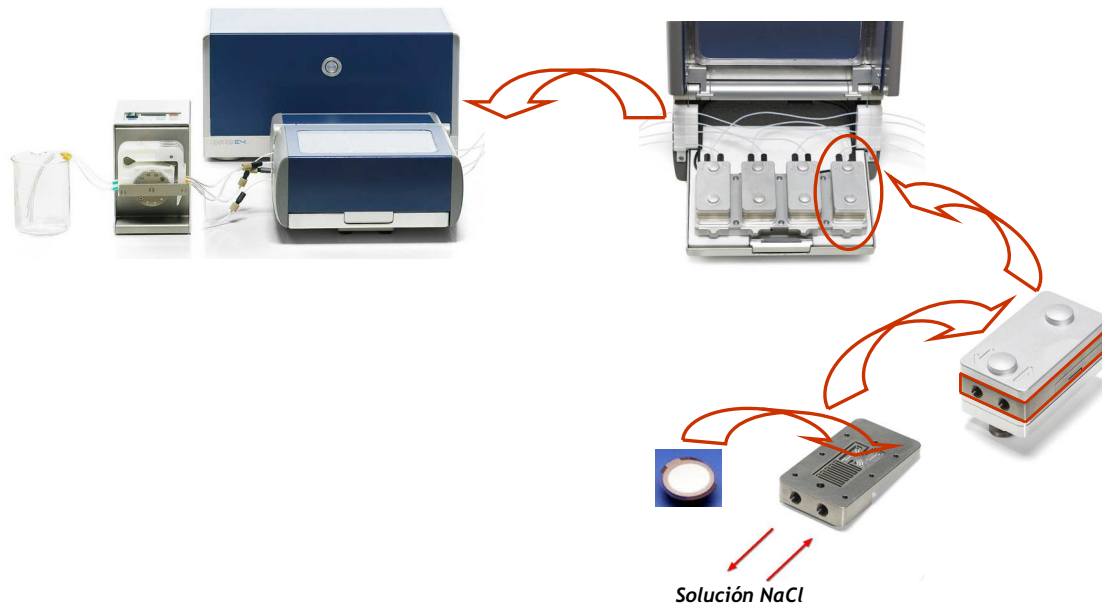
**Figura 3.15** Ejemplo esquemático de ensayos para la obtención de los parámetros ángulo de contacto inicial (a) y velocidad de penetración (b).

### 3.3.7.2 Hinchamiento de los films

El hinchamiento y/o encogimiento de los films de quitosano debido a la variación de pH se caracterizó mediante QCM-D y AFM.

La respuesta al pH de los films de quitosano fue determinada *in situ* mediante una microbalanza de cristal de cuarzo, mostrada en la Figura 3.16. Para estos ensayos se utilizaron discos de Si (Q-Sense). Estos soportes consisten en sensores de cuarzo con una capa de Si y electrodos de oro, los cuales son excitados a su frecuencia fundamental ( $f_0 \approx 5$  MHz), como a los armónicos (n) 3, 5, 7, 9 y 11 que corresponden a 15, 25, 35, 45 y 55 MHz, respectivamente.

Todas las medidas fueron realizadas en un dispositivo con temperatura y flujo controlados, a  $25$  °C y  $0,3$  mL/min, y a tres valores de pH (soluciones de  $10$  mM NaCl a pH 3, 6 y 9). Previamente al inicio de cada ensayo, una línea base fue establecida con una solución de  $10$  mM NaCl a pH 6.



**Figura 3.16** Dispositivo QCM-D E4, donde se muestra el disco QCM, los dos canales por donde pasa la solución de NaCl y las diferentes partes de una de las cuatro posiciones de medida.

La técnica de QCM-D permite la determinación simultánea de cambios de frecuencia ( $\Delta f$ ) y cambios de energía de disipación ( $\Delta D$ ) durante los procesos de hinchamiento o encogimiento de los films de quitosano a los distintos pH. Dicha técnica presenta una alta sensibilidad a la variación de masa (resolución en el rango de  $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) [Marx, 2003]. Además, permite detectar variaciones de energía de disipación producidas por la masa adsorbida/desorbida, siendo una técnica muy versátil que proporciona una medida directa del proceso de adsorción *in situ* [Indest, 2008; Alves, 2009; Martins, 2010]. La variación de masa durante el proceso de adsorción/desorción produce una variación en la frecuencia normalizada de resonancia ( $\Delta f/n$ ) de un cristal de cuarzo oscilante cuando los procesos de adsorción/desorción tienen lugar sobre una superficie de un cristal piezoeléctrico. La variación en la frecuencia de oscilación ( $\Delta f$ ) es proporcional a la masa de la capa adsorbida ( $\Delta m$ ) según la ecuación de Sauerbrey (Ecuación 3.17). Esta ecuación implica una relación lineal entre  $\Delta f$  y  $\Delta m$ , para films delgados y rígidos. Sin embargo, el modelo presenta ciertas desviaciones en el caso de films viscoelásticos. En ese caso, la masa adsorbida ( $\Delta m$ ) se mide con energía de disipación ( $\Delta D$ ).

$$\Delta m = -C \Delta f / n \quad \text{Ecuación 3.17}$$

donde  $n$  es el número de armónico ( $n = 1, 3, 5, 7, 11$ ) y  $C$  es la constante de sensibilidad del cristal (para sensores de cristal de cuarzo,  $C = 17,7 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{Hz}^{-1}$ ) [Sauerbrey, 1959].

Finalmente, la topografía y las propiedades elásticas de estos films fueron caracterizadas mediante microscopía de fuerza atómica (AFM), donde las muestras fueron escaneadas en modo *PeakForce Tapping<sup>TM</sup>* (o modo dinámico). Todas las medidas fueron realizadas a temperatura ambiente utilizando una celda de cuarzo para fluidos (Bruker) con soluciones de 10 mM de NaCl a pH 3, 6 y 9. Se realizaron escaneos en superficies de  $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ . Previamente a cada medida, las muestras se mantuvieron en solución de 10 mM NaCl a pH 6 durante 1h.

### 3.3.8 Ensayos de adsorción/desorción de colorantes

Se realizaron ensayos de adsorción/desorción del colorante rojo ácido 27 por parte de las espumas de quitosano a dos pH diferentes: 3 y 9, disolviendo el colorante en soluciones reguladoras de pH (Davies) [Davies, 1959]. El proceso de adsorción se realizó a pH 3 y el de desorción a pH 9. Parte de estos experimentos se realizaron en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia en la Universidad de Barcelona, mediante una colaboración con la Dra. M<sup>a</sup>José García Celma, con la ayuda de Ferran Roig Roig.

En primer lugar, se realizaron ensayos preliminares con un dispositivo compuesto por placa agitadora a una velocidad de agitación de  $\sim 100$  rpm y una celda metálica de rejilla en el que la muestra se sumergía en la solución correspondiente. Dichos ensayos se realizaron a tres concentraciones de colorantes 0,025, 0,0125 y 0,01 g/L y a diferentes relaciones peso de colorante/espuma de quitosano: 0,25, 0,125, 0,0625, 0,042 y 0,025. A partir de las rectas de calibrado (Anexos, apartado 8.4), se determinaron las concentraciones de colorante presente en solución durante los procesos de adsorción y desorción. Una vez delimitadas las concentraciones de colorante a utilizar, la adsorción/desorción del colorante rojo ácido 27 se estudió a 30 °C y a una relación peso de colorante/espuma de 0,033 mediante el equipo de disolución Vision Elite 8TM (Hanson Corp.). La disolución de colorante se introdujo en unos vasos de 500 mL de volumen y la muestra en una celda metálica de rejilla de  $2 \times 3,5$  cm. La celda con la muestra se mantuvo en agitación constante de 100 rpm durante los ensayos. Se tomaron muestras de 1 mL automáticamente durante 24 h en tres intervalos de tiempo diferentes: cada 15 minutos durante las primeras 2 h, posteriormente cada hora hasta llegar a las 8 h y finalmente, cada dos horas. Para mantener el balance de materia, cada 1 mL de

disolución de colorante extraído del vaso se sustituyó por 1 mL de disolución sin colorante a pH 3. Finalizado el proceso de adsorción, se llevó a cabo la desorción. Para ello, se introdujo la muestra en una solución receptora Davies a pH 9 y se tomaron muestras durante un periodo de 24 h, en las mismas condiciones que durante el proceso de adsorción. Una vez obtenidas las muestras, se determinó la absorbancia mediante un espectrofotómetro UV-Vis para microplacas en el máximo de absorbancia del colorante ( $\lambda_{MAX} = 521$  nm). A partir de la recta de calibrado Absorbancia vs. Concentración de colorante, se determinó la cantidad de colorante adsorbido por parte de las espumas de quitosano a pH 3 y el correspondiente colorante desorbido a pH 9.



*Capítulo 4*

# **Resultados y discusión**

---



La presente tesis se ha centrado en la obtención de espumas de quitosano a partir de emulsiones altamente concentradas utilizadas como medios de reacción. Para su obtención, fue necesario estudiar previamente las propiedades y estabilidad de las emulsiones. En gran medida, la estabilidad de las emulsiones es función del tipo de tensioactivo utilizado y de los autoagregados tensioactivos formados por éste. Por ello, en primer lugar, se realizó el estudio del comportamiento fásico de varios sistemas tensioactivos para determinar cuál era el más adecuado para la síntesis de las espumas de quitosano.

#### 4.1 ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO FÁSICO

El estudio del comportamiento fásico es una herramienta útil que nos permite conocer las diversas fases en equilibrio presentes en un sistema, así como la composición y estructura a la que corresponden. La información obtenida a partir del estudio del comportamiento fásico se representa de manera gráfica a través de los diagramas de fases. Se estudiaron diversos tensioactivos de diferente hidrofiliadad con el fin de obtener una visión en conjunto de los diferentes autoagregados tensioactivos presentes, ya que dichos sistemas se utilizarían en la preparación de emulsiones altamente concentradas utilizadas como medios de reacción. Como se ha comentado con anterioridad, dichos agregados tensioactivos conferirán diferentes propiedades o características al material final en función de si son de uno u otro tipo. Con el objetivo de determinar las estructuras tensioactivas presentes, se estudió el comportamiento fásico de sistemas compuestos por solución de quitosano / solución reguladora de fosfatos / tensioactivo no iónico / decano. Según las características de estos sistemas y su posterior aplicación en emulsiones altamente concentradas, la selección de dichos tensioactivos no iónicos se realizó mediante dos criterios: temperatura de fusión inferior a 60 °C y variedad en el comportamiento fásico. La temperatura máxima de trabajo recomendable en presencia de quitosano es 60 °C ya que a mayores temperaturas puede tener lugar la modificación del polímero [Mima, 1983].

Para la realización del presente estudio se escogieron tensioactivos no iónicos por varias razones: son versátiles ya que son compatibles con otros tipos de tensioactivo y sus propiedades no se ven afectadas debido a la presencia de electrolitos. En comparación



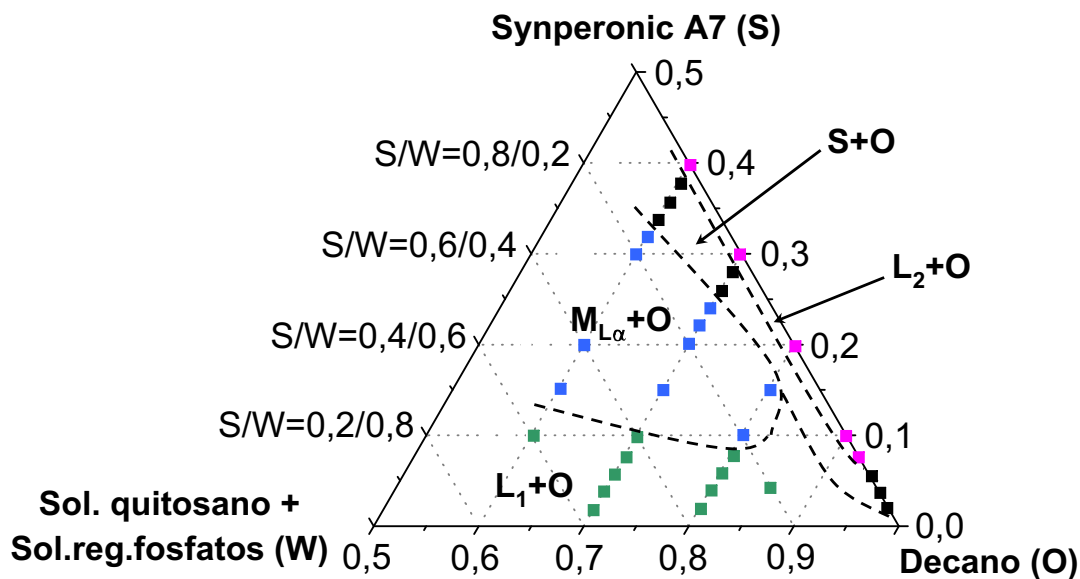
con los tensioactivos iónicos, los no iónicos no presentan punto de Krafft [Rosen, 2004] y poseen buena solubilidad a temperaturas bajas. También se caracterizan por tener una mayor dependencia de la temperatura que los iónicos, al cambiar de un tipo de estructura a otra a un menor cambio de temperatura [Jönsson, 1998a]. Se seleccionó una solución de fosfatos de pH 7,4 como parte de la fase acuosa de este sistema debido a que en la preparación de los materiales de quitosano (apartado 3.3.1 y 3.3.5) el proceso de entrecruzamiento del quitosano con la genipina depende en gran medida del pH de esta solución. Trabajos anteriores [Mi, 2005] demostraron que se obtiene un máximo entrecruzamiento a pH 7,4. Por último, la elección de decano como fase oleosa se realizó en base a su baja volatilidad ( $T_{\text{evaporación}} = 174 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) para evitar procesos de evaporación durante la realización del estudio de comportamiento fásico y posteriormente, la preparación de las emulsiones altamente concentradas (apartado 3.3.2).

Como ya se comentó, uno de los objetivos es estudiar la influencia de los autoagregados tensioactivos en las características de las emulsiones utilizadas como medios de reacción, así como de las espumas de quitosano obtenidas a partir de estas emulsiones. Para dicho estudio, se seleccionaron cuatro tensioactivos no iónicos como posibles candidatos: Pluronic<sup>®</sup> P123, Synperonic A7, Tween 20 y Pluronic<sup>®</sup> F127. Estos tensioactivos hidrófilos presentan valores HLB de 7-12, 12, 17 y 22, respectivamente, de menor a mayor hidrofiliidad. Todos ellos con una temperatura de fusión inferior a 60 °C [Dimitrova, 1995; Holmqvist, 1997; Ivanova, 2000; Li, 2005; Sarkar 2012]. Estas características hacen que estos tensioactivos sean posibles candidatos para la preparación de espumas de quitosano. Para estudiar cuál de ellos era el más adecuado, se realizó el estudio del comportamiento fásico.

Para la realización y caracterización de los diagramas de fases de los distintos tensioactivos utilizados, se estudiaron y caracterizaron los agregados tensioactivos formados mediante observación visual, polarizadores cruzados y dispersión de rayos X a ángulo pequeño (SAXS).

#### 4.1.1 Comportamiento fásico del sistema Solución de quitosano / Solución reguladora de fosfatos / Synperonic A7 / Decano

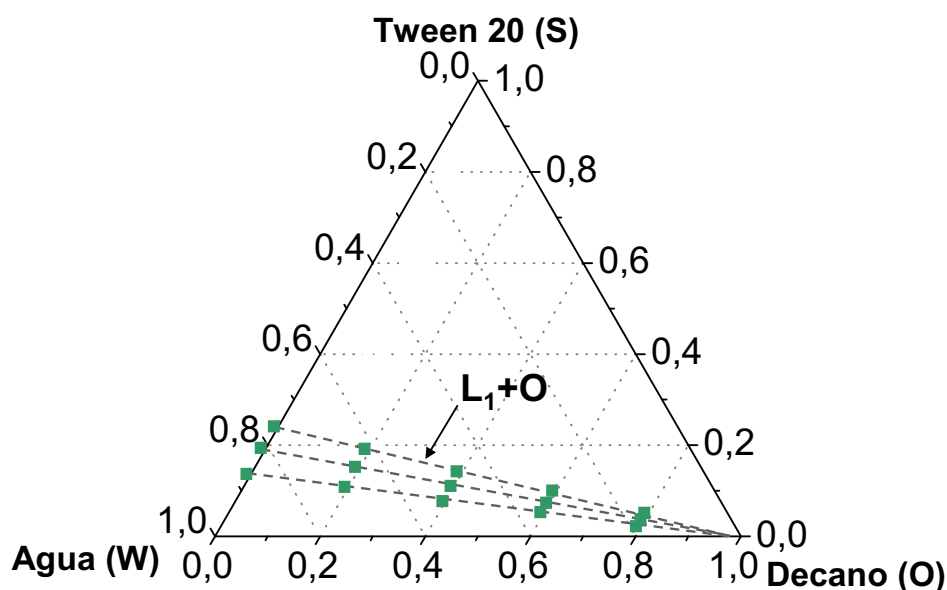
El comportamiento fásico del sistema Solución de quitosano / Solución reguladora de fosfatos / Synperonic A7 / Decano fue estudiado en profundidad en el trabajo de máster y en el artículo correspondiente publicado en 2013 [Miras, 2011, 2013a]. Inicialmente, se realizaron los diagramas de fases pseudobinarios de los sistemas: (a) Agua / Synperonic A7, (b) Solución de quitosano / Synperonic A7 y (c) Solución reguladora de fosfatos / Synperonic A7. Dichos diagramas mostraron que la incorporación del quitosano no influía de forma importante en la formación de autoagregados tensioactivos, ya que simplemente se observó un leve desplazamiento de las regiones de cristal líquido al aumentar ligeramente la concentración de tensioactivo. Estos resultados indicaron que el tensioactivo Synperonic A7 podría ser un buen candidato para la formación de emulsiones altamente concentradas en presencia de quitosano. Por lo tanto, también se realizó el diagrama pseudoternario Solución de quitosano / Solución reguladora de fosfatos / Synperonic A7 / Decano, sistema utilizado para la preparación de emulsiones, con el fin de determinar y caracterizar las posibles estructuras de tensioactivo que podrían estar presentes en la fase externa de las emulsiones altamente concentradas utilizadas como medios de reacción (Figura 4.1) [Miras, 2011, 2013a]. Se estudió un rango de concentraciones de decano superior al 60 % y se observó que este sistema ternario presentaba principalmente una amplia región multifásica en presencia de cristal líquido laminar y decano ( $M_{L\alpha}+O$ ) a concentraciones de tensioactivo superiores al 10 %, identificada con cuadros azules, y una región micelar en equilibrio con decano ( $L_1+O$ ) a concentraciones de tensioactivo inferiores, donde las composiciones estudiadas se representan con cuadros verdes, como se puede observar en la Figura 4.1. Ambas regiones se identificaron inicialmente mediante observación visual, ya que la fase micelar presentaba un aspecto transparente, isótropo y fluido. La fase de cristal líquido se identificó por su elevada viscosidad y por presentar birrefringencia (brillo característico de la muestra al observarla a través de polarizadores cruzados debido a la presencia de ciertas nanoestructuras ordenadas). Posteriormente, las muestras que presentaron birrefringencia, también se caracterizaron mediante SAXS para identificar el tipo de cristal líquido presente.



**Figura 4.1** Diagrama ternario del sistema Solución de quitosano / Solución reguladora de fosfatos pH 7,4 / Synperonic A7 / Decano, a 40 °C ( $L_1$ : solución micelar de tensioactivo,  $M_{L\alpha}$ : región multifásica con presencia de cristal líquido laminar, S: región isotrópica con sólido presente,  $L_2$ : solución micelar inversa, L: solución isotrópica) [Miras, 2011, 2013a].

#### 4.1.2 Comportamiento fásico del sistema Agua / Tween 20 / Decano

Como en el sistema anterior, se siguió un procedimiento similar con otro de los tensioactivos candidatos para la preparación de emulsiones utilizadas como medios de reacción, el Tween 20. La Figura 4.2 muestra el diagrama ternario del sistema Agua / Tween 20 / Decano. Se escogieron composiciones del 15, 20 y 25 % de tensioactivo (sistema binario con agua) a las cuales se les fue añadiendo decano hasta obtener las composiciones totales correspondientes a un 20, 40, 60 y 80 % de decano. Todas las muestras se pudieron mezclar a una temperatura máxima de 60 °C, requisito importante ya que a temperaturas superiores se podría degradar el quitosano [Mima, 1983]. Se estudió el comportamiento fásico de las distintas composiciones a 25, 40, 50 y 60 °C para determinar qué estructuras de tensioactivo presentaba el sistema.



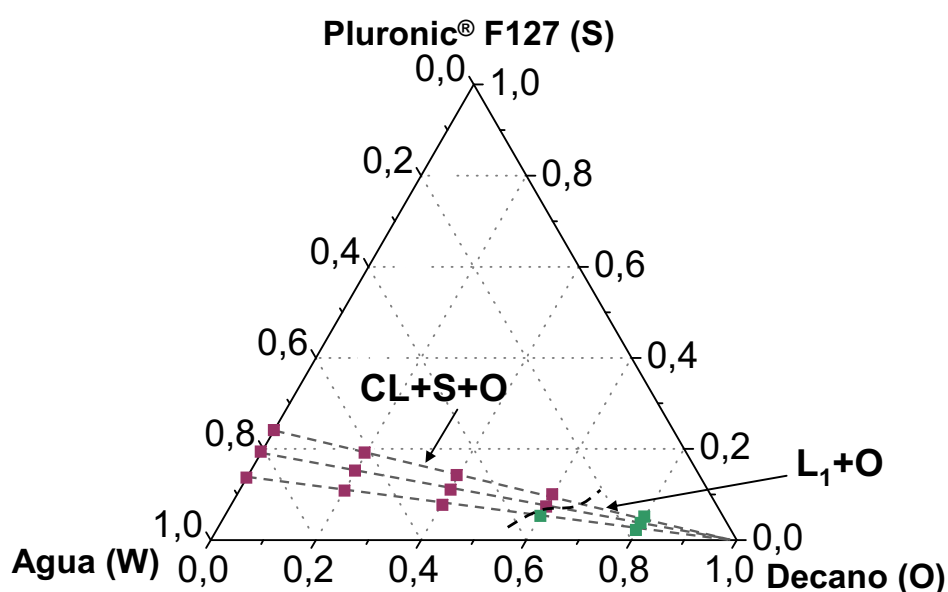
**Figura 4.2** Diagrama ternario para el sistema Agua / Tween 20 / Decano a 25, 40, 50 y 60 °C.  $L_1+O$ : solución micelar en presencia de aceite. Los puntos indican las composiciones caracterizadas.

Como se puede observar en la Figura 4.2, todas las composiciones estudiadas muestran una única fase de solución micelar en equilibrio con decano ( $L_1+O$ ). Todas las muestras presentaban fluidez a cualquier temperatura en el rango estudiado (25-60 °C) y en ningún caso se observó birrefringencia, indicando que no había presencia de cristal líquido. A partir de los resultados obtenidos, se decidió descartar el tensioactivo Tween 20 para la preparación de emulsiones debido a la formación de una única fase de agregados tensioactivos ( $L_1$ ) en el rango de concentraciones estudiado.

#### 4.1.3 Comportamiento fásico del sistema Agua / Pluronic® F127 / Decano

Se utilizó el mismo procedimiento y composiciones que con el tensioactivo Tween 20 para estudiar el sistema ternario Agua / Pluronic® F127 / Decano. En este caso, al tratarse de un tensioactivo sólido, se utilizaron viales inyectables, sin constricción, para la preparación de las muestras. Sin embargo, todas las composiciones se tuvieron que mezclar a temperaturas superiores a 60 °C para fundir total o parcialmente las fases sólidas o de cristal líquido formadas. La mayoría de las muestras se tuvieron que calentar entre 70 y 95 °C. En la Figura 4.3 se muestran las fases presentes a 90 °C. Se observó que en casi todas las composiciones estudiadas, el tensioactivo no fundió totalmente. No se obtuvieron muestras homogéneas, observándose presencia de

tensioactivo sólido (S). A concentraciones de tensioactivo inferiores a 6 % y a partir de 65 °C, se obtuvo una única fase micelar en presencia de decano ( $L_1+O$ ) a partir del 60 % de decano. Estos resultados indicaron que el sistema Agua / Pluronic® F127 / Decano no era viable para la preparación de emulsiones altamente concentradas en presencia de quitosano, debido a que se tendría que trabajar durante parte del proceso de emulsificación a temperaturas superiores a 60 °C. Además, el sistema presenta una región de fase micelar en el rango de concentraciones de tensioactivo estudiado.

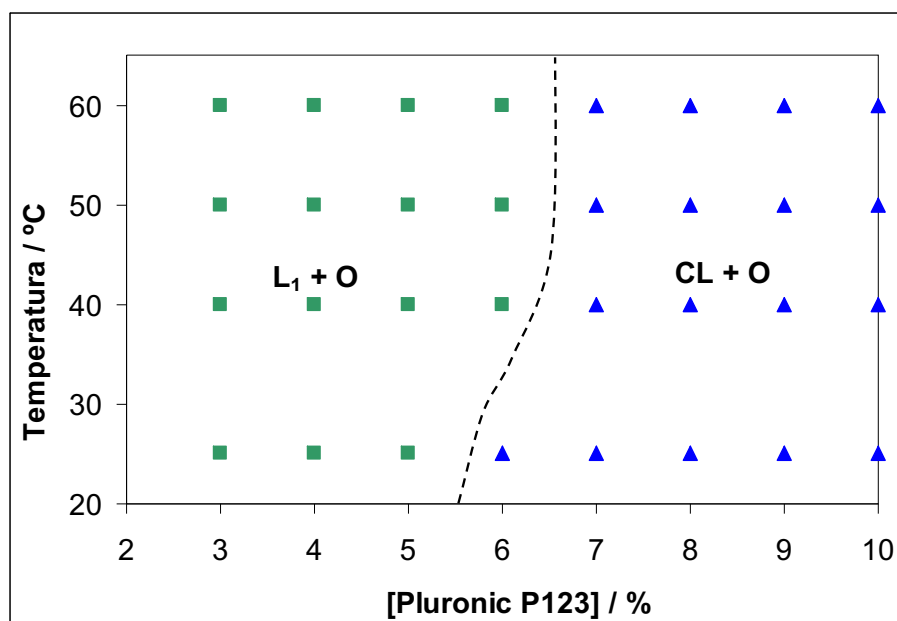


**Figura 4.3** Diagrama ternario para el sistema Agua / Pluronic® F127 / Decano, a 90 °C. CL: cristal líquido, S: tensioactivo sólido,  $L_1$ : solución micelar. Los puntos indican las composiciones caracterizadas.

#### 4.1.4 Comportamiento fásico de los sistemas Agua / Pluronic® P123 / Decano y Solución de quitosano / Solución reguladora de fosfatos / Pluronic® P123 / Decano

Una vez descartados los sistemas tensioactivos Tween 20 y Pluronic® F127, otro posible candidato para la preparación de este tipo de emulsiones con quitosano fue el tensioactivo Pluronic® P123. Como en los casos anteriores, inicialmente se estudió el sistema ternario Agua / Pluronic® P123 / Decano. Este estudio se centró en una relación constante fase dispersa (decano):fase continua (agua) de 80:20, relación utilizada en la preparación de emulsiones altamente concentradas. Se estudió el comportamiento fásico

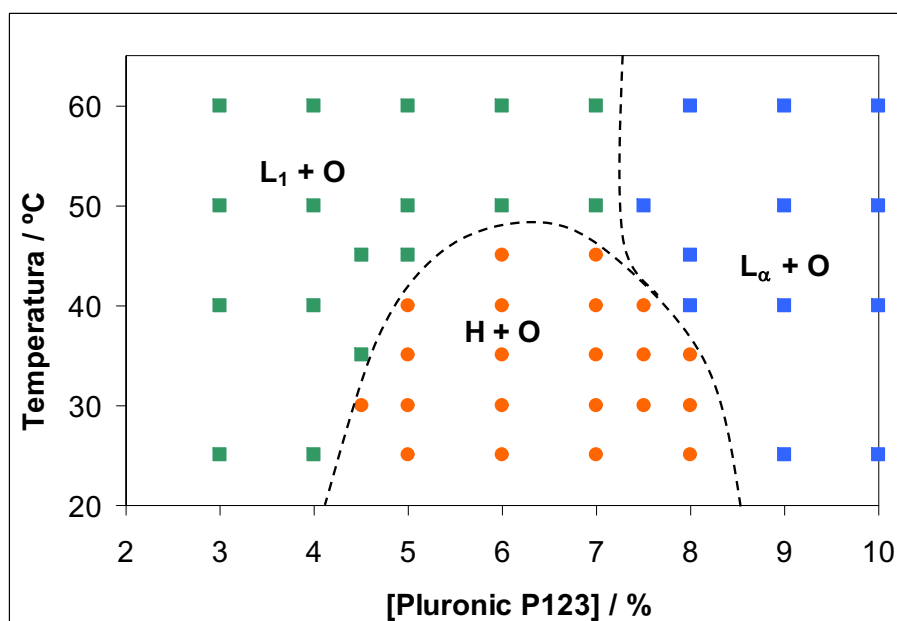
del sistema a 25, 40, 50 y 60 °C a una concentración de Pluronic® P123 entre 3 y 10 %. El correspondiente diagrama ternario se muestra en la Figura 4.4.



**Figura 4.4** Diagrama ternario para el sistema Agua / Pluronic® P123 / Decano. L<sub>1</sub>: solución micelar, CL: cristal líquido, O: decano. Los puntos indican las composiciones caracterizadas.

El diagrama ternario Agua / Pluronic® P123 / Decano muestra dos regiones bien diferenciadas. Una región micelar en presencia de decano (L<sub>1</sub>+O) a concentraciones inferiores a un 6 % de tensioactivo a 25 °C y a concentraciones inferiores al 7 % a 40, 50 y 60 °C. Al aumentar la concentración de tensioactivo, el diagrama muestra una región donde coexiste cristal líquido con decano (CL+O). Esta fase de mayor viscosidad presentaba birrefringencia al observarla con polarizadores cruzados, hecho que demuestra la presencia de cristal líquido.

Una vez confirmada la presencia de cristal líquido en el rango de temperaturas estudiado, se realizó el correspondiente diagrama ternario en presencia de quitosano. Éste se realizó igualmente en un rango de concentraciones de tensioactivo entre 3 y 10 %. Sin embargo, se redujeron en algunas zonas los intervalos de temperatura y concentración, inferiores a 10 °C y 5 % Pluronic® P123 respectivamente, para delimitar con mayor precisión las diferentes regiones presentes. El diagrama correspondiente al sistema ternario Solución quitosano / Solución reguladora de fosfatos / Pluronic® P123 / Decano se muestra en la Figura 4.5.

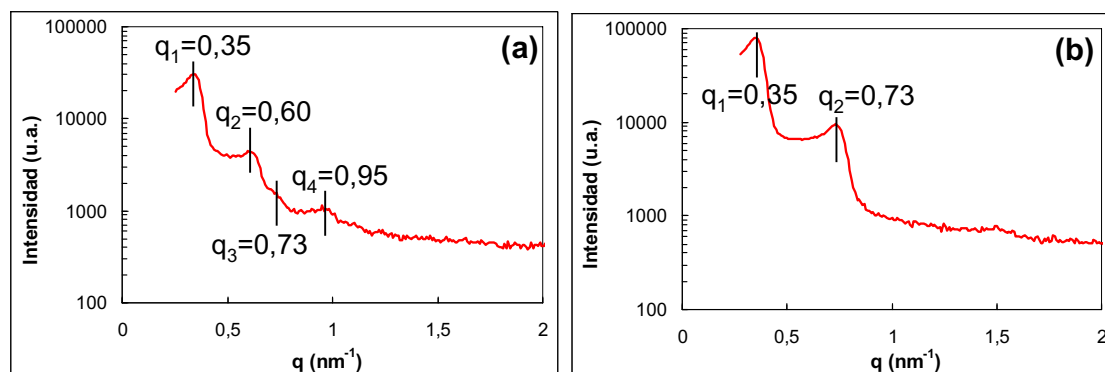


**Figura 4.5** Diagrama ternario para el sistema Solución quitosano / Solución reguladora de fosfatos / Pluronic® P123 / Decano.  $L_1$ : solución micelar, H: cristal líquido hexagonal directo,  $L_\alpha$ : cristal líquido laminar, O: decano. Los puntos indican las composiciones caracterizadas.

Como en el sistema sin quitosano (Figura 4.4), se distinguen dos regiones bien diferenciadas. La primera, una región fluida e isotrópica correspondiente a una fase micelar con presencia de decano ( $L_1+O$ ) a una concentración inferior al 5 % entre 25 y 45 °C y a una concentración inferior al 7 % a temperaturas entre 50 y 60 °C. Al incrementar la concentración de tensioactivo, se observó la presencia de una fase birrefringente a través de polarizadores cruzados, hecho que indica la presencia de cristal líquido. A concentraciones de tensioactivo entre 4,5 y 8 % y a temperaturas inferiores a 50 °C, el sistema forma agregados de cristal líquido hexagonal, que coexisten con decano. Al incrementar la concentración de tensioactivo en el sistema con quitosano, se detectó otra región de cristal líquido, una fase de cristal líquido laminar en presencia de decano ( $L_\alpha+O$ ) en todo el rango de temperaturas estudiado.

Si se comparan ambos diagramas, Figura 4.4 y Figura 4.5, se observa que la presencia de quitosano produce un ligero desplazamiento de la región de cristal líquido a concentraciones de tensioactivo inferiores. Las fases de cristal líquido detectadas en presencia de quitosano (Figura 4.5) se caracterizaron mediante SAXS. La Figura 4.6 a y Figura 4.6 b muestran dos ejemplos de cristal líquido hexagonal y laminar, al 6 y 8 % de tensioactivo, respectivamente. La primera caracterizada a 30 °C y la segunda a 45 °C. La

composición al 6 % se identificó como cristal líquido hexagonal, al presentar una relación de picos de  $1:\sqrt{3}:\sqrt{4}:\sqrt{7}$ , característica de cristal líquido hexagonal. Sin embargo, la composición al 8 % presentaba una relación entre picos de 1:2, en este caso típica de cristal líquido laminar.



**Figura 4.6** Espectros de SAXS correspondientes a una concentración del 6 % P123 (a), cristal líquido hexagonal, y del 8 % P123 (b), cristal líquido laminar.

Una vez identificadas las diferentes fases presentes en los sistemas estudiados, se seleccionaron los tensioactivos Synperonic A7 y Pluronic<sup>®</sup> P123 para la preparación de emulsiones altamente concentradas y la posterior obtención de materiales porosos de quitosano. Se eligieron estos tensioactivos ya que ambos presentaban diversas fases de autoagregados tensioactivos, en concreto, micelar ( $L_1$ ), cristal líquido hexagonal (H) y cristal líquido laminar ( $L_\alpha$ ). Ambos tensioactivos presentaban temperaturas de trabajo inferiores a 60 °C, temperatura máxima establecida para la preparación de emulsiones en presencia de quitosano. Los materiales obtenidos a partir de emulsiones altamente concentradas ( $\phi > 0,74$ ) se caracterizan por poseer una alta porosidad y bajas densidades. Para ello, se planteó el objetivo de preparar emulsiones con una relación fase dispersa (fase oleosa):fase continua (fase acuosa) de 80:20. No se utilizaron mayores porcentajes de fase dispersa debido a que el quitosano se incorpora en la fase continua y, al incrementar  $\phi$ , se reduce la cantidad de material de quitosano obtenido al final del proceso. En otros sistemas, se podría optar por incrementar la concentración de polímero sin embargo, debido a la dificultad de obtener soluciones de quitosano con concentraciones superiores al 2 %(p/v), en este sistema no fue posible.



Los resultados obtenidos en la preparación de las emulsiones altamente concentradas y las espumas de quitosano se muestran a continuación para los dos sistemas seleccionados: Solución quitosano / Solución reguladora de fosfatos / Synperonic A7 / Decano y Solución quitosano / Solución reguladora de fosfatos / Pluronic<sup>®</sup> P123 / Decano.

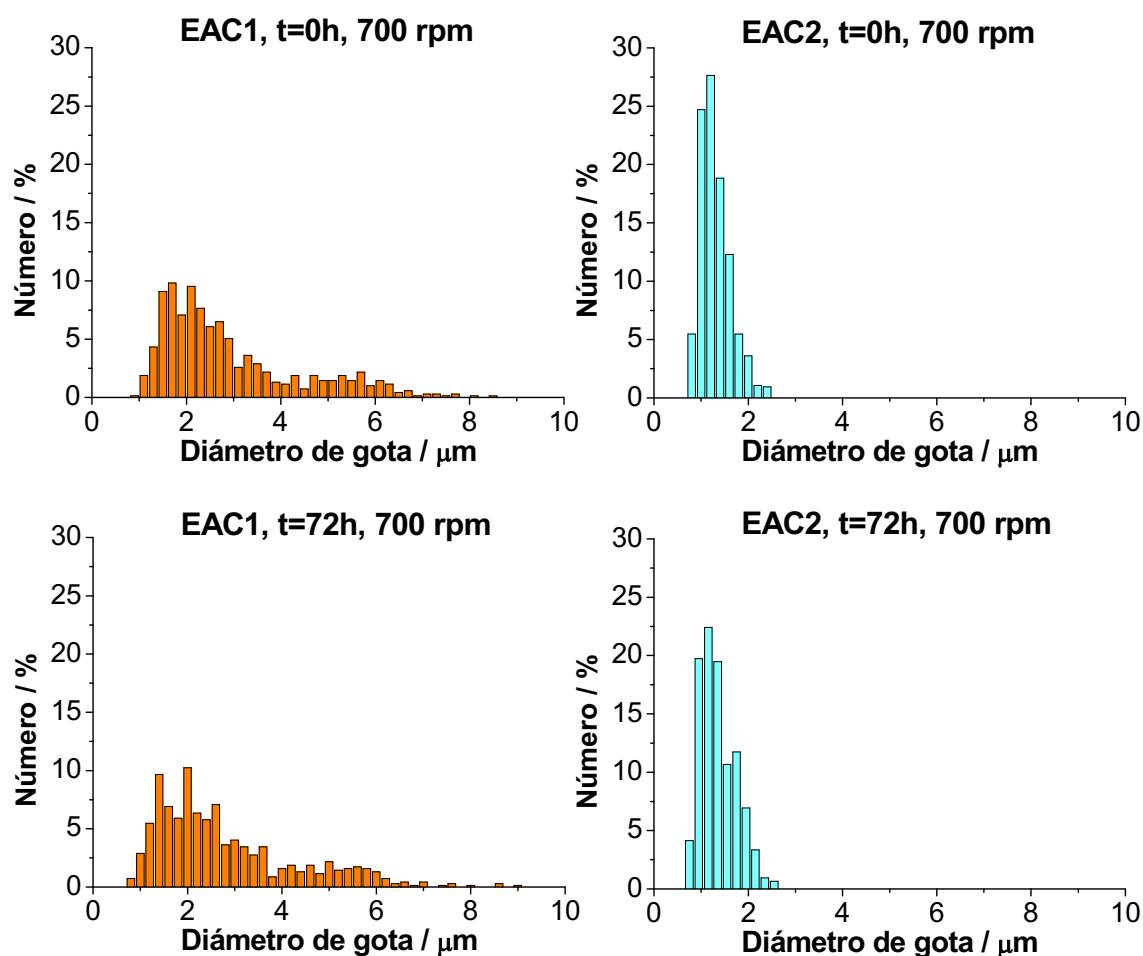
## **4.2 PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EMULSIONES ALTAMENTE CONCENTRADAS CON LOS SISTEMAS ÁCIDO ACÉTICO / SOLUCIÓN REGULADORA DE FOSFATOS / SYNPERONIC A7 / DECANO Y QUITOSANO / SOLUCIÓN REGULADORA DE FOSFATOS / SYNPERONIC A7 / DECANO**

El uso de emulsiones altamente concentradas utilizadas como medios de reacción en la obtención de espumas implica que dichas emulsiones deben presentar cierta estabilidad cinética. Dicha estabilidad se estudió mediante diversas técnicas (microscopía óptica y reología) que permitieron determinar si las emulsiones se podían considerar estables o no. Inicialmente, se escogió una temperatura de 25 °C para estudiar la estabilidad cinética de las emulsiones, ya que temperaturas superiores podrían favorecer procesos de desestabilización.

### **4.2.1 Estudio preliminar de la influencia del quitosano en la estabilidad de las emulsiones preparadas a 25 °C**

El objetivo de este estudio fue conocer mediante microscopía óptica la estabilidad de las emulsiones altamente concentradas en presencia de quitosano e identificar los posibles mecanismos de desestabilización que se podrían producir a 25 °C. Además, se realizó un estudio de la cinética del proceso de entrecruzamiento del quitosano a dicha temperatura mediante ensayos reológicos. Para realizar este estudio, se prepararon emulsiones altamente concentradas con el tensioactivo Synperonic A7 mediante la adición gota a gota de la fase dispersa (decano) sobre la fase acuosa, como se indicó en la parte Experimental (Apartado 3.3.2). Dichas emulsiones se prepararon a 700 rpm en ausencia y presencia de quitosano, EAC1 y EAC2 (Tabla 3.1) respectivamente, para analizar la influencia de la presencia de quitosano en el tamaño de gota y en la

estabilidad de las emulsiones durante un periodo de 72 h a 25 °C. En primer lugar, se determinó la variación del tamaño de gota de las emulsiones preparadas a 700 rpm, sin quitosano (EAC1) y en presencia de quitosano (EAC2), mediante microscopía óptica a 25 °C. Finalmente, se realizó un seguimiento de la cinética de entrecruzamiento del quitosano mediante reología a 25 °C para estudiar la influencia de la temperatura en el proceso de entrecruzamiento.



**Figura 4.7** Distribuciones de tamaño de gota, en número (%), de las emulsiones EAC1 (sin quitosano) y EAC2 (con quitosano) a tiempos  $t = 0$  h y  $t = 72$  h, a 25 °C, para una velocidad de agitación de 700 rpm, obtenidas a partir de las imágenes de microscopía óptica.

A partir de las imágenes de microscopía óptica, se obtuvieron las distribuciones de tamaño de gota en función del tiempo, de 0 a 72 h (Figura 4.7). Se escogió un tiempo de estudio de 72 h porque macroscópicamente se observó en ensayos previos que las emulsiones gelificadas (EAC3, cuando se incorpora genipina para producir el

entrecruzamiento del quitosano) no presentaban cambios importantes en aspecto (textura y color) mediante observación visual a tiempos superiores. El entrecruzamiento del quitosano con genipina produce que la emulsión evolucione de blanca a azulada, debido a la reacción entre la genipina y los grupos amino del quitosano en presencia de oxígeno [Mi, 2000].

Como se observa en la Figura 4.7, los histogramas de las emulsiones EAC1 y EAC2 indican que dichas emulsiones son estables durante al menos 72 h, al no observarse ningún desplazamiento importante de las distribuciones a tamaños superiores. También se pudo apreciar la influencia de la incorporación de quitosano, al producirse una importante reducción del tamaño de gota y una menor polidispersidad de la emulsión.

A partir de los resultados de microscopía óptica, se calcularon los valores de la media geométrica del diámetro de gota,  $D_{m.g.}$  (Ecuación 3.7), y su intervalo de confianza,  $IC$  (Ecuación 3.8), a los tiempos 0 y 72 h. Dichos resultados se muestran en la Tabla 4.1.

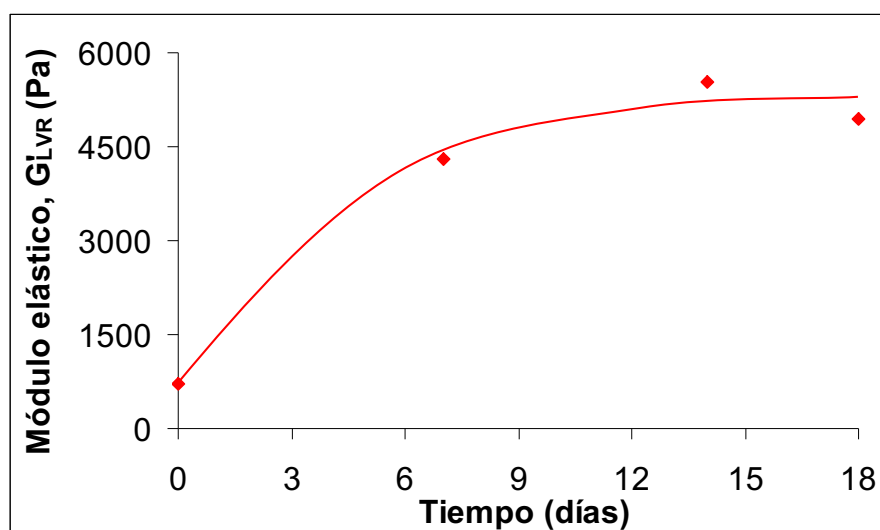
**Tabla 4.1** Media geométrica del diámetro de gota,  $D_{m.g.}$  ( $\mu\text{m}$ ), e intervalo de confianza del 95%,  $IC_{95\%}$ , para las emulsiones EAC1 (sin quitosano) y EAC2 (con quitosano) en función del tiempo a 25 °C, obtenidos mediante microscopía óptica.

	$D_{m.g.} (IC_{95\%}) / \mu\text{m}$	
	t = 0 h	t = 72 h
EAC1	2,37 (2,25 – 2,48)	2,47 (2,36 – 2,58)
EAC2	1,26 (1,24 – 1,29)	1,31 (1,28 – 1,33)

Al comparar los datos obtenidos, los resultados reflejan la óptima estabilidad de las emulsiones altamente concentradas, tanto en ausencia (EAC1) como en presencia (EAC2) de quitosano, debido a que los valores de la media geométrica del diámetro medio,  $D_{m.g.}$ , y su intervalo de confianza,  $IC_{95\%}$ , se mantuvieron prácticamente constantes durante 72 h a 25 °C. Estos resultados también reflejaron la importante reducción del tamaño de gota por la incorporación de quitosano. En conclusión, los resultados mostraron que ambas emulsiones, EAC1 y EAC2, se podrían considerar estables a 25 °C durante un periodo de 72 h. Esto indicaría que una temperatura de 25

°C podría considerarse idónea para la realización de proceso de entrecruzamiento del quitosano.

A parte de la estabilidad de las emulsiones, se tuvieron que considerar otros factores como la cinética del proceso de entrecruzamiento. En estos sistemas, la temperatura puede presentar una gran influencia en la cinética de entrecruzamiento del quitosano [Moura, 2007; Matricardi, 2008; Chang, 2009; Bonino, 2011; Miras, 2013b] y por lo tanto, en el tiempo necesario para obtener los materiales de quitosano. Se realizaron estudios previos mediante reología a través de ensayos oscilatorios de deformación, como se indica en el Apartado 3.3.3.1, para hacer un seguimiento de la cinética de entrecruzamiento a 25 °C (composición EAC3, con genipina, mostrada en Tabla 3.1). Los ensayos se llevaron a cabo hasta observar un valor máximo, observado a los 14 días, indicando que el proceso de entrecruzamiento se había completado (Figura 4.8).



**Figura 4.8** Valores del módulo elástico en la zona de viscoelasticidad lineal ( $G'_{LVR}$ ) en función del tiempo a 25 °C para la emulsión EAC3 a 700 rpm, obtenidos mediante ensayos oscilatorios de deformación. Todas las medidas se realizaron a una frecuencia constante de 2 Hz.

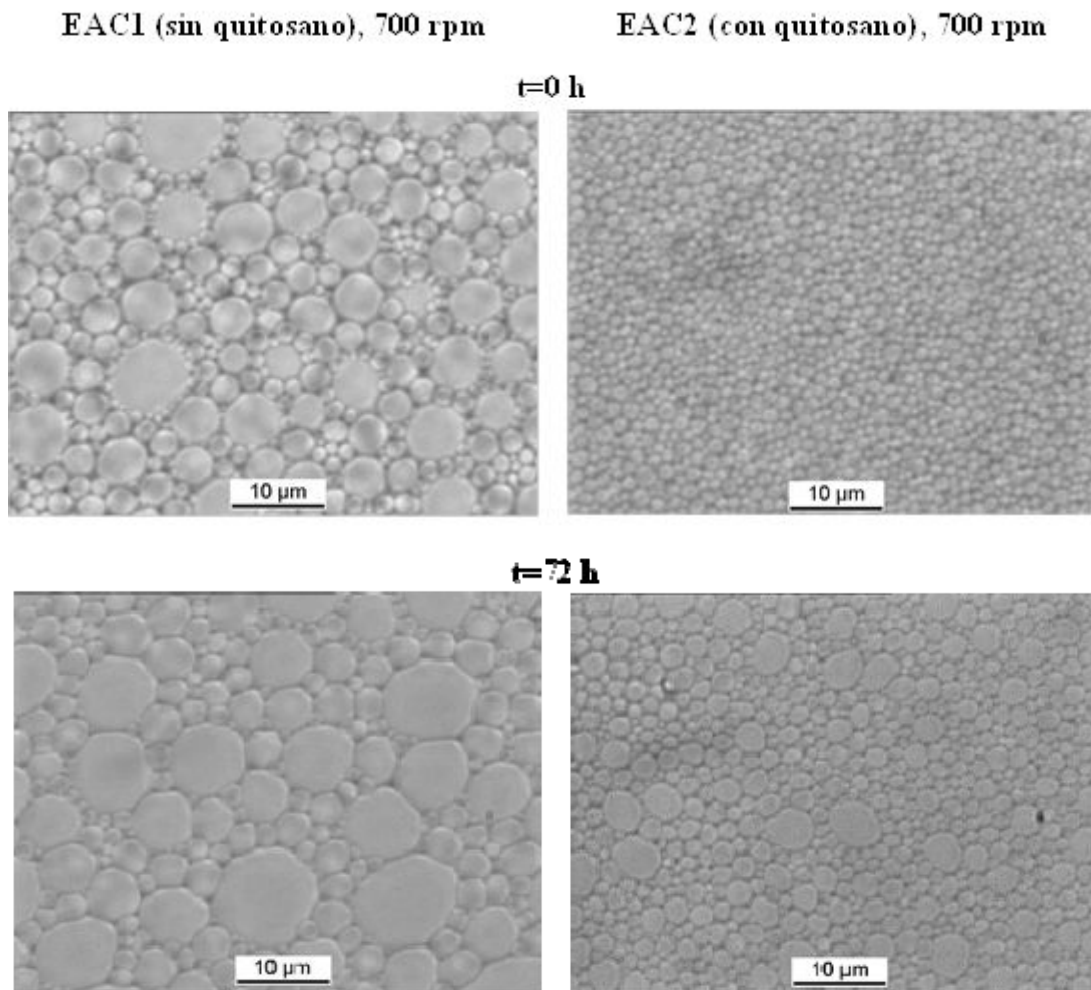
Estos resultados indicaron que la temperatura influía de forma importante en la cinética de entrecruzamiento del quitosano. Un trabajo previo [Miras, 2011] mostró que las emulsiones eran estables a 25 °C. No obstante, se concluyó que el proceso de entrecruzamiento se completaba en un periodo de tiempo demasiado prolongado (~12 días) y por lo tanto, poco viable para la síntesis de estos materiales. Por este motivo, los siguientes estudios se realizaron a una temperatura superior, 40 °C.

#### **4.2.2 Influencia del quitosano, de la velocidad de agitación y del tiempo en el tamaño de gota**

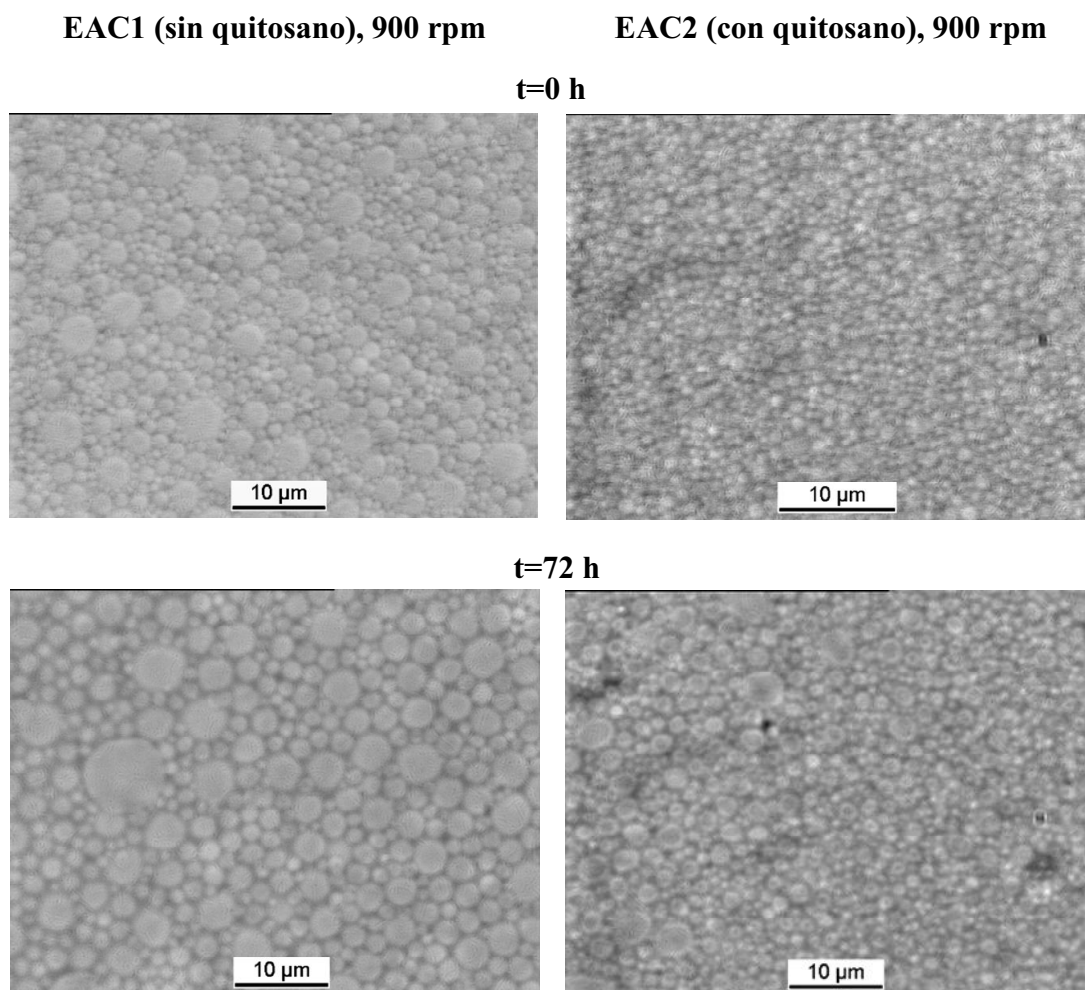
A partir de los resultados obtenidos mediante reología a 25 °C presentados en el apartado anterior, se decidió realizar el estudio de la influencia de la presencia de quitosano en la estabilidad de las emulsiones altamente concentradas a 40 °C. Diversos estudios han demostrado que la presencia de quitosano puede influir de forma importante en la estabilidad de las emulsiones [Schulz, 1998; Mun, 2005; Calero 2013]. Esta temperatura fue seleccionada para llevar a cabo el proceso de entrecruzamiento del quitosano con la genipina para obtener las espumas de quitosano (ver Apartado 3.3.3.2). Las emulsiones altamente concentradas utilizadas como medios de reacción EAC1 y EAC2 (Tabla 3.1) se prepararon a tres velocidades de agitación: 700, 900 y 1200 rpm para analizar su influencia en el tamaño de gota. Para ello, ambas composiciones (EAC1 y EAC2) se caracterizaron mediante microscopía óptica y reología durante un periodo de 72 h a 40 °C.

##### **4.2.2.1 Microscopía óptica**

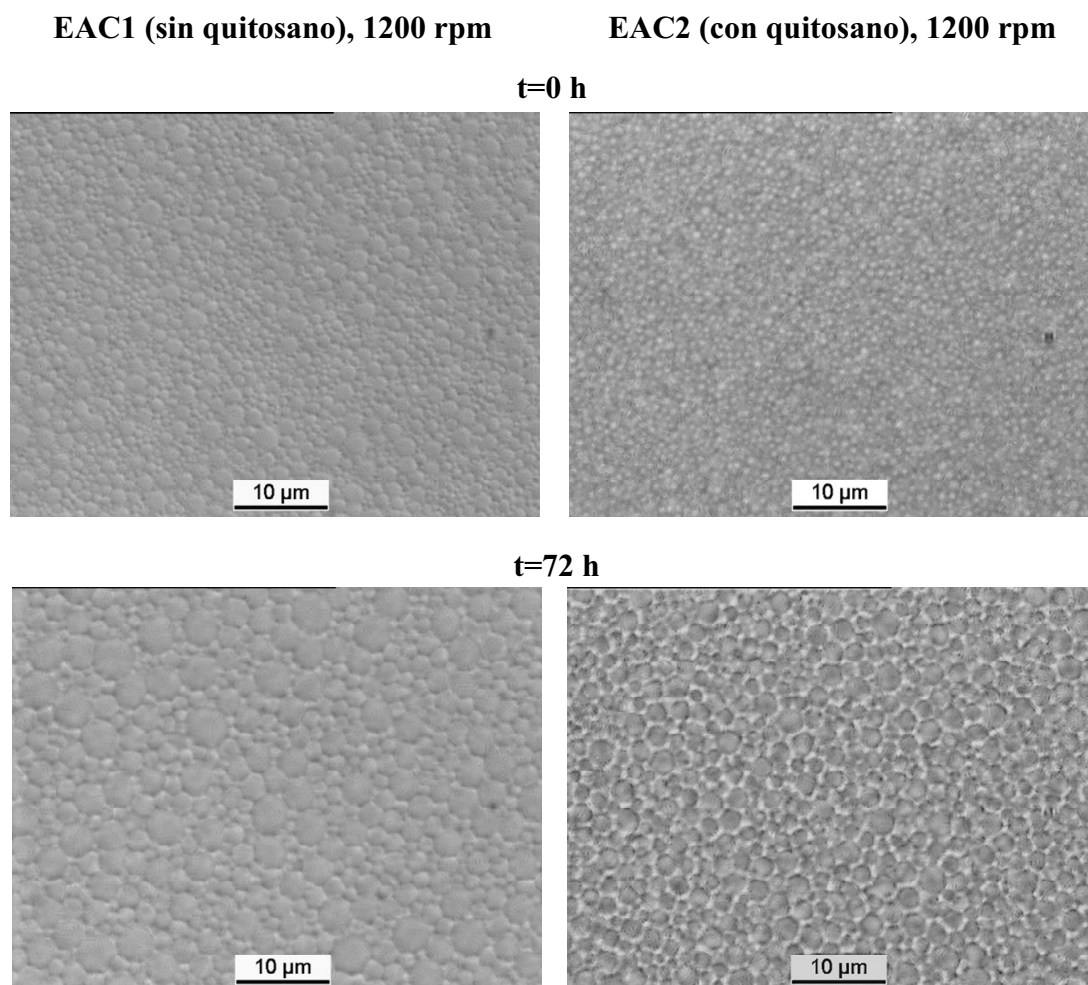
En primer lugar, las emulsiones se caracterizaron mediante microscopía óptica. Como ejemplo, se muestran las fotografías de las emulsiones sin y con quitosano, EAC1 y EAC2 respectivamente, a  $t = 0$  h y  $t = 72$  h para las tres velocidades de agitación analizadas (Figura 4.11 - Figura 4.11). Las imágenes de microscopía muestran claramente la influencia producida por la adición del quitosano, que produce una reducción considerable del tamaño de gota, efecto también observado a 25 °C (Apartado 4.2.1). También se observa la influencia de la velocidad de agitación, que al aumentar provoca una reducción de tamaño de gota. Además, tiene lugar un ligero incremento del tamaño de gota de 0 a 72 h, en ambas composiciones y a las tres velocidades de agitación, hecho que indica una ligera desestabilización de las emulsiones.



**Figura 4.9** Fotografías de microscopía óptica de las emulsiones EAC1 (sin quitosano) y EAC2 (con quitosano a tiempos  $t = 0$  h y  $t = 72$  h a  $40$  °C para una velocidad de agitación de 700 rpm.



**Figura 4.10** Fotografías de microscopía óptica de las emulsiones EAC1 (sin quitosano) y EAC2 (con quitosano a tiempos  $t = 0$  h y  $t = 72$  h a  $40$  °C para una velocidad de agitación de 900 rpm.



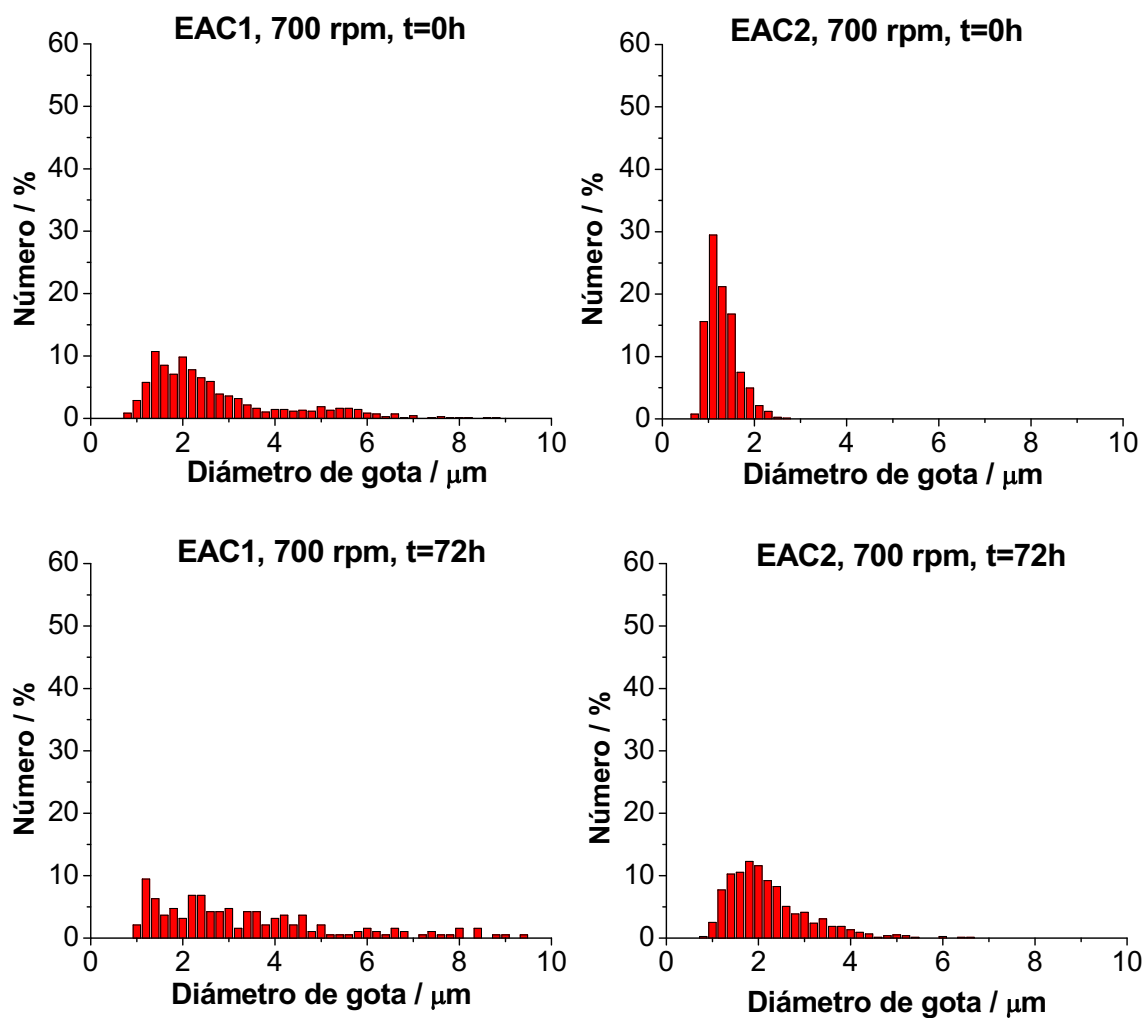
**Figura 4.11** Fotografías de microscopía óptica de las emulsiones EAC1 (sin quitosano) y EAC2 (con quitosano a tiempos  $t = 0$  h y  $t = 72$  h a  $40$  °C para una velocidad de agitación de 1200 rpm.

Con fines comparativos, las emulsiones preparadas a 700 rpm también se caracterizaron mediante difracción de luz láser para obtener la distribución de tamaño de gota a  $40$  °C en función del tiempo, en ausencia (EAC1) y presencia de quitosano (EAC2). Mediante esta técnica de caracterización, se observó un fenómeno de floculación de las emulsiones. Dicho trabajo se describió en mayor detalle en el trabajo de máster [Miras, 2011] y, posteriormente, en el artículo publicado en 2013 [Miras, 2013] Aunque la técnica de difracción de luz láser permite una medida rápida y precisa para la obtención de la distribución de tamaño de gota de una emulsión, consiguiendo medir tamaños de gota a partir de  $\sim 500$  nm, es necesaria la dilución del sistema estudiado para su caracterización. En conclusión, los resultados obtenidos muestran que la técnica de difracción de luz láser impide un correcto seguimiento de la variación del tamaño de

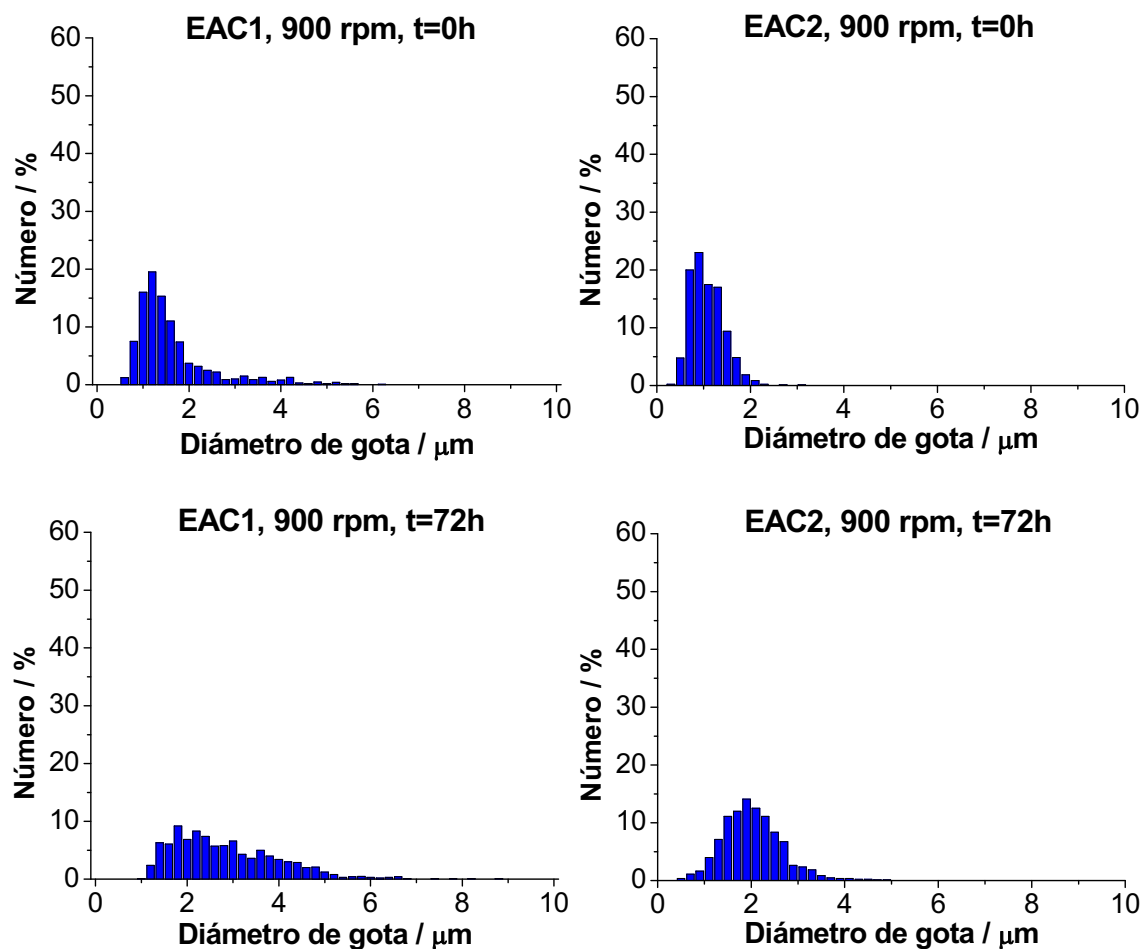


gota en función del tiempo. Por todo ello, las distribuciones de tamaño de gota de las emulsiones estudiadas se obtuvieron a partir de las fotografías de microscopía óptica. Este método no requiere la dilución de la emulsión previa a la caracterización y se consigue una medida directa del tamaño de gota. Sin embargo, la microscopía óptica podría no considerar tamaños de gota inferiores a 1  $\mu\text{m}$ , debido al límite de resolución del equipo.

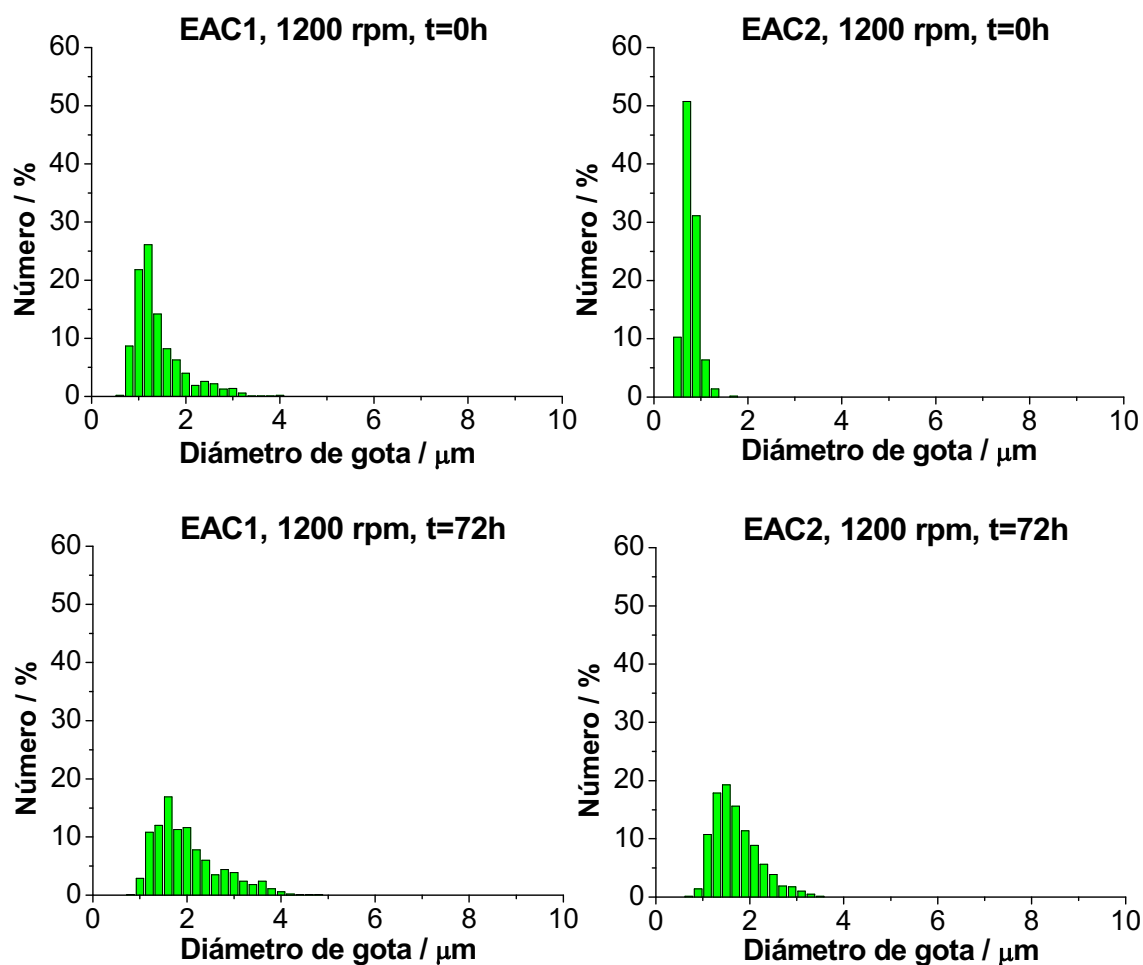
Los histogramas obtenidos mediante microscopía óptica muestran un claro desplazamiento de la población a tamaños de gota inferiores, cuando se incorpora quitosano a la emulsión (Figura 4.12, Figura 4.13 y Figura 4.14 a 700, 900 y 1200 rpm, respectivamente). También se observa que con la presencia de quitosano se obtiene una reducción importante de la polidispersidad. El incremento de la velocidad de agitación produce un efecto similar, desplazando el tamaño de gota a valores inferiores y obteniendo emulsiones de menor polidispersidad. Este efecto se observó con mayor claridad en las emulsiones con quitosano (EAC2).



**Figura 4.12** Distribuciones de tamaño de gota, en número (%), de las emulsiones EAC1 (sin quitosano) y EAC2 (con quitosano a tiempos  $t = 0\text{ h}$  y  $t = 72\text{ h}$ , a  $40\text{ }^\circ\text{C}$ , para una velocidad de agitación de 700 rpm, obtenidas a partir de las imágenes de microscopía óptica.



**Figura 4.13** Distribuciones de tamaño de gota, en número (%), de las emulsiones EAC1 (sin quitosano) y EAC2 (con quitosano a tiempos  $t = 0$  h y  $t = 72$  h, a  $40$   $^{\circ}\text{C}$ , para una velocidad de agitación de 900 rpm, obtenidas a partir de las imágenes de microscopía óptica.



**Figura 4.14** Distribuciones de tamaño de gota, en volumen (%), de las emulsiones EAC1 (sin quitosano) y EAC2 (con quitosano a tiempos  $t = 0$  h y  $t = 72$  h, a  $40$  °C, para una velocidad de agitación de 1200 rpm, obtenidas a partir de las imágenes de microscopía óptica.

A partir de las distribuciones obtenidas por microscopía óptica se calculó la media geométrica del diámetro de gota,  $D_{m.g.}$  (Ecuación 3.7), y el correspondiente intervalo de confianza,  $IC$  (Ecuación 3.8), a los tiempos 0, 24, 48 y 72 h. Debido a que la variable diámetro de gota muestra una distribución asimétrica con cola a la derecha (Figura 4.12 - Figura 4.14), la media aritmética no es buen estadístico de centralidad, por lo que se calculó la media geométrica ( $D_{m.g.}$ ). Los resultados para las composiciones EAC1 (sin quitosano) y para EAC2 (con quitosano) se muestran en la Tabla 4.2.

**Tabla 4.2** Media geométrica del diámetro de gota,  $D_{m.g.}$  ( $\mu m$ ), e intervalo de confianza del 95%,  $IC_{95\%}$ , para las emulsiones EAC1 (sin quitosano) y EAC2 (con quitosano) en función de la velocidad de agitación y del tiempo.

		$D_{m.g.}$ ( $IC_{95\%}$ ) / $\mu m$			
		t = 0 h	t = 24 h	t = 48 h	t = 72 h
<b>EAC1</b>	<b>700 rpm</b>	2,36 (2,27-2,45)	2,68 (2,59-2,79)	3,06 (2,92-3,20)	2,86 (2,73-3,00)
	<b>900 rpm</b>	1,48 (1,44-1,52)	2,71 (2,63-2,78)	2,64 (2,57-2,70)	2,63 (2,56-2,69)
	<b>1200 rpm</b>	1,22 (1,19-1,24)	1,60 (1,57-1,63)	1,73 (1,70-1,76)	1,78 (1,74-1,82)
<b>EAC2</b>	<b>700 rpm</b>	1,23 (1,21-1,25)	1,63 (1,60-1,66)	1,60 (1,57-1,64)	2,05 (2,00-2,11)
	<b>900 rpm</b>	1,02 (0,99-1,04)	1,35 (1,31-1,38)	1,43 (1,39-1,46)	1,94 (1,89-1,98)
	<b>1200 rpm</b>	0,76 (0,75-0,77)	1,03 (1,02-1,05)	1,25 (1,22-1,27)	1,64 (1,61-1,67)

A partir del diámetro de gota obtenido mediante las mediciones de microscopía óptica, se realizó un análisis estadístico de las variables involucradas que se muestra en el siguiente apartado.

4.2.2.1.1 Análisis estadístico para los sistemas Solución ácido acético / Solución reguladora de fosfatos / Synperonic A7 / Decano y Quitosano / Solución reguladora de fosfatos / Synperonic A7 / Decano

Tal y como se comentó en el apartado Experimental 3.3.3.1 (subapartado Análisis estadístico), la variable diámetro de gota no presentaba una distribución Normal( $\mu, \sigma^2$ ), por lo que tuvo que ser transformada aplicando el logaritmo neperiano. Para evaluar si la distribución del logaritmo neperiano del diámetro de gota se podía considerar igual para las diferentes categorías de los factores (presencia de quitosano, velocidad de agitación y tiempo), se utilizaron las pruebas no paramétricas del test de la suma de rangos de Wilcoxon [Wilcoxon 1945] y del test de Kruskal-Wallis [Kruskal 1957]. Se fijó el nivel de significación  $\alpha = 0,05$ . Los resultados muestran que hay evidencias estadísticamente significativas de que la distribución del logaritmo neperiano del diámetro de gota no es la misma para las categorías de cada uno de estos tres factores

(Anexos, apartado 8.1). En el caso del quitosano, la distribución del logaritmo neperiano del diámetro de gota es menor en presencia de quitosano. En función del tiempo, esta distribución aumenta de 0 a 72 h. Realizando las comparaciones dos a dos (Anexos, apartado 8.1), se encontraron diferencias estadísticamente significativas para todas las comparaciones después de ajustar por comparaciones múltiples, usando el método False Discovery Rate [Simes, 1986; Benjamini, 1995; Benjamini, 2001]. Estos resultados señalan que la distribución es significativamente distinta entre cada par de tiempos comparados. En cuanto a la velocidad de agitación, la distribución es significativamente diferente para las distintas categorías, siendo menor a la velocidad más alta.

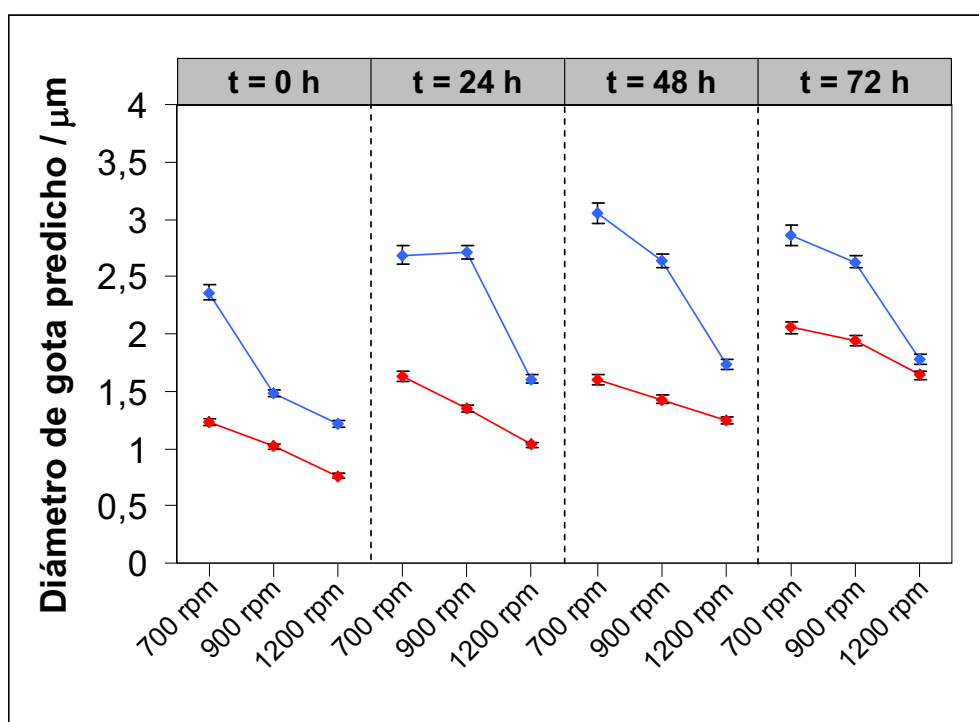
Mediante el modelo de regresión lineal múltiple, totalmente empírico, se evaluó la influencia conjunta de los tres factores (presencia de quitosano, velocidad de agitación y tiempo) y sus interacciones de segundo y tercer orden sobre el logaritmo neperiano del diámetro de gota [Kleinbaum, 1988; Peña, 2002; Mitchell, 2012]. De este modo, se ajustó una ecuación lineal (Ecuación 4.1) que permitió estimar los efectos de los factores en la variación del diámetro de gota medio (Anexos, Tabla 8.1 en apartado 8.2). Mediante este modelo, el 48,4 % de la variabilidad del logaritmo neperiano del diámetro de gota fue explicado por los tres factores introducidos y sus interacciones de segundo y tercer orden. La ecuación empírica es la siguiente:

$$\begin{aligned} \ln(\text{diámetro de gota}) = & 0,859 + (-0,465)*900 \text{ rpm} + (-0,662)*1200 \text{ rpm} \\ & + (-0,650)*\text{siCHT} + 0,129*24\text{h} + 0,259*48\text{h} + 0,192*72\text{h} + 0,272*900 \\ & \text{rpm}*\text{siCHT} + 0,181*1200 \text{ rpm}*\text{siCHT} + 0,475*900 \text{ rpm}*24\text{h} + \\ & 0,317*900 \text{ rpm}*48\text{h} + 0,381*900 \text{ rpm}*72\text{h} + 0,147*1200 \text{ rpm}*24\text{h} + \\ & 0,093*1200 \text{ rpm}*48\text{h} + 0,187*1200 \text{ rpm}*72\text{h} + 0,150*24\text{h}*\text{siCHT} + \\ & 0,004*48\text{h}*\text{siCHT} + 0,319*72\text{h}*\text{siCHT} + (-0,470)*900 \text{ rpm}*\text{siCHT}*24\text{h} \\ & + (-0,240)*900 \text{ rpm}*\text{siCHT}*48\text{h} + (-0,246)*900 \text{ rpm}*\text{siCHT}*72\text{h} + \\ & (-0,124)*1200 \text{ rpm}*\text{siCHT}*24\text{h} + 0,136*1200 \text{ rpm}*\text{siCHT}*48\text{h} + \\ & 0,068*1200 \text{ rpm}*\text{siCHT}*72\text{h} \end{aligned} \quad \text{Ecuación 4.1}$$

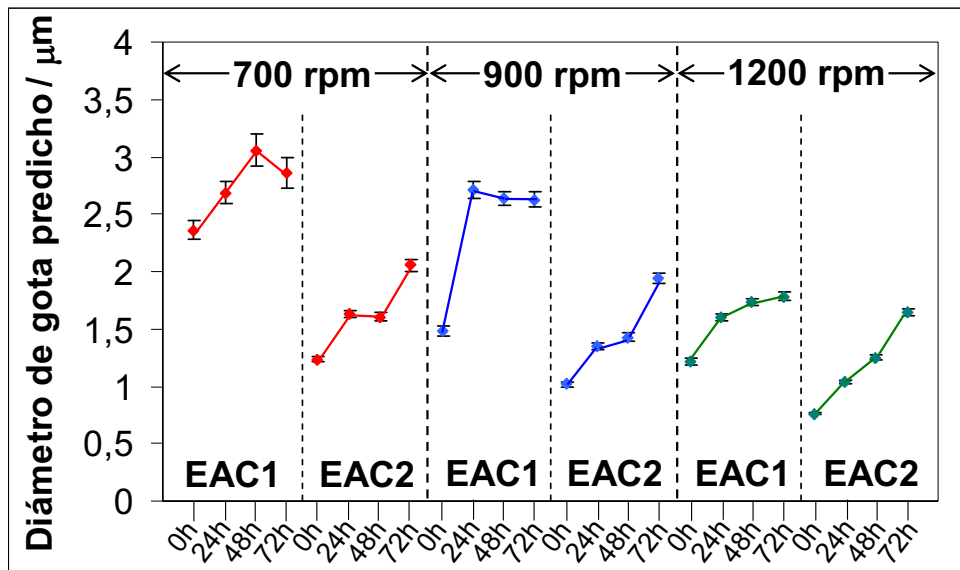
donde “siCHT” indica las composiciones en presencia de quitosano.

En el modelo de regresión lineal múltiple, todos los factores, las interacciones de segundo orden y la interacción de tercer orden resultaron estadísticamente significativas. Debido a la significación de la interacción de tercer orden, no es posible interpretar por separado cada uno de los factores, sino que hay que interpretar los resultados cuando se combinan los niveles de los tres.

A partir del modelo obtenido, se estimó el logaritmo neperiano del diámetro medio predicho. En STATA®, se obtiene mediante el comando *Margins* [Baum, 2006; Cameron, 2010; Software Stata: Release 12]. Los resultados se exponenciaron para expresarlos en términos de la variable diámetro de gota original y se presentan en la Figura 4.15 y la Figura 4.16. Los valores predichos por el modelo del diámetro de gota medio, junto con el intervalo de confianza, se muestran en la Tabla 4.3.



**Figura 4.15** Diámetro de gota predicho considerando las variables independientes quitosano, velocidad de agitación (700, 900 y 1200 rpm) y tiempo (0, 24, 48 y 72 h). En azul se indica la composición sin quitosano (EAC1) y en rojo en presencia de quitosano (EAC2).



**Figura 4.16** Valores de diámetro de gota predicho de las emulsiones sin quitosano (EAC1) y con quitosano (EAC2) a las tres velocidades de agitación estudiadas: 700, 900 y 1200 rpm. Cada serie indica los tiempos 0, 24, 48 y 72 h.

**Tabla 4.3** Estimación del diámetro medio de gota, con el intervalo del confianza del 95 %, calculado mediante el *Margins* de STATA®.

		t = 0 h	t = 24 h	t = 48 h	t = 72 h
700 rpm	EAC1	2,36 (2,27-2,45)	2,69 (2,59-2,79)	3,06 (2,92-3,20)	2,86 (2,73-3,00)
	EAC2	1,23 (1,21-1,25)	1,63 (1,60-1,66)	1,60 (1,57-1,64)	2,05 (2,00-2,11)
900 rpm	EAC1	1,48 (1,44-1,52)	2,71 (2,64-2,78)	2,64 (2,57-2,70)	2,63 (2,56-2,69)
	EAC2	1,02 (0,99-1,04)	1,35 (1,31-1,38)	1,43 (1,39-1,46)	1,94 (1,89-1,98)
1200 rpm	EAC1	1,22 (1,19-1,24)	1,60 (1,57-1,63)	1,73 (1,70-1,76)	1,78 (1,74-1,82)
	EAC2	0,76 (0,75-0,77)	1,03 (1,02-1,05)	1,25 (1,22-1,27)	1,64 (1,61-1,67)

Tal y como se puede observar en las Figura 4.15 y Figura 4.16, a t = 0 h, se observa una reducción del diámetro de gota medio predicho con el incremento de la velocidad de agitación, tanto en ausencia (EAC1) como en presencia de quitosano (EAC2). Sin embargo, dicha reducción es mayor en ausencia de quitosano, especialmente de 700 a 900 rpm. También se puede apreciar que el diámetro de gota medio predicho disminuye



en presencia de quitosano, al comparar los mismos tiempos y las mismas revoluciones. No obstante, esta diferencia de diámetro entre las composiciones EAC1 y EAC2 se reduce de 0 a 72 h, debido al incremento del diámetro de gota, ligeramente superior en presencia de quitosano (Figura 4.15). Las mayores diferencias entre las composiciones EAC1 y EAC2 se observan a 700 rpm para todos los tiempos y las menores diferencias se aprecian a 1200 rpm. Estos resultados estarían indicando una menor influencia de la presencia de quitosano con el incremento de la velocidad de agitación.

Los resultados obtenidos permiten alcanzar diversas conclusiones. El incremento de la velocidad de agitación o la incorporación de quitosano a la fase continua de las emulsiones producen una reducción significativa del diámetro de gota. En el primer caso, debido a un incremento de la energía introducida en el sistema durante el proceso de emulsificación y en el segundo caso, dicha reducción podría ser debida a diversos factores, como la variación de la tensión interfacial o de la viscosidad, que se discutirán posteriormente en mayor detalle. No obstante, la variación del diámetro de gota en función del tiempo es distinta en ausencia o presencia de quitosano, indicando una cinética diferente en la estabilidad de las emulsiones con composición EAC1 y EAC2.

A continuación, se analizan los posibles mecanismos de desestabilización de las emulsiones preparadas a las composiciones EAC1 y EAC2 mediante el estudio de la variación del diámetro de gota en función del tiempo (Tabla 4.2). También se discutirá el proceso involucrado en la reducción del tamaño de gota debido a la presencia de quitosano. No obstante, en primer lugar, se determinó la eficacia del proceso de emulsificación utilizado. A partir de la Ecuación 3.9 [Vilasau, 2011], presentada en la sección Experimental, es posible calcular un diámetro medio de gota teórico ( $D_{teórico}$ ) para determinar la eficacia de dicho proceso. Se obtuvo un valor de  $D_{teórico} = 0,46 \mu\text{m}$ , muy inferior a los valores de tamaño de gota obtenidos experimentalmente. Dicho valor, comparado con los resultados a  $t = 0$  h obtenidos a las tres velocidades de agitación (Tabla 4.2) y al haber fijado una concentración de tensioactivo superior a la CMC (2 %), podría indicar que sería posible reducir el diámetro de gota en este sistema aportando una mayor cantidad de energía durante el proceso de emulsificación.

A partir de los resultados obtenidos, se ha cuantificado la influencia del quitosano, la agitación durante el proceso de emulsificación y el tiempo, al predecir el valor del diámetro de gota teniendo en consideración estas variables. El ligero incremento del tamaño de gota medio observado y el diferente comportamiento detectado en ausencia y presencia de quitosano, ambos en función de tiempo, podrían ser debido a algún proceso de desestabilización de las emulsiones EAC1 y EAC2, que se estudia en el siguiente apartado.

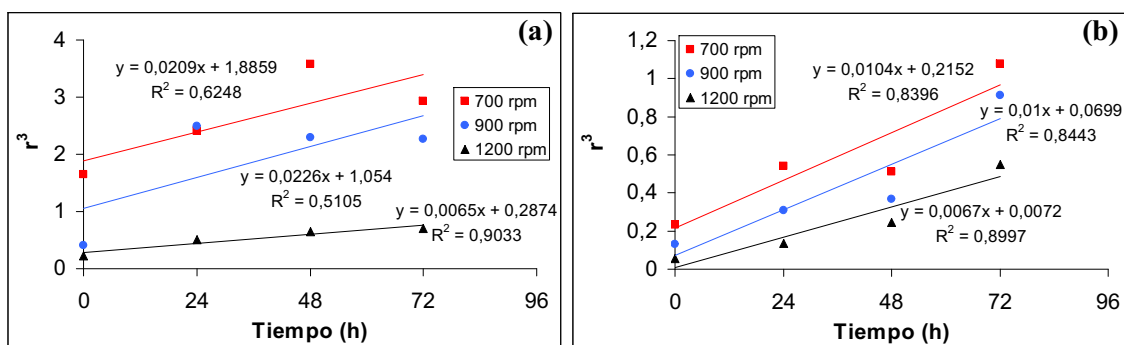
#### 4.2.2.1.2 *Determinación de los posibles mecanismos de desestabilización*

El leve proceso de desestabilización detectado en ambos sistemas, EAC1 y EAC2 (Ecuación 4.2), podría ser debido a coalescencia y/o maduración de Ostwald [Tadros, 1983]. Para conocer si la maduración de Ostwald era la principal causa del proceso de inestabilidad de las emulsiones, se representó para las dos composiciones y las tres velocidades de agitación el radio de gota al cubo ( $r^3$ ) en función del tiempo [Lifshitz, 1961; Wagner, 1961].

$$r^3 - r_0^3 = \frac{8}{9} \left[ \frac{S(\infty)\gamma V_m D}{\rho RT} \right] t \quad \text{Ecuación 4.2}$$

donde  $r$  es el radio de gota a tiempo  $t$ ,  $r_0$  es el radio de gota a tiempo inicial,  $\gamma$  es la tensión superficial,  $S(\infty)$  es la solubilidad en bulk de la fase dispersa en la fase continua,  $V_m$  es el volumen molar,  $D$  el coeficiente de difusión de la fase dispersa en la continua,  $R$  la constante de los gases ideales y  $T$  la temperatura.

Sin embargo, como se muestra en la Figura 4.17 (a y b), no se obtuvieron ajustes aceptables ni en las emulsiones sin quitosano (EAC1) ni en las emulsiones en presencia de quitosano (EAC2) para las tres velocidades estudiadas, aunque la presencia de quitosano produce un incremento importante de los ajustes obtenidos. No obstante, los bajos resultados presentados, entre 0,84 y 0,90, podrían mostrar que la maduración de Ostwald no era el principal mecanismo de desestabilización.



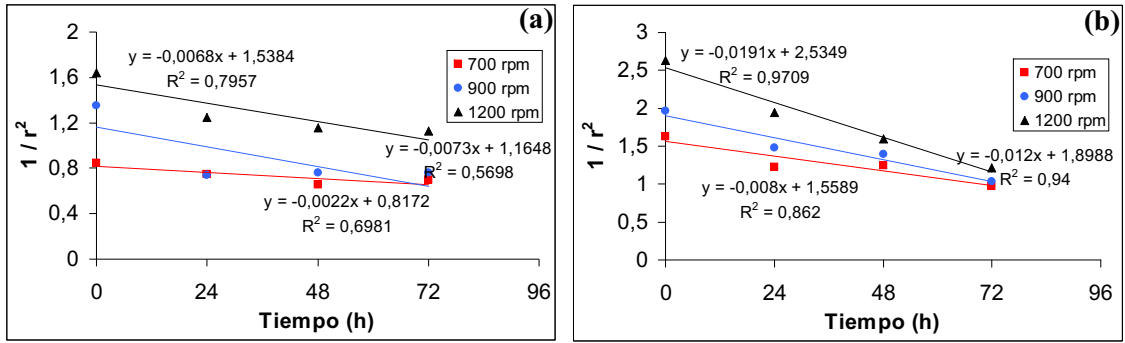
**Figura 4.17** Radio de gota al cubo ( $r^3$ ) en función del tiempo para (a) EAC1, sin quitosano, y (b) EAC2, con quitosano, a las tres velocidades de agitación: 700, 900 y 1200 rpm. Los valores de radio de gota se han calculado como las medias geométricas (Tabla 4.2).

Otro proceso de desestabilización que podría explicar el incremento del tamaño de gota de las emulsiones altamente concentradas es la coalescencia. En la bibliografía existen diferentes modelos que podrían explicar este proceso. Sin embargo, uno de los más utilizados es el modelo de Deminière [Deminière, 1998]. Dicho modelo explica la coalescencia mediante la ruptura del film que separa gotas adyacentes. Se forman fisuras o agujeros críticos entre gotas que producen la ruptura de los films estabilizadores de fase continua en la emulsión, generando el proceso de coalescencia. Este modelo se aplica a emulsiones concentradas y monodispersas y se ajusta a la Ecuación 4.3.

$$1/r^2 = 1/r_0^2 - (3\pi/8)\omega t \quad \text{Ecuación 4.3}$$

donde  $r$  es el radio de gota a tiempo  $t$ ,  $r_0$  es el radio de gota inicial y  $\omega$  es la frecuencia de ruptura por unidad de superficie del film.

El modelo de Deminière (Figura 4.18) presenta mejores ajustes que el modelo de maduración de Ostwald (Figura 4.17), principalmente para EAC2 a 900 y 1200 rpm, con un valor de  $R^2$  de 0,94-0,97. Son valores que podrían indicar la presencia de coalescencia como mecanismo de desestabilización de las emulsiones. No obstante, el menor valor observado en EAC2 a 700 rpm podría indicar también la presencia de otros mecanismos de desestabilización, que suceden de forma simultánea.



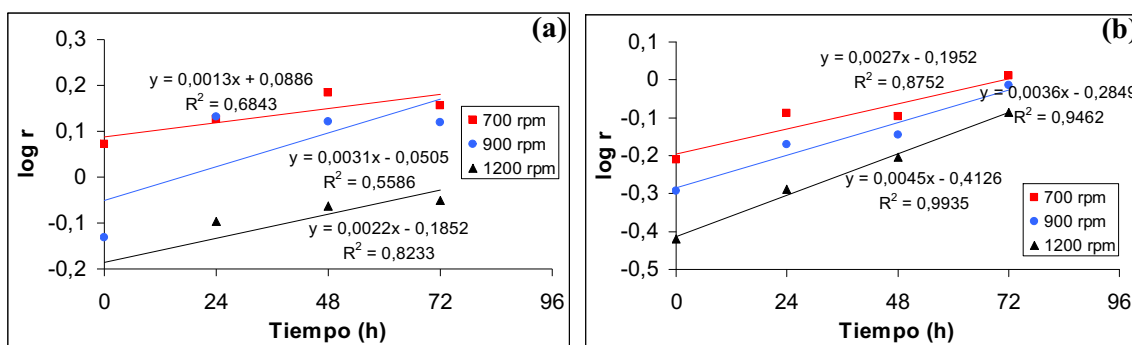
**Figura 4.18** Inverso del radio de gota al cuadrado ( $1/r^2$ ) en función del tiempo para (a) EAC1, sin quitosano, y (b) EAC2, con quitosano, a las tres velocidades de agitación: 700, 900 y 1200 rpm.

Otro modelo que podría explicar la desestabilización por coalescencia sería considerar que la velocidad de coalescencia de un sistema sigue una cinética de primer orden, dirigido por la ruptura del film de la fase continua de la emulsión que produce la separación de las gotas adyacentes [Cockbain, 1953; Lee, 1982; Tadros, 2010b]. Mediante dicho mecanismo, el tamaño de gota de la emulsión seguiría la Ecuación 4.4.

$$\log r = \log r_0 + kt \tag{Ecuación 4.4}$$

donde  $r$  es el radio de gota a tiempo  $t$ ,  $r_0$  es el radio de gota inicial y  $k$  es la velocidad de coalescencia.

En este caso (Figura 4.19), el logaritmo del radio en función del tiempo presenta valores muy similares en el ajuste lineal al modelo de Deminière. En el caso de EAC2, que presenta los mejores ajustes, este modelo de primer orden permite determinar los valores de velocidad de coalescencia ( $k$ , la pendiente de los ajustes lineales). Éstos muestran un incremento en función de la velocidad de agitación, indicando una mayor velocidad de coalescencia de 700 a 1200 rpm para EAC2. Además, ambos modelos muestran la misma tendencia, un mejor ajuste con el incremento de la velocidad de agitación. Estos resultados podrían indicar que el proceso de coalescencia es predominante a una mayor velocidad de agitación.



**Figura 4.19** Logaritmo del radio de gota ( $\log r$ ) en función del tiempo para (a) EAC1, sin quitosano, y (b) EAC2, con quitosano, a las tres velocidades de agitación: 700, 900 y 1200 rpm.

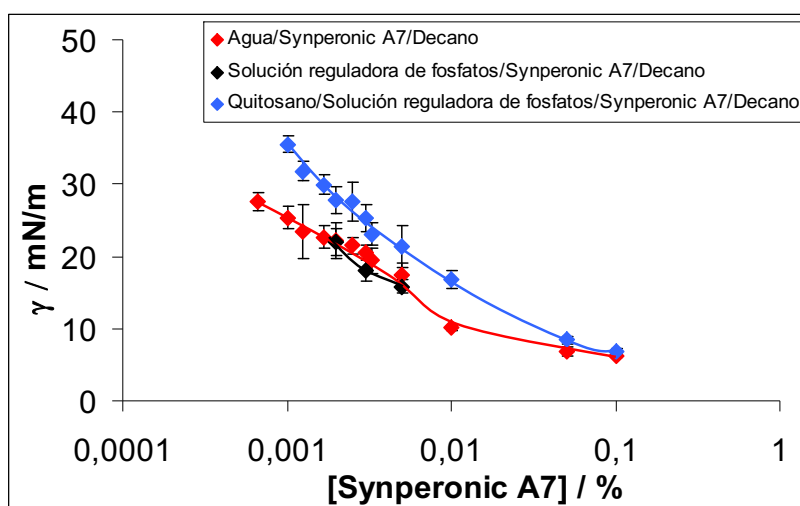
Aunque se ha atribuido a coalescencia el principal proceso de desestabilización de este sistema, estos resultados no pueden confirmar que también tengan lugar procesos simultáneos de maduración de Ostwald, debido a que los ajustes obtenidos no proporcionan buenos coeficientes de regresión. Se debería realizar un estudio en mayor profundidad y con más puntos experimentales (incremento del periodo temporal de caracterización o reducción del intervalo entre puntos) para confirmar si el proceso que rige la variación del tamaño de gota en función del tiempo es debido únicamente a coalescencia o tienen lugar también otros procesos simultáneos. En conclusión, estos resultados muestran que la presencia de quitosano produce una leve inestabilidad de las emulsiones que podría ser debido a coalescencia y maduración de Ostwald, ocurriendo estos dos mecanismos de forma simultánea. Existen diversos factores que pueden haber influido en dicha inestabilidad. Los principales podrían ser la fracción de volumen de la fase dispersa, la carga superficial de la fase dispersa, el diámetro de gota, la concentración de quitosano, el pH o la fuerza iónica [Pinotti, 2001; Mun, 2005]. No obstante, la desestabilización es lenta, y se consideró que las emulsiones eran suficientemente estables y por lo tanto, adecuadas para ser utilizadas como medios de reacción en la preparación de espumas de quitosano.

Como se comentó con anterioridad, los resultados obtenidos para las composiciones en ausencia y presencia de quitosano, EAC1 y EAC2, respectivamente, indicaron una importante reducción del tamaño de gota de las emulsiones producida por la incorporación de quitosano (Tabla 4.2). Una posible explicación sería la adsorción de las moléculas de quitosano en la interfase de la emulsión, que produciría una disminución de la tensión interfacial y en consecuencia, una reducción del tamaño de

gota. Para estudiar dicha posibilidad, se realizaron medidas de tensión interfacial de las composiciones EAC1 y EAC2.

#### 4.2.2.2 Tensión interfacial

Para estudiar la posible reducción de la tensión interfacial debido a la presencia de quitosano, se realizaron medidas de tensión interfacial, en función de la concentración de tensioactivo. Los detalles experimentales se describen en el apartado 3.3.3.1. Los sistemas estudiados fueron Agua / Synperonic A7 / Decano, Solución reguladora de fosfatos / Synperonic A7 / Decano y Quitosano / Solución reguladora de fosfatos / Synperonic A7 / Decano. Estos sistemas se seleccionaron porque constituyen las fases de las emulsiones EAC1 y EAC2 (Figura 4.20).



**Figura 4.20** Tensión interfacial para los sistemas Agua / Synperonic A7 / Decano; Solución reguladora de fosfatos / Synperonic A7 / Decano y Quitosano / Solución reguladora de fosfatos / Synperonic A7 / Decano.

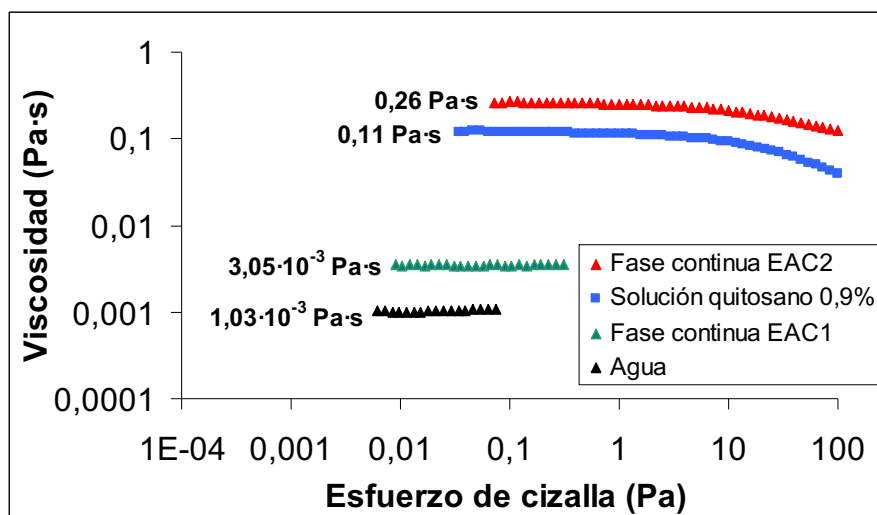
Las medidas de tensión interfacial muestran que la incorporación del quitosano no disminuye los valores de la tensión interfacial sino que, por el contrario, produce un ligero aumento (Figura 4.20). A concentraciones de tensioactivo alrededor de 0,1 %, los valores de tensión interfacial en presencia de quitosano tienden a igualarse a los obtenidos en el sistema sin quitosano. Estos resultados ponen de manifiesto que el quitosano prácticamente no se adsorbe en la superficie de las gotas de la emulsión debido a que el tensioactivo presenta mayor afinidad superficial. El quitosano es un polisacárido con grupos amino e hidroxilo. Esta molécula, al poseer cierto carácter

anfifílico, se podría haber adsorbido en la interfase e interactuar con otros compuestos anfifílicos. No obstante, a pH relativamente bajo (inferior al  $pK_a$  del quitosano, 6,5), los grupos amino se protonan ( $NH_3^+$ ) y producen un incremento del carácter hidrófilo del quitosano [Schulz, 1998; Pepić, 2008]. Esto genera un aumento de la tensión interfacial, que se refleja en una mayor variación del diámetro de gota,  $D_{m.g.}$ , en función del tiempo en las emulsiones en presencia de quitosano (Tabla 4.2).

Otro factor que podría explicar la reducción de tamaño de gota debido a la presencia de quitosano es la viscosidad de la fase continua de las emulsiones. Una mayor viscosidad de la fase continua de una emulsión puede producir un incremento de la cizalla durante el proceso de emulsificación (el esfuerzo se obtiene del producto entre el gradiente de velocidad y la viscosidad), y reducir el tamaño de gota a una misma velocidad de agitación [Walstra, 1983; Tadros, 2009b; Miras, 2013b, Martínez-Rodríguez, 2014]. Posiblemente, este fenómeno es el que produce un menor tamaño de gota al incorporar el quitosano. Dada la gran importancia de la reología en el presente sistema, se realizó un estudio en profundidad de las propiedades reológicas.

#### **4.2.2.3 Reología**

Primero, se realizaron ensayos reológicos de flujo para determinar la viscosidad de los componentes de la fase continua de las emulsiones estudiadas (Figura 4.21). Se determinó la viscosidad de los sistemas constituidos por agua, fase continua de las emulsiones EAC1 (solución acuosa al 10 % de Synperonic A7), solución de quitosano al 0,9 % (porcentaje correspondiente al quitosano presente en las emulsiones) y fase continua de las emulsiones EAC2 (solución acuosa al 10 % de Synperonic A7, solución de quitosano al 0,9 % y solución reguladora de fosfatos).



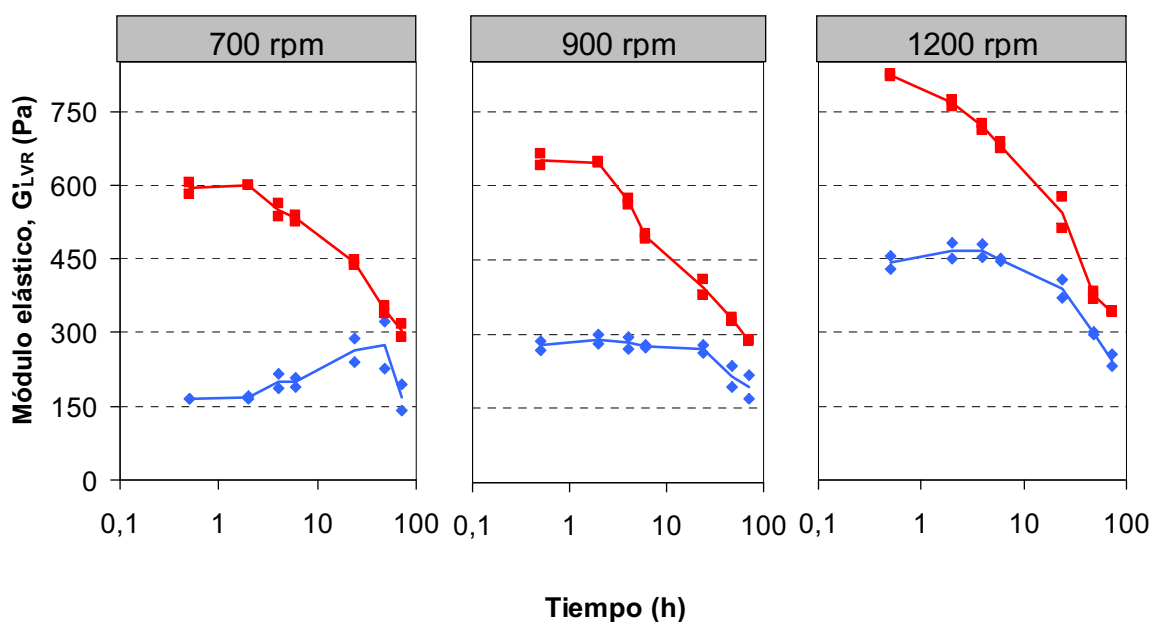
**Figura 4.21** Ensayos de flujo en estado estacionario de los sistemas agua, fase continua de las emulsiones EAC1, Solución de quitosano 0,9 % y fase continua de las emulsiones EAC2.

Como se puede observar en la Figura 4.21, los sistemas agua y fase continua de EAC1 muestran un comportamiento newtoniano con valores de viscosidad constantes en la región estudiada. No obstante, la adición del 10 % de tensioactivo produce un ligero incremento de la viscosidad del sistema de  $1,03 \cdot 10^{-3}$  a  $3,50 \cdot 10^{-3}$  Pa·s. La incorporación del quitosano conlleva un importante incremento de la viscosidad, obteniendo viscosidades de 0,11 Pa·s para la solución de quitosano y 0,26 Pa·s para la fase continua de EAC2. Además, al incorporar quitosano, se observa un cambio de comportamiento, de newtoniano a pseudoplástico, con una disminución de la viscosidad a esfuerzos de cizalla superiores a 5 Pa. También se observa, al comparar los valores de viscosidad de agua con fase continua EAC1 y solución de quitosano 0,9 % con fase continua EAC2, que la incorporación del tensioactivo produce un incremento de la viscosidad que podría indicar algún tipo de interacción con el quitosano. En conclusión, al comparar las viscosidades de ambas fases continuas, se observó que la incorporación de quitosano produjo un importante incremento de la viscosidad de  $3,50 \cdot 10^{-3}$  a 0,26 Pa·s. Por lo tanto, este incremento en viscosidad debido a la presencia de quitosano explicaría la reducción de tamaño de gota de las emulsiones [Walstra, 1983; Tadros, 2009b; Miras, 2013b, Martínez-Rodríguez, 2014]. Numerosos artículos han descrito que los principales parámetros que controlan las propiedades viscoelásticas de las emulsiones altamente concentradas son el volumen de fase dispersa ( $\phi$ ) y el tamaño de gota [Barnes, 1994; Pal, 1996; Malkin, 2004; Derkack, 2009]. En el caso de las emulsiones con el tensioactivo Synperonic A7, en ausencia o presencia de quitosano, las emulsiones se prepararon con



una fracción de volumen de fase dispersa ( $\phi = 0,8$ ) y aporte de energía al sistema (tiempo de emulsificación) constantes. Por ello, el principal parámetro responsable de la reducción del tamaño de gota fue el incremento de viscosidad de la fase continua de las emulsiones debido a la presencia de quitosano. Dicho incremento de viscosidad produce un aumento de la deformación de las gotas para un mismo esfuerzo o aporte de energía aplicado al sistema, dando lugar a una reducción del tamaño de gota.

La reología también se utilizó para estudiar el efecto producido por la presencia de quitosano y la velocidad de agitación en la estabilidad de estas emulsiones. Se realizaron ensayos oscilatorios para determinar el módulo elástico en la zona de viscoelasticidad lineal ( $G'_{LVR}$ ) para los dos sistemas estudiados, EAC1 (sin quitosano) y EAC2 (con quitosano), en función del tiempo y a las tres velocidades de agitación utilizadas, como se describe detalladamente en el Apartado 3.3.3.1. Estos resultados se presentan en la Figura 4.22, indicando las dos medidas realizadas para cada tiempo (0,5, 2, 4, 6, 24, 48 y 72 h). Se traza una línea que pasa por el punto medio de estas medidas y se representa el eje temporal (eje X) en escala logarítmica, para mostrar de forma clara la evolución del módulo elástico a tiempos cortos.



**Figura 4.22** Valores del módulo elástico en la región de viscoelasticidad lineal ( $G'_{LVR}$ ) en función del tiempo en escala logarítmica: EAC1 (en ausencia de quitosano) en azul y EAC2 (en presencia de quitosano) en rojo para las velocidades de agitación de 700, 900 y 1200 rpm. Todas las medidas se realizaron a una frecuencia constante de 1 Hz.

A partir de los valores experimentales del módulo elástico ( $G'_{LVR}$ ), se realizó un análisis estadístico de las variables involucradas. En primer lugar, se evaluó si existían diferencias estadísticamente significativas en el módulo elástico ( $G'_{LVR}$ ) para las diferentes categorías de los factores (presencia de quitosano, velocidad de agitación y tiempo). Para ello, se utilizaron las pruebas no paramétricas del test de la suma de rangos de Wilcoxon [Wilcoxon, 1945] y del test de Kruskal-Wallis [Kruskal, 1957]. Los resultados obtenidos, presentados gráficamente utilizando diagramas de caja o *box-plots* (Anexos, apartado 8.3) muestran que existen diferencias significativas del  $G'_{LVR}$  para las categorías de cada uno de los tres factores. El módulo elástico disminuye de forma significativa con el tiempo y aumenta con la velocidad de agitación y la presencia de quitosano. Realizando las comparaciones dos a dos, se encontraron diferencias estadísticamente significativas de la velocidad 1200 con 700 y 900 rpm, pero no entre 700 y 900 rpm.

La variable  $G'_{LVR}$  no presentaba distribución Normal( $\mu, \sigma^2$ ) ni simétrica, ni siquiera transformándola. Por este motivo, no se pudo aplicar un modelo de regresión lineal. Se optó por realizar una regresión de cuantiles modelizando la mediana (cuantil 50) [Koenker, 2005]. Sin embargo, el número de datos experimentales no era suficiente para ajustar un modelo de regresión válido.

Dado que el número de determinaciones es pequeño, no tenemos evidencias estadísticamente significativas sobre la influencia conjunta de los tres factores, pero sí se puede describir la tendencia observada en los datos. Los resultados mostrados en la Figura 4.22 ponen de manifiesto que la emulsión preparada a menor velocidad de agitación (700 rpm) presenta un leve incremento del módulo elástico ( $G'_{LVR}$ ) que podría ser debido a un proceso de floculación [Pal, 1997, Tadros, 2004a]. Este proceso de floculación podría producirse por el mayor diámetro de gota,  $D_{m.g.} = 2,4 \mu\text{m}$ , a  $t = 0$  h (Tabla 4.2) [Tadros, 2010a], en comparación con el tamaño de gota obtenido con las otras velocidades de agitación:  $1,5 \mu\text{m}$  (900 rpm) y  $1,2 \mu\text{m}$  (1200 rpm). A partir de las 48 h, se observa una ligera disminución del módulo elástico, que podría implicar la presencia de un proceso de coalescencia y maduración de Ostwald de forma simultánea a tiempos largos. Dichos resultados coinciden con los obtenidos mediante microscopía óptica en los que se observó un incremento del tamaño de gota hasta 48 h, seguido de

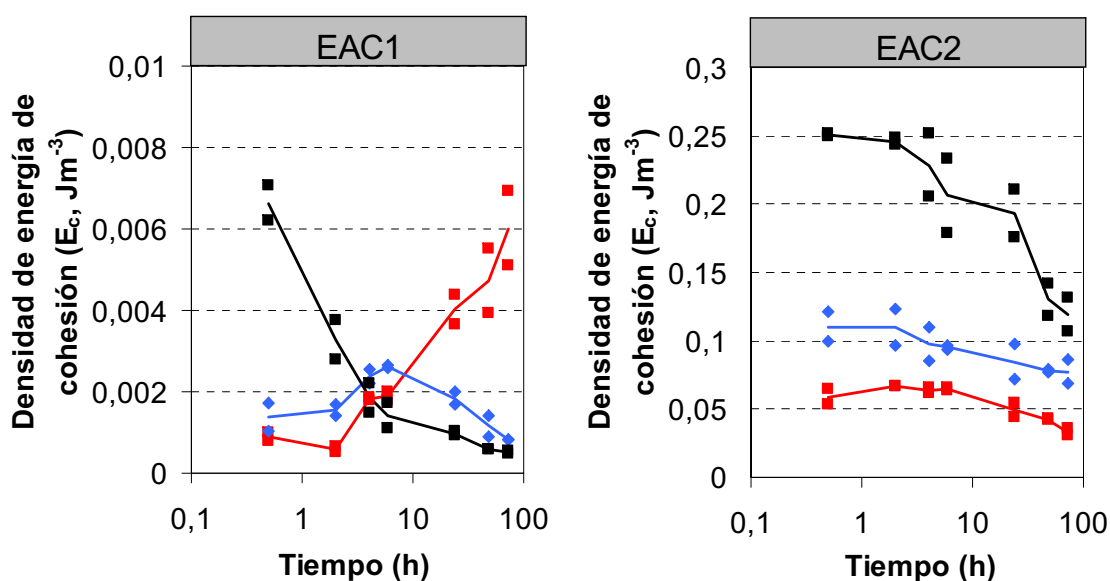
una leve reducción de tamaño. Además, las medidas de reología han permitido detectar otros mecanismos de desestabilización (floculación en EAC1 a 700 rpm). Este mecanismo de desestabilización no se podría identificar mediante microscopía, en emulsiones altamente concentradas, sin modificar el sistema mediante dilución. Anteriormente se discutió en profundidad que la dilución de estas emulsiones altamente concentradas podría alterar su estabilidad (apartado 4.2.2.1).

Al incrementar la velocidad de agitación durante el proceso de emulsificación a 900 rpm (EAC1 900 rpm), la emulsión presenta una tenue reducción de  $G'_{LVR}$  a partir de 24 h. Este comportamiento indicaría una mayor estabilidad cinética de las emulsiones sin quitosano a 900 rpm. Al aumentar la velocidad de agitación a 1200 rpm, se obtiene una emulsión con menor diámetro de gota (Tabla 4.2) y esto se refleja en un incremento considerable de los valores del módulo elástico, sobretodo a tiempos cortos. Sin embargo, se observa una disminución de  $G'_{LVR}$  con el tiempo, que se relaciona con el incremento del tamaño de gota [Pal, 1996; Langenfeld, 1999; Tadros, 2004a; Masalova, 2011].

La incorporación de quitosano en las emulsiones (EAC2) produce la reducción del diámetro de gota, que provoca un importante incremento de los valores de  $G'_{LVR}$ , mostrando claramente la influencia del quitosano en las propiedades reológicas de las emulsiones. No obstante, éstas muestran una disminución de  $G'_{LVR}$  en función del tiempo para las tres velocidades de agitación estudiadas, indicando una menor estabilidad que en las emulsiones sin quitosano. Estos resultados apoyan a los obtenidos en el estudio de la variación del diámetro de gota en función del tiempo (Tabla 4.2), si se comparan con los valores obtenidos en ausencia de quitosano. Esta menor estabilidad de las emulsiones, debido a la adición de quitosano, puede justificarse por los valores de tensión superficial obtenidos (Apartado 4.2.2.2). La presencia de quitosano produce un incremento de la tensión interfacial, debido a un mayor carácter hidrófilo del quitosano a pH ácido, por la protonación de sus grupos amino ( $\text{NH}_3^+$ ) [Schulz, 1998; Pepić, 2008]. Dicho incremento en la tensión interfacial ha generado una disminución de la estabilidad de estas emulsiones altamente concentradas en presencia de quitosano, que mediante reología se ha mostrado como una mayor variación de  $G'_{LVR}$  en función del tiempo.

En función de la velocidad de agitación, se puede apreciar que las emulsiones que presentan una mayor variación del módulo elástico  $G'_{LVR}$  con el tiempo son las preparadas a 1200 rpm, tanto en ausencia como en presencia de quitosano (EAC1 y EAC2, respectivamente). Anteriormente, se ha comentado que los principales procesos de desestabilización de las emulsiones podrían ser coalescencia y maduración de Ostwald, actuando de forma simultánea. Esta mayor desestabilización de las emulsiones de menor tamaño de gota podría estar relacionada con la presión de Laplace (Ecuación 1.8) y con la influencia del proceso de maduración de Ostwald. Al disminuir el tamaño de gota, aumenta la presión de Laplace y por lo tanto, también aumenta la difusión o solubilidad de la fase interna de la gota a la fase externa (Ecuación 1.11), favoreciendo la desestabilización de una emulsión por maduración de Ostwald [Weers, 1998].

Un método alternativo para determinar la estabilidad de las emulsiones consiste en realizar un seguimiento de la variación de la densidad de la energía de cohesión en función del tiempo (Ecuación 3.10, apartado 3.3.3.1) [Sohm 1989; Tadros, 1990]. La densidad de energía de cohesión es un parámetro muy útil para caracterizar el grado de estructuración de una emulsión. Se analizó la variación de la densidad de energía de cohesión ( $E_c$ ) para los dos sistemas estudiados en función del tiempo. Los resultados se muestran en la Figura 4.23 a las tres velocidades de agitación utilizadas: 700 (rojo), 900 (azul) y 1200 rpm (negro) y mostrando las dos medidas realizadas para cada tiempo (0,5, 2, 4, 6, 24, 48 y 72 h). En este caso, en comparación con los resultados mostrados de  $G'_{LVR}$ , los valores de  $E_c$  se dividen para EAC1 (sin quitosano) y EAC2 (con quitosano) y no en función de la velocidad de agitación debido a la diferente escala mostrada por las dos composiciones de más de un orden de magnitud.



**Figura 4.23** Valores de densidad de energía de cohesión ( $E_c$ ) en función del tiempo en escala logarítmica para EAC1 (en ausencia de quitosano) y EAC2 (en presencia de quitosano) a 700 (rojo), 900 (azul) y 1200 rpm (negro). Las líneas unen los valores medios obtenidos para cada valor de tiempo.

Los resultados reflejan una tendencia similar a la obtenida a partir de los valores de  $G'_{LVR}$  pero se aprecian con mayor claridad los procesos involucrados en la estabilidad de estas emulsiones. La emulsión preparada en ausencia de quitosano a 700 rpm (EAC1 700 rpm) presenta un incremento de  $E_c$  con el tiempo que indica de forma concluyente un aumento de la floculación de las gotas debido a la presencia de fuerzas atractivas entre ellas. No obstante, las emulsiones preparadas a 900 rpm no evidencian cambios destacables de  $E_c$  con el tiempo, demostrando la estabilidad de la emulsión preparada a dicha velocidad de agitación. Sin embargo, las emulsiones obtenidas a 1200 rpm muestran una disminución exponencial de  $E_c$  con el tiempo, causado probablemente por un proceso de coalescencia y maduración de Ostwald. El incremento del tamaño de gota da lugar a una reducción en el número de contactos entre gotas que podría causar esta disminución de  $E_c$ . [Tadros, 2010b]. Las emulsiones preparadas en presencia de quitosano (EAC2) presentan ligeras disminuciones de  $E_c$  con el tiempo, a velocidades de agitación bajas o intermedias (700 y 900 rpm). Sin embargo, las emulsiones preparadas a 1200 rpm muestran una mayor reducción de  $E_c$  con el tiempo, que indica una mayor velocidad de desestabilización a 1200 rpm, probablemente debido a una mayor influencia de la maduración de Ostwald a diámetros de gota inferiores, como también reflejaron los resultados de  $G'_{LVR}$  (Figura 4.22).

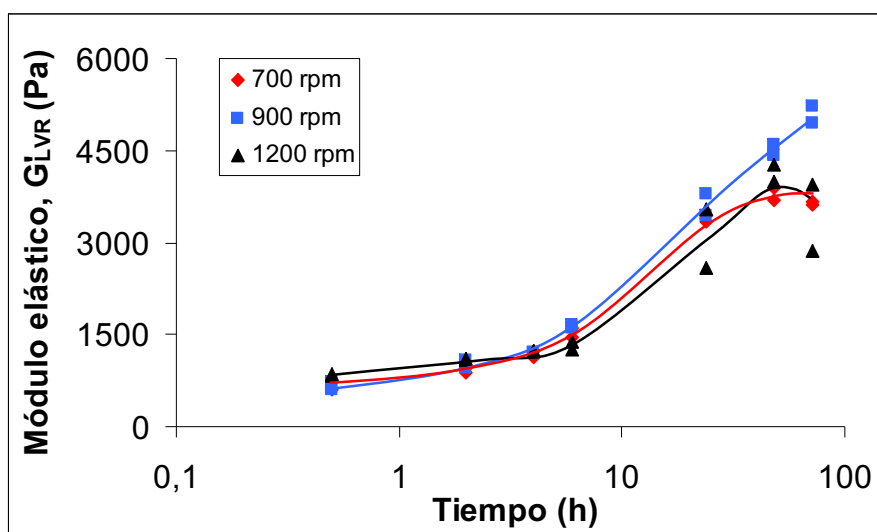
El estudio y caracterización del sistema Solución de quitosano / Solución reguladora de fosfatos / Synperonic A7 / Decano ha mostrado que las emulsiones en presencia de quitosano (EAC2) pueden considerarse suficientemente estables y, por lo tanto, un sistema viable para su utilización como medios de reacción en la obtención de espumas de quitosano. Por ello, a continuación, se caracterizó mediante ensayos reológicos el proceso de entrecruzamiento del quitosano, al incorporar el entrecruzante genipina en la composición de las emulsiones (EAC3, Tabla 3.1). Como en el caso de las emulsiones EAC1 y EAC2, este estudio también se realizó a las mismas velocidades de agitación: 700, 900 y 1200 rpm, mediante ensayos oscilatorios y de fluencia.

#### 4.2.3 Estabilidad y cinética del proceso de entrecruzamiento del quitosano

Los procesos de entrecruzamiento han sido ampliamente estudiados en diversos sistemas, como los hidrogeles, mediante la realización de ensayos reológicos en los que se determina la variación de las propiedades viscoelásticas de un sistema en función del tiempo o de la temperatura [Moura, 2007; Matricardi, 2008; Chang, 2009; Bonino, 2011, Miras, 2013b]. La realización de ensayos oscilatorios permite determinar parámetros característicos como el tiempo de gelificación ( $t_g$ ), tiempo necesario para la formación de una estructura debido a algún tipo de reacción de entrecruzamiento. Dicho proceso implica la evolución de un sistema viscoso, donde el módulo viscoso ( $G''$ ) es superior al elástico ( $G'$ ), a otro sistema viscoelástico o elástico, donde  $G'$  es superior a  $G''$ . A un determinado tiempo, ambos valores coinciden y a este punto se le conoce como tiempo de gelificación ( $t_g$ ) [Kavanagh, 1998, Calvet, 2004; Moura, 2007; Weng, 2007; Fatimi 2008; Bonino, 2011]. Sin embargo, este parámetro no se puede determinar en procesos de entrecruzamiento que tienen lugar en la fase externa de emulsiones altamente concentradas, debido a que estas emulsiones ya presentan propiedades viscoelásticas desde su formación [Tadros, 1994; Malkin, 2004; Masalova, 2011]. El módulo elástico ( $G'$ ) es superior al módulo viscoso ( $G''$ ), característica que impide la determinación del tiempo de gelificación.

En el caso de las emulsiones altamente concentradas se puede estudiar la cinética de entrecruzamiento del quitosano, que tiene lugar en la fase externa de las emulsiones, a 40 °C durante 72 h. Este tipo de procesos conlleva un incremento del módulo elástico ( $G'$ ) con el tiempo, que indica que la reacción de entrecruzamiento del quitosano tiene

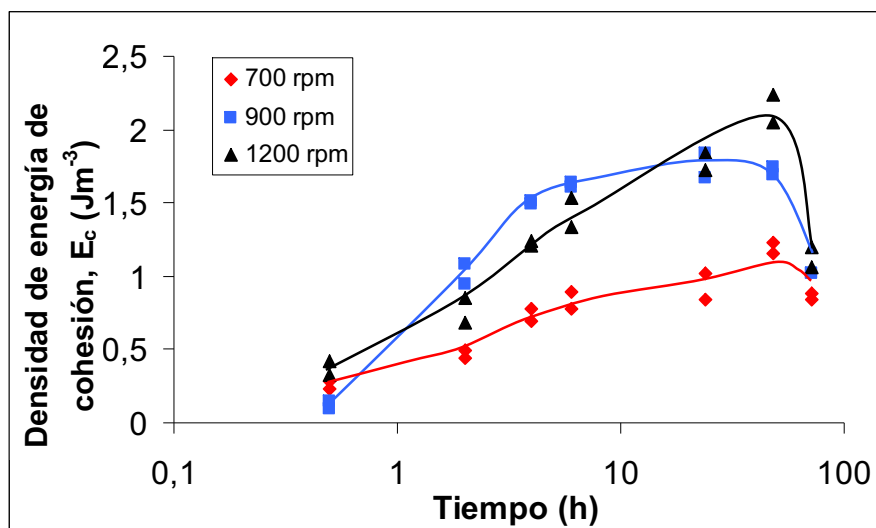
lugar. Dicho entrecruzamiento se caracterizó mediante ensayos oscilatorios de deformación (Apartado 3.3.3.2). Para ello, se determinó la variación del módulo elástico en la zona de viscoelasticidad lineal ( $G'_{LVR}$ ) en función del tiempo para las emulsiones EAC3 (Tabla 3.1), aquellas que contienen quitosano y genipina como entrecruzante. Los resultados de  $G'_{LVR}$  se muestran en la Figura 4.24 para las tres velocidades de agitación estudiadas al representar dos réplicas para cada tiempo (0,5, 2, 4, 6, 24, 48 y 72 h).



**Figura 4.24** Valores del módulo elástico en la zona de viscoelasticidad lineal ( $G'_{LVR}$ ) en función del tiempo en escala logarítmica para las emulsiones EAC3 a velocidades de agitación de 700, 900 y 1200 rpm obtenidos mediante ensayos oscilatorios de deformación. Todas las medidas se realizaron a una frecuencia constante de 2 Hz.

Los resultados presentan un gran incremento de  $G'_{LVR}$ , en función del tiempo debido al proceso de entrecruzamiento. Estos resultados podrían mostrar una dependencia del módulo elástico de la velocidad de agitación utilizada a partir de 48 h. Como indicaron los ensayos oscilatorios para las emulsiones sin genipina (EAC1 y EAC2, Figura 4.22 y Figura 4.23), las emulsiones preparadas a 700 y 1200 rpm presentaban una menor estabilidad que las preparadas a 900 rpm. En los ensayos realizados para EAC3 (Figura 4.24), las emulsiones preparadas a 700 y 1200 rpm muestran una leve disminución del módulo elástico a partir de 48 h, que podría ser debido a algún proceso de desestabilización del sistema. Para 900 rpm, no se observa ningún plateau a las 72 h, que indicaría que el proceso de entrecruzamiento no ha finalizado.

Como en los sistemas EAC1 (sin quitosano) y EAC2 (con quitosano), además del módulo elástico, también se compararon los valores de densidad de energía de cohesión ( $E_c$ ) para el sistema EAC3 (con quitosano y genipina). Como se aprecia en la Figura 4.25, la tendencia obtenida para  $E_c$  es similar a la observada para  $G'_{LVR}$ . No obstante, en este caso, las tres velocidades de agitación muestran un posible proceso de desestabilización a partir de las 48 h.



**Figura 4.25** Valores de la densidad de energía de cohesión ( $E_c$ ) en función del tiempo en escala logarítmica para las emulsiones EAC3 a velocidades de agitación de 700, 900 y 1200 rpm obtenidos mediante ensayos oscilatorios de deformación.

Otro tipo de ensayos reológicos que permiten investigar el proceso de entrecruzamiento del quitosano son los ensayos de fluencia [Gilsenan, 2001; Marsich, 2007; Topuz, 2009]. Este tipo de ensayos permite identificar las características reológicas del sistema mediante la aplicación de un esfuerzo y determinar así su comportamiento reológico entre viscoso, viscoelástico o elástico (mostrado en Introducción, apartados 1.3.2.2 y 1.5.3.1). Para caracterizar el proceso de entrecruzamiento mediante ensayos de fluencia, éstos se realizaron a esfuerzos constantes de 10 Pa (Figura 4.26) y 40 Pa (Figura 4.27) en función del tiempo de entrecruzamiento (0, 2, 4, 6, 24, 48 y 72 h) para las emulsiones EAC3 preparadas a las tres velocidades de agitación (700, 900 y 1200 rpm). Dichos valores no son muy elevados para evitar la ruptura de la estructura y así poder realizar el estudio del proceso de entrecruzamiento en función del tiempo.



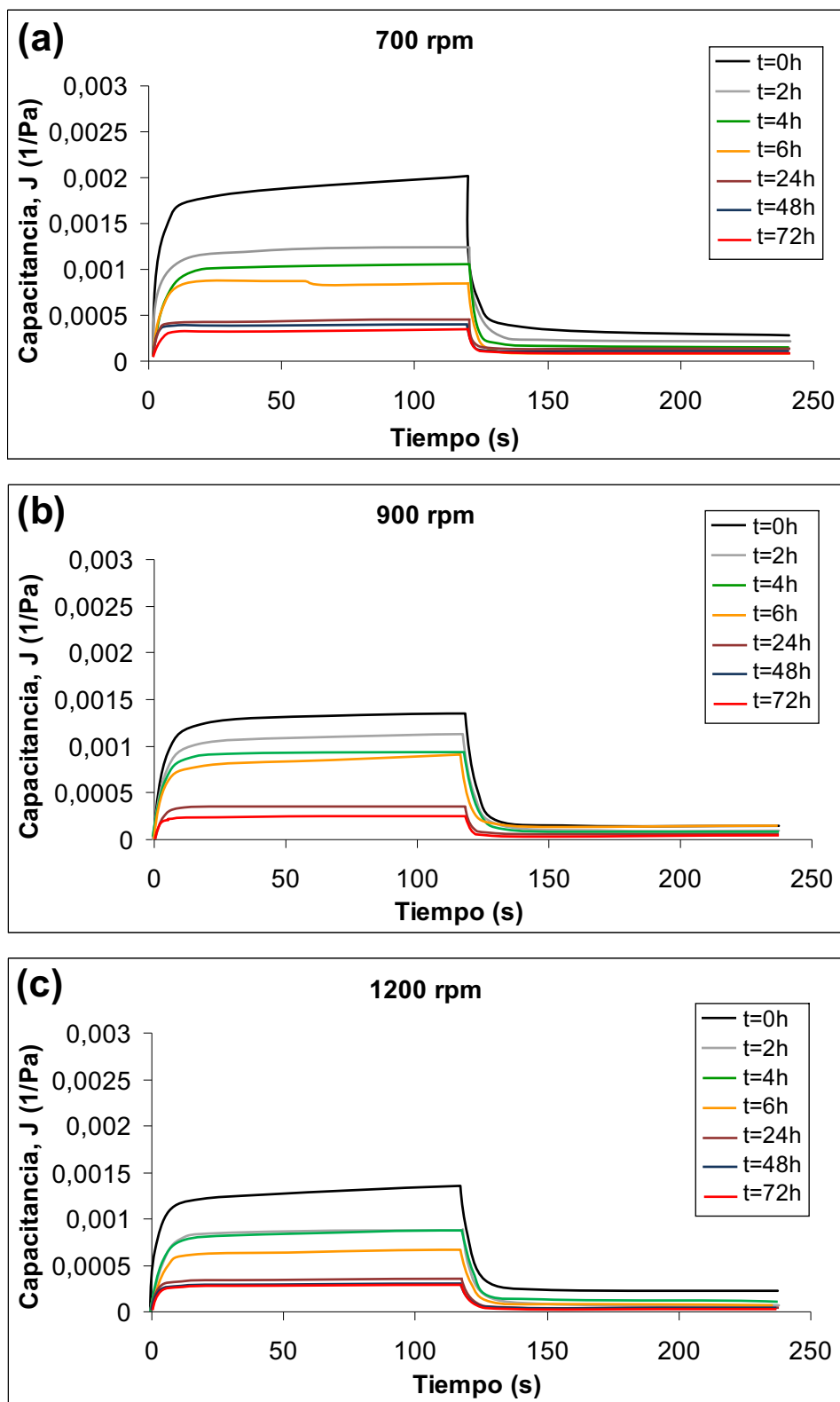
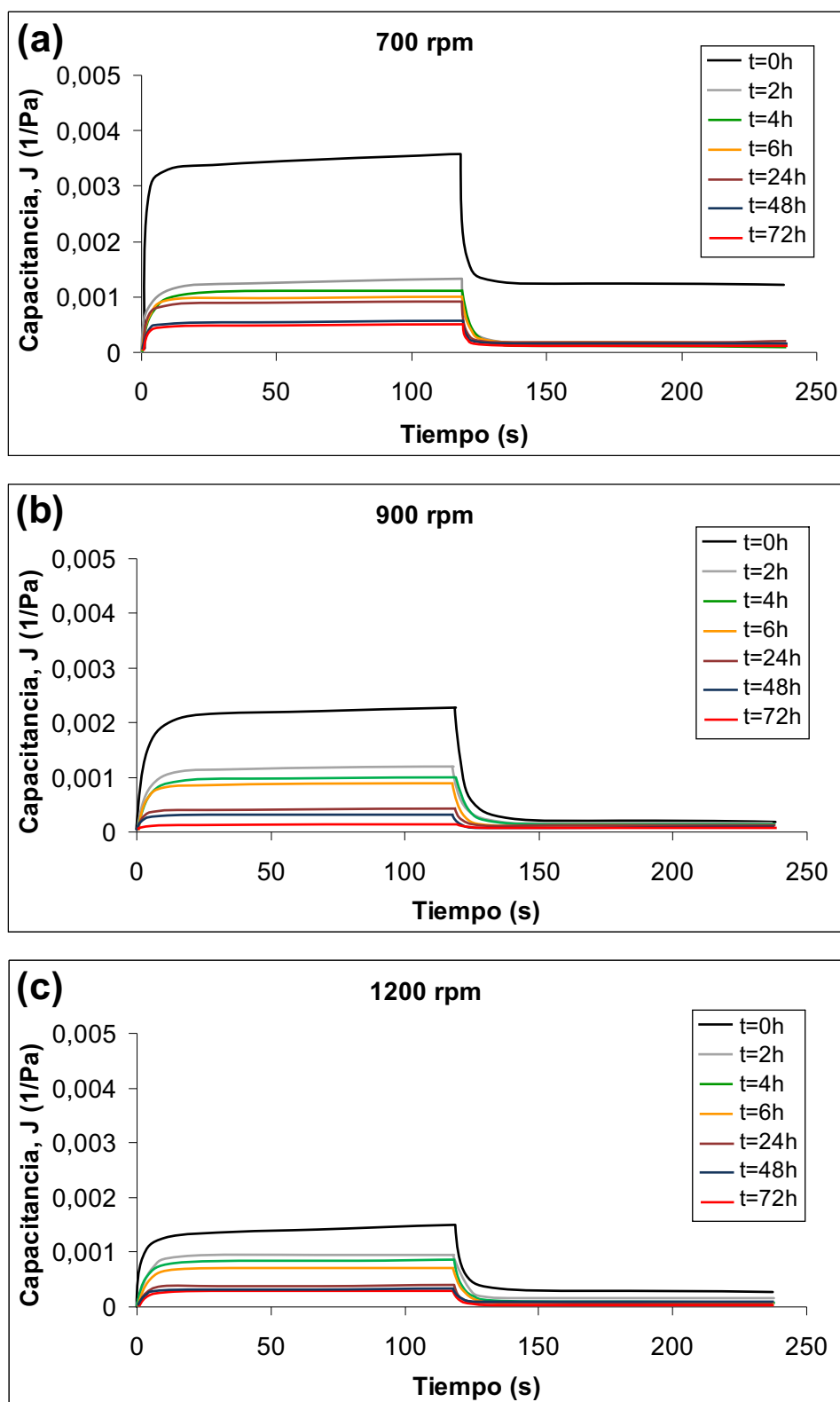


Figura 4.26 Medidas de fluencia para un esfuerzo de cizalla aplicado de 10 Pa y posterior recuperación para las emulsiones EAC3 preparadas a velocidades de agitación de (a) 700, (b) 900 y (c) 1200 rpm.



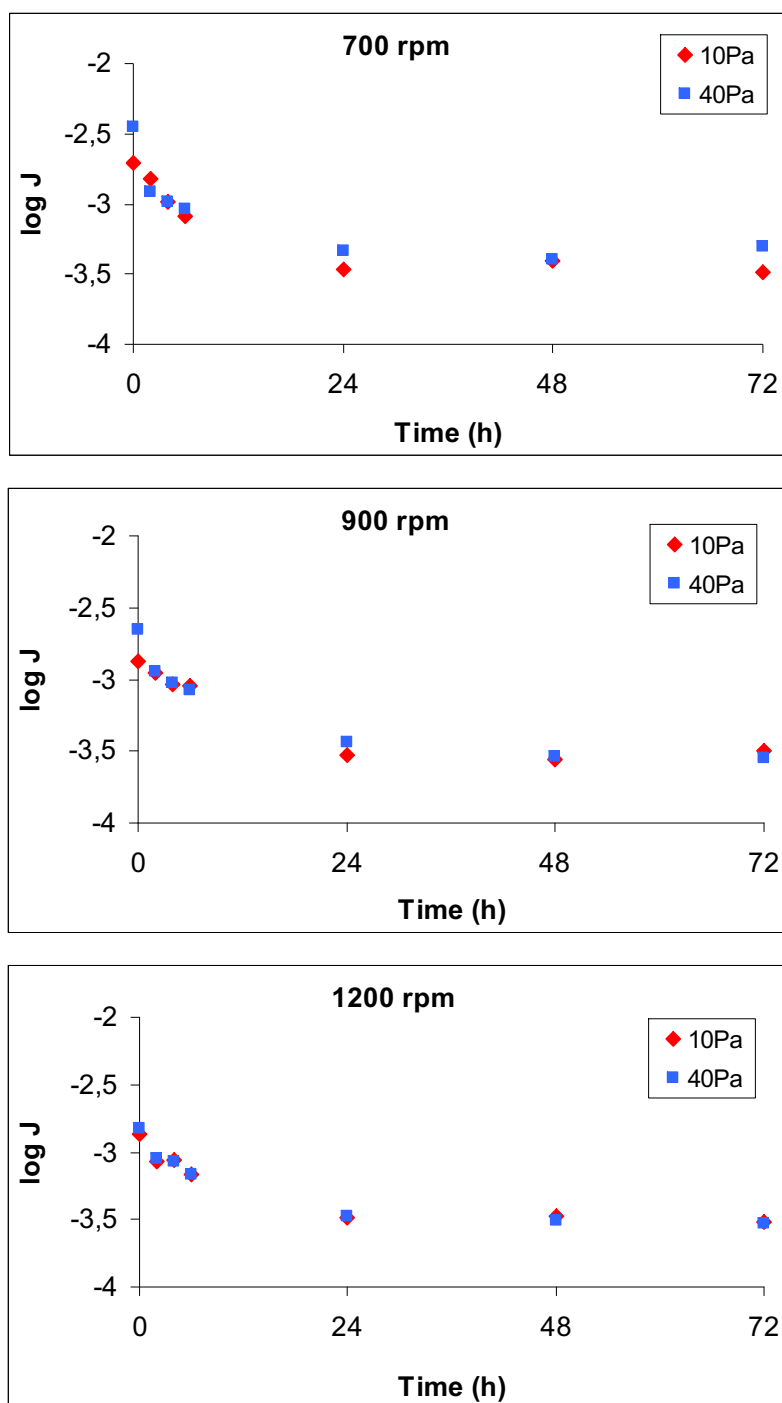
**Figura 4.27** Medidas de fluencia para un esfuerzo de cizalla aplicado de 40 Pa y posterior recuperación para las emulsiones EAC3 preparadas a velocidades de agitación de (a) 700, (b) 900 y (c) 1200 rpm

Las curvas de fluencia permitieron obtener una clara indicación de la cinética del proceso de entrecruzamiento. La emulsión EAC3 a 700 rpm a  $t = 0$  h (Figura 4.26 a)

presenta una curva de fluencia con un rápido incremento de la capacitancia,  $J$  (caracterizado por una capacitancia instantánea,  $J_0$ ), seguido de un lento aumento (la región retardada, que se observa entre aproximadamente 10 y 120 segundos) para finalmente, mostrar un aumento lineal de  $J$  con el tiempo hasta los 120 s. Cuando el esfuerzo de cizalla se dejó de aplicar, la capacitancia cambió de signo, disminuyendo, hasta llegar a un valor de equilibrio a los 240 s. Este valor no llegó a cero, indicando una recuperación parcial de la estructura. Dicho resultado evidencia la naturaleza viscoelástica del sistema. Además, presenta una curva característica de sistemas con polímeros entrecruzados [Kavanagh, 1998], con un valor bajo de la pendiente capacitancia/tiempo. El proceso de entrecruzamiento químico, es decir, la formación de uniones covalentes entre distintas cadenas de polímero, se caracterizó de 0 a 72 h y se observó una disminución de la pendiente  $J$  vs tiempo en este periodo, hasta llegar a  $t \geq 24$  h, donde la pendiente es prácticamente cero. Se observó una completa recuperación de las muestras a partir de las 24 h, hecho que indica un cambio de comportamiento de líquido viscoelástico a  $t = 0$  h a sólido viscoelástico a  $t \geq 24$  h. Evidentemente, estos cambios son debidos a la formación de uniones covalentes, que dan lugar a la formación de un gel en la fase externa de las emulsiones. La misma tendencia se observó para las tres velocidades de agitación estudiadas. No obstante, se debe mencionar que los valores de capacitancia fueron menores para 900 y 1200 rpm, que reflejan un comportamiento más elástico. Estos valores inferiores podrían tener relación con el menor diámetro de gota de las emulsiones obtenidas a 900 y 1200 rpm. Se observó un comportamiento muy similar entre los esfuerzos de 10 Pa (Figura 4.26) y de 40 Pa (Figura 4.27). Sin embargo, se obtuvieron valores de capacitancia ligeramente superiores a 40 Pa.

Para facilitar una mayor comprensión de este proceso de entrecruzamiento, se han representado los valores del logaritmo de la capacitancia ( $J$ ) correspondientes al inicio de la curva de recuperación ( $t = 120$  s), obtenidos de los ensayos de fluencia (Figura 4.26 y Figura 4.27), para los dos esfuerzos de cizalla aplicados, 10 y 40 Pa (Figura 4.28). En todos los casos,  $\log J$  disminuye exponencialmente con el tiempo, alcanzando un plateau a  $t \geq 24$  h. Estos resultados demostrarían que el proceso de entrecruzamiento se podría considerar completo después de 24 h, como ya se observó en los ensayos oscilatorios (Figura 4.24 y Figura 4.25). Es interesante señalar que la capacitancia ( $J$ ) es

la misma para los dos esfuerzos de cizalla utilizados (10 y 40 Pa). Ello era de esperar, ya que al aplicar cizallas pequeñas la estructura no se altera.



**Figura 4.28** Variación de la capacitancia (expresada como  $\log J$ ) en función del tiempo a esfuerzo de cizalla de 10 y 40 Pa para las emulsiones EAC3 obtenidas a 700, 900 y 1200 rpm.

La caracterización del sistema Quitosano / Solución reguladora de fosfatos / Synperonic A7 / Decano ha mostrado tanto la influencia de la velocidad de agitación durante la

emulsificación, como la influencia de la incorporación de quitosano. Éste produce una importante reducción del tamaño de gota por el incremento de viscosidad de la fase continua. Sin embargo, los resultados de tensión interfacial mostraron que su incorporación produce un leve incremento de la inestabilidad de las emulsiones producida probablemente por procesos de coalescencia y maduración de Ostwald. Ello no impide la utilización de estas emulsiones como medios de reacción para la obtención de materiales porosos de quitosano, ya que dicha inestabilidad es leve y se puede concluir que las emulsiones son suficientemente estables para dicho propósito en las condiciones experimentales utilizadas. Los ensayos reológicos oscilatorios de la cinética del proceso de entrecruzamiento del quitosano (EAC3) mostraron que el sistema entrecruzado formado podría considerarse estable entre 48 y 72 h, con una ligera dependencia de la velocidad de agitación utilizada. Además, los ensayos de fluencia podrían indicar que el proceso de entrecruzamiento se podría considerar finalizado después de 24 h. Tras este estudio, se obtuvieron las espumas de quitosano, cuyas propiedades fueron comparadas mediante diversas técnicas.

#### **4.3 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ESPUMAS DE QUITOSANO OBTENIDAS, A PARTIR DE EMULSIONES ALTAMENTE CONCENTRADAS, CON EL SISTEMA QUITOSANO / GENIPINA / SYNPERONIC A7 / DECANO**

El presente trabajo se ha centrado en la obtención de espumas de quitosano utilizando métodos de una sola etapa que consisten en un proceso de entrecruzamiento del quitosano en la fase continua de las emulsiones utilizando genipina como entrecruzante. Una vez preparadas estas espumas, se estudió su posible aplicación como sistema modelo en la eliminación de colorantes para aguas residuales.

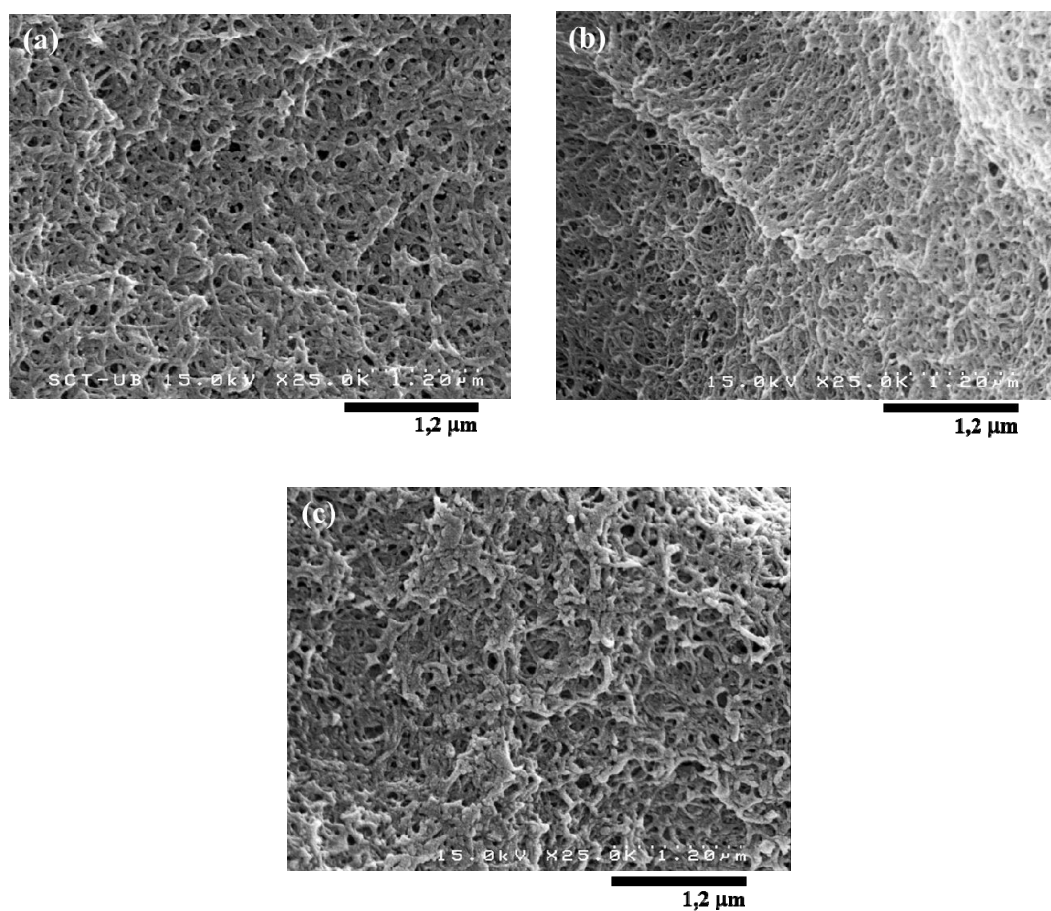
Las espumas de quitosano se obtuvieron a partir de las emulsiones con composición EAC3 (Tabla 3.1), las cuales se mantuvieron a 40 °C durante 72 h para que tuviera lugar el proceso de entrecruzamiento. Transcurrido este tiempo, se obtuvo una emulsión con la fase externa entrecruzada, con un comportamiento elástico, que fue lavada mediante extracción Soxhlet para eliminar la fase dispersa (decano) y el tensioactivo. Finalmente, la muestra se liofilizó para eliminar el agua (Apartado 3.3.4). En las condiciones

experimentales escogidas (Apartado 3.3.2), estas espumas presentan un grado de entrecruzamiento de alrededor 97 % [Miras, 2011, 2013a], valor obtenido mediante un proceso de lavado en Soxhlet de la espuma liofilizada (Apartado 3.3.5.1).

Estas espumas se caracterizaron mediante diversas técnicas para estudiar su topografía, superficie específica, tamaño y volumen de poro.

#### 4.3.1 Topografía de las espumas

La topografía superficial de las espumas de quitosano obtenidas a las tres velocidades de agitación fue caracterizada mediante microscopia electrónica de barrido (SEM). La Figura 4.29 muestra imágenes de las espumas de quitosano obtenidas a 700, 900 y 1200 rpm.



**Figura 4.29** Imágenes SEM de las espumas de quitosano obtenidas a (a) 700, (b) 900 y (c) 1200 rpm.

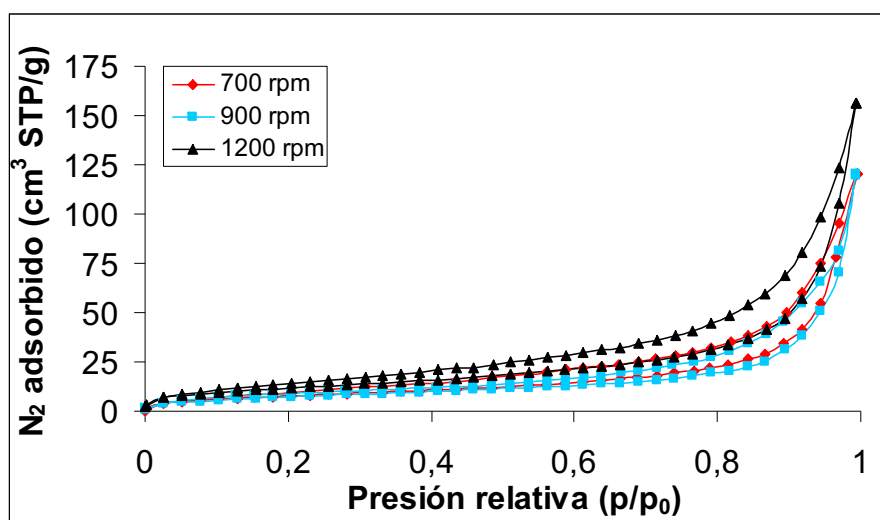
En los tres casos, se observa una estructura macroporosa uniforme con poros inferiores a los 500 nm. Se puede apreciar que el diámetro de poro obtenido es inferior al tamaño de gota de las emulsiones altamente concentradas a  $t = 0$  h: 1,23, 1,02 y 0,76  $\mu\text{m}$  a 700, 900 y 1200 rpm, respectivamente (Tabla 4.2). Además, no se aprecia una influencia clara de la velocidad de agitación durante la emulsificación en el tamaño de poro de las espumas obtenidas. Seguramente, ambos efectos están relacionados con el encogimiento parcial de las emulsiones entrecruzadas observado durante los procesos de lavado y liofilización para la obtención de las espumas de quitosano (apartado 3.3.4). La formación de un menisco en los poros del material podría justificar el encogimiento debido a la presencia de tensiones superficiales líquido-aire durante el secado del material que generan presiones capilares. Sin embargo, los procesos de lavado y el uso de técnicas de secado como la liofilización para la obtención de estas espumas de quitosano evita la formación de este tipo de interfases superficiales por lo tanto, este defecto se descartó como justificación del encogimiento observado [Tamon, 2000; Job, 2005; Quignard, 2008; Robitzer, 2011]. La explicación probablemente más plausible sean las propias propiedades mecánicas de estos materiales. Diversos autores discuten que durante los procesos de lavado, sobretodo en materiales de tipo polisacárido que no suelen presentar buenas propiedades mecánicas, éstos pueden presentar cierto grado de encogimiento durante los procesos de lavado y/o liofilización [Lee, 2007; Paakko, 2008; Quignard, 2008; Mehling, 2009].

Los resultados de SEM no mostraron una clara influencia de la velocidad de agitación durante la emulsificación en el tamaño de poro de las espumas de quitosano obtenidas. Entonces, se decidió caracterizar la porosidad de estas espumas en el rango meso/macroporoso mediante adsorción/desorción de nitrógeno para analizar las posibles diferencias entre las tres velocidades de agitación utilizadas.

#### **4.3.2 Superficie específica, volumen y tamaño de poro**

Las espumas de quitosano fueron caracterizadas mediante diversas técnicas para estudiar las propiedades de su estructura porosa. En primer lugar, mediante adsorción/desorción de nitrógeno gas para determinar su superficie específica, diámetro medio de poro y volumen total de poro y estudiar la posible influencia de la velocidad

de agitación en dichos parámetros. Las isothermas de adsorción y desorción para las tres velocidades de agitación se muestran en la Figura 4.30.



**Figura 4.30** Isothermas de adsorción/desorción de  $N_{2(g)}$  para las espumas de quitosano obtenidas a 700, 900 y 1200 rpm.

Las isothermas mostradas por las tres espumas analizadas corresponden a isothermas de tipo II [Sing, 1985], características de materiales macroporosos que, junto con la aparición de un ciclo de histéresis a presiones relativas altas, indican la naturaleza principalmente macroporosa de este tipo de espumas. Al comparar las isothermas entre sí, se observa un ligero incremento de nitrógeno adsorbido entre 700 y 1200 rpm, que también implica un incremento de la superficie específica. Al aplicar el modelo BET (Ecuación 3.13) [Brunauer, 1938], se obtuvieron valores de superficie específica ( $S_{BET}$ ) de 29, 28 y 43  $m^2/g$  para 700, 900 y 1200 rpm, respectivamente (Tabla 4.4). Estos resultados podrían reflejar que prácticamente no influye el incremento de 700 a 900 rpm en los valores de superficie específica. No obstante, se observa un ligero incremento entre 900 y 1200 rpm, que podría ser debido a una pequeña reducción del tamaño de poro, de 26 a 22 nm, que implicaba un incremento de la superficie específica, de 29 a 43  $m^2/g$ .

A partir de las isothermas de adsorción/desorción de nitrógeno, también se obtuvo el valor de volumen total de poro ( $V_T$ ), que corresponde a la capacidad máxima de adsorción de nitrógeno gas por parte de las espumas, para diámetros de poro inferiores a 300 nm (Tabla 4.4). En este caso, los valores tampoco son muy elevados aunque



incrementan de 700 a 1200 rpm, como ya se observa en la Figura 4.30, obteniéndose valores de 0,18 y 0,24 cm<sup>3</sup>/g para 700 y 1200 rpm, respectivamente. Como en los valores de  $S_{BET}$ , no se detectan variaciones importantes entre 700 y 900 rpm. Los bajos valores del volumen total de mesoporos ( $V_{Tm}$ ) obtenidos, para poros de diámetro inferior a 50 nm, indican la naturaleza macroporosa de este tipo de materiales, como muestran claramente las imágenes de SEM (Figura 4.29).

**Tabla 4.4** Valores de superficie específica ( $S_{BET}$ ), volumen total de poro para diámetros inferiores a 300 nm ( $V_T$ ), volumen total de mesoporos para diámetros inferiores a 50 nm ( $V_{Tm}$ ) y diámetro de poro medio ( $D$ ) para las espumas de quitosano obtenidas a 700, 900 y 1200 rpm

	Superficie específica, $S_{BET}$ (m <sup>2</sup> /g)	Volumen total de poro, $V_T$ (cm <sup>3</sup> /g)	Volumen total de mesoporo, $V_{Tm}$ (cm <sup>3</sup> /g)	Diámetro de poro medio, $D$ (nm)
<b>700 rpm</b>	29	0,18	0,09	26
<b>900 rpm</b>	28	0,18	0,09	26
<b>1200 rpm</b>	43	0,24	0,14	22

Los materiales macroporosos se caracterizan por poseer valores altos de volumen total de poro. Sin embargo, los resultados de  $V_T$  obtenidos por adsorción/desorción de nitrógeno muestran valores relativamente bajos. Estos resultados son debidos a que esta técnica sólo tiene en consideración poros inferiores a 300 nm. Es posible calcular un volumen total de poro ( $V_p$ ), considerando todos los poros de las espumas. A partir del valor de la densidad de pared de las espumas (1,6 g/cm<sup>3</sup>) [Miras, 2013a], obtenido mediante picnometría de helio, y mediante la Ecuación 3.16, se calculó el valor de volumen de poro total ( $V_p$ ) de ~48 cm<sup>3</sup>/g. Este valor, muy elevado, se puede considerar el volumen total de poro, y es muy superior al obtenido por adsorción de nitrógeno, debido a que este último sólo tiene en cuenta poros inferiores a 300 nm. Dicho valor podría considerarse coherente con los consultados en la bibliografía, ~30 cm<sup>3</sup>/g [Qian, 2009], valor obtenido para materiales porosos de carboximetilcelulosa sódica a una menor fracción de fase dispersa ( $\phi = 0,74$ ). Dicho resultado demostraría la gran influencia de la fracción de fase dispersa sobre el volumen total de poro como describen en mayor detalle Qian *et al.* [Qian, 2009]. No obstante, el valor calculado para las espumas de quitosano obtenidas debe considerarse como un valor aproximado. Para el cálculo del  $V_p$ , se utiliza el volumen macroscópico de la espuma (Ecuación 3.16), y

éstas no presentaban una forma totalmente regular, dificultando una medida precisa de dicho valor. En cualquier caso, queda demostrado que la espuma obtenida es principalmente macroporosa, con un volumen de poro muy elevado ( $\sim 48 \text{ cm}^3/\text{g}$ ).

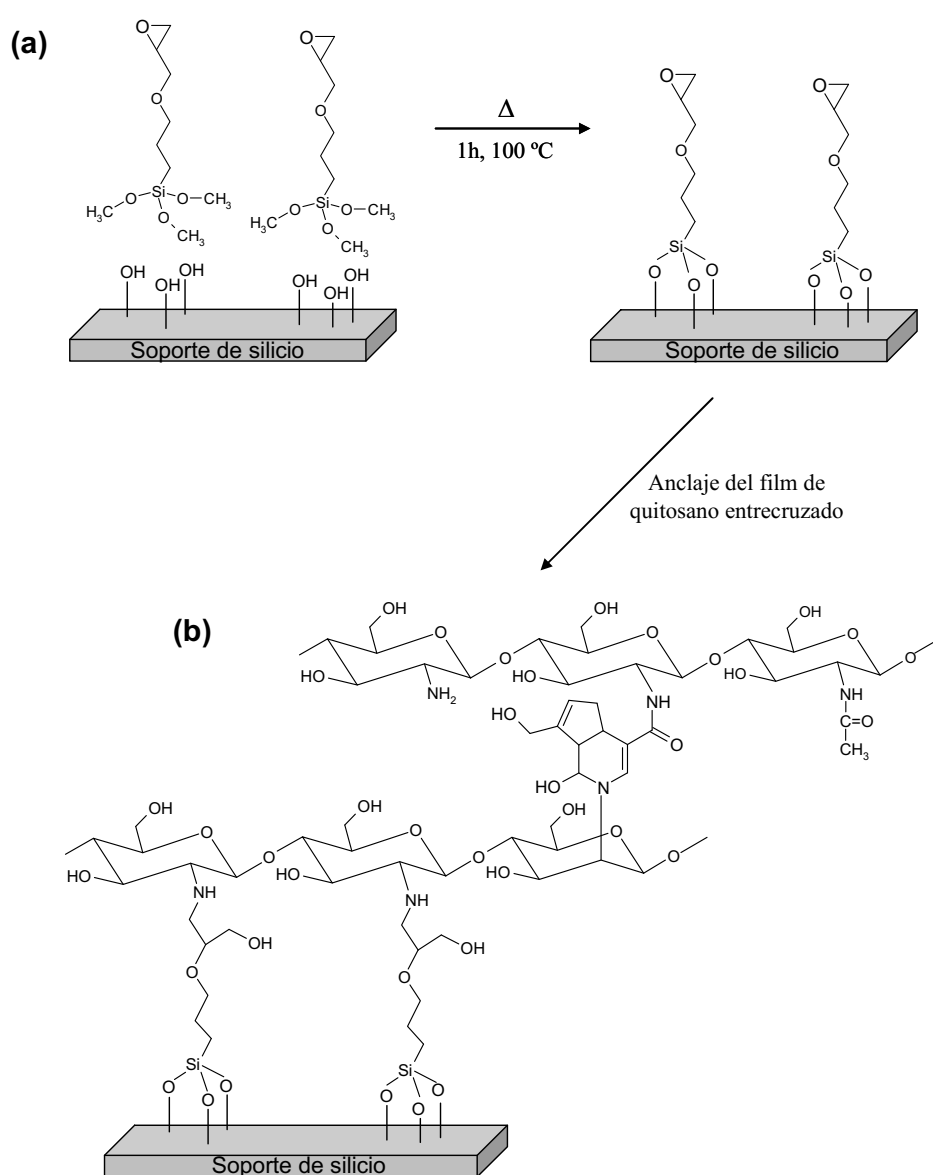
Como se ha comentado anteriormente, la técnica de adsorción/desorción de nitrógeno no permite obtener información para tamaños de poro superiores a 300 nm. Esta limitación es debida al rango de tamaño de poro en el que se puede aplicar la ecuación de Kelvin [Thompson, 1871; Lowell, 2006b] de la cual derivan modelos de cálculo como el BET [Brunauer, 1938] y el BJH [Barrett 1951]. Dicha ecuación presenta desviaciones importantes a tamaños de poro cercanos a 500 nm, las cuales impiden su utilización en muestras macroporosas [Klobes, 2006; Lowell, 2006b]. Una posible opción hubiese sido la técnica de porosimetría o intrusión de mercurio, extensamente utilizada para la caracterización de materiales macroporosos [Oh, 2003; Sarazin, 2004; Zhang, 2004; Ungureanu, 2007]. Sin embargo, dicha técnica podría no proporcionar resultados fiables para este tipo de muestras debido a que la técnica aplica una sobrepresión a la muestra y, en materiales poco rígidos, como las espumas de quitosano, podría dar lugar a un proceso de distorsión de los poros, generando medidas erróneas, o incluso la fractura del material [Scherer, 1995; Pirard, 1995; Woignier, 1997].

Como se ha comentado en la Introducción (Apartado 1.4.2), la obtención de materiales porosos de quitosano utilizando emulsiones altamente concentradas como medios de reacción permite combinar las propiedades de los hidrogeles de quitosano, tales como la respuesta al pH, con la capacidad de incorporar porosidad al material final. Para realizar un estudio inicial de la respuesta al pH de materiales de quitosano entrecruzados con genipina, se utilizaron films de quitosano como sistema modelo. Dicho estudio se presenta y discute en profundidad en el siguiente apartado.

#### **4.3.3 Nanofilms de quitosano entrecruzados con genipina como sistema modelo para el estudio de la respuesta al pH de las espumas de quitosano**

Los films de quitosano se prepararon tal como se indica en el Apartado 3.3.6 y se caracterizaron mediante tres técnicas: ángulo de contacto dinámico, microbalanza de cristal de cuarzo con determinación de la disipación (QCM-D) y microscopía de fuerza atómica (AFM). A partir de dichas técnicas, se determinó la mojabilidad e hinchamiento

de estos films en función del pH (3, 6 y 9). Paralelamente, también se estudió la influencia del grado de entrecruzamiento de los films al caracterizar films no entrecruzados y entrecruzados durante un periodo de 1 y 6 h. La Figura 4.31 muestra esquemáticamente la reacción de entrecruzamiento de la genipina con el quitosano, así como el proceso de anclaje del quitosano con el silano. Como se comentó en la parte Experimental (Apartado 3.3.6) de la presente tesis, los soportes donde se prepararon los films de quitosano fueron funcionalizados previamente con un compuesto de silano para anclar los films de quitosano. En dicho proceso, los grupos epoxi del silano pueden reaccionar con los grupos amino del quitosano, formando grupos iminas.



**Figura 4.31** Esquema propuesto del anclaje del quitosano con el silano (a) y posterior entrecruzamiento del quitosano con genipina (b), para la formación de nanofilms.

4.3.3.1 *Mojabilidad de los films*

Las características hidrófilas de estos nanofilms se determinaron mediante ensayos de ángulo de contacto dinámico. La Tabla 4.5 muestra los valores del ángulo de contacto inicial ( $\theta_0$ ) y la velocidad de penetración del disolvente para los films no entrecruzados y entrecruzados, en función del pH (3, 6 y 9) y del tiempo de entrecruzamiento (0, 1 y 6 h).

**Tabla 4.5** Ángulo de contacto inicial ( $\theta_0$ ) y velocidad de penetración ( $-\Delta V/t$ ) para los films de quitosano no entrecruzados y entrecruzados durante 1 y 6 h.

		Films de quitosano no entrecruzados	Films de quitosano entrecruzados	
			1 h	6 h
Ángulo de contacto inicial, $\theta_0$ (Grados)	pH 3	25,3 ± 3,3	36,9 ± 8,9	50,6 ± 8,3
	pH 6	33,6 ± 8,9	32,9 ± 2,9	37,5 ± 2,1
	pH 9	25,0 ± 2,5	41,4 ± 2,8	45,4 ± 1,8
Velocidad de penetración, $-\Delta V/t$ ( $\mu\text{L/s}$ )	pH 3	0,27 ± 0,02	0,29 ± 0,04	0,34 ± 0,01
	pH 6	0,23 ± 0,05	0,24 ± 0,04	0,24 ± 0,01
	pH 9	0,22 ± 0,01	0,24 ± 0,05	0,22 ± 0,05

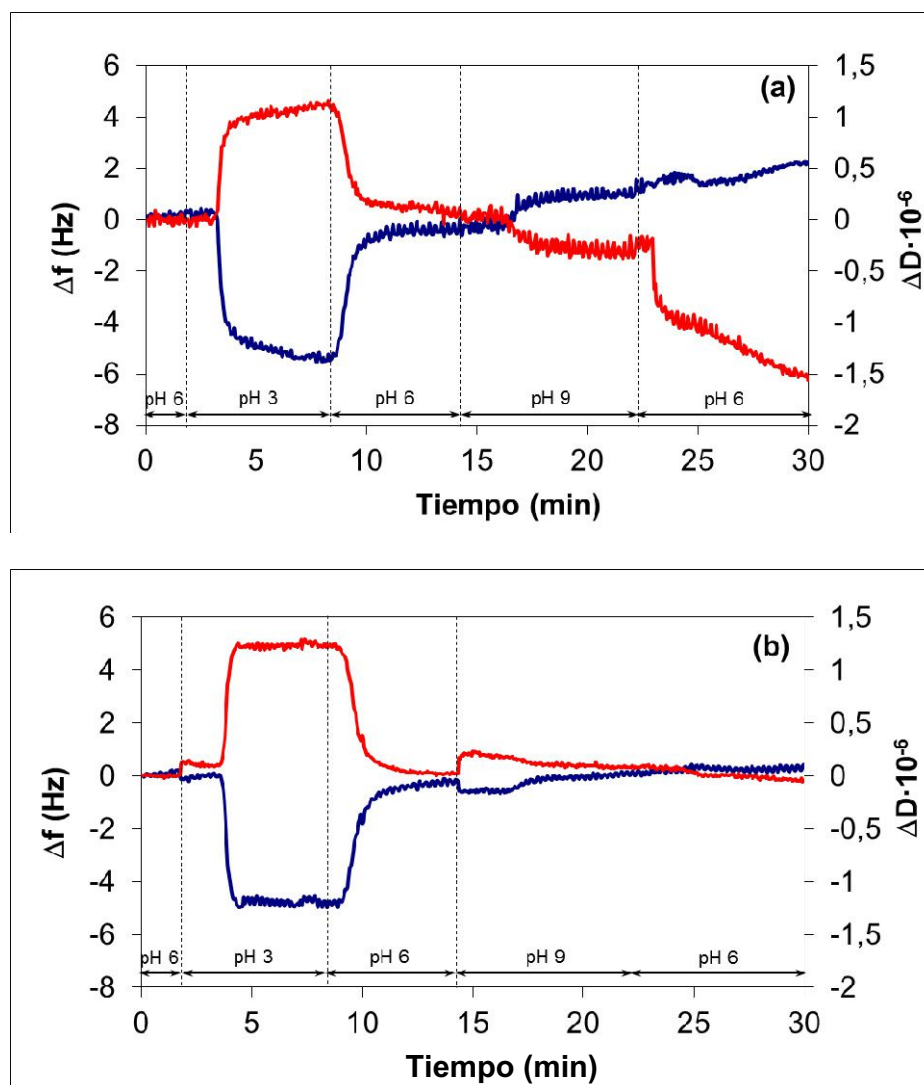
Los films de quitosano no entrecruzados muestran valores menores de ángulo de contacto ( $\theta_0$ ), indicando un mayor comportamiento hidrófilo de la superficie de los films. Este resultado podría atribuirse al mayor porcentaje de grupos funcionales  $-\text{NH}_2$  libres. Además, se observa que al incrementar el tiempo de entrecruzamiento, a un mismo pH, el ángulo de contacto aumenta. Dicho comportamiento podría deberse a la disminución de grupos funcionales  $-\text{NH}_2$ , que estarían enlazados de forma covalente con la genipina.

Para estudiar en mayor profundidad la mojabilidad de estos films, se compararon también los valores de velocidad de penetración, definida como la disminución del volumen de gota en función del tiempo ( $-\Delta V/t$ ). Los resultados indican una mayor velocidad de penetración a pH 3, debido a la protonación de los grupos amino del quitosano a pH ácido. No obstante, a pH 6 y pH 9 no se observan diferencias destacables, al obtener valores de velocidad de penetración alrededor de 0,23  $\mu\text{L/s}$ .

Estos resultados ponen de manifiesto la capacidad de respuesta al pH de los films de quitosano entrecruzados con genipina. Tras estos resultados, se estudió el hinchamiento de los films de quitosano en función del pH mediante otras dos técnicas de alta sensibilidad: QCM-D y AFM.

#### 4.3.3.2 Hinchamiento de los films

En primer lugar, se estudió la influencia del pH en el hinchamiento de los films mediante la técnica de microbalanza de cuarzo con disipación (QCM-D), para films entrecruzados durante 1 y 6 h (Figura 4.32).



**Figura 4.32** Variación de frecuencia,  $\Delta f$ , (línea roja) y energía de disipación,  $\Delta D$ , (línea azul) en función del tiempo, obtenidos mediante la técnica de QCM-D. Tiempo de entrecruzamiento 1 h (a) y 6 h (b). El pH se varió a intervalos de tiempo determinados, como se indica en el gráfico por líneas discontinuas.

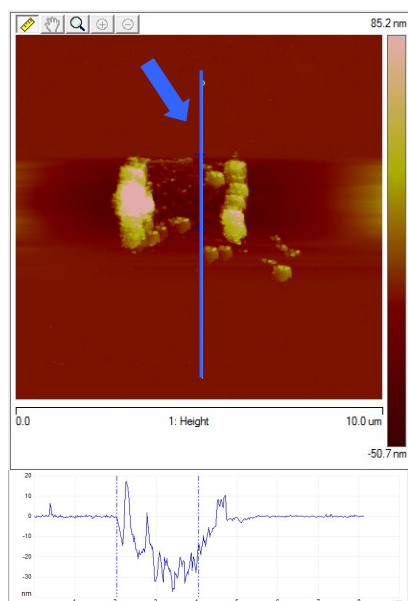
Con el fin de obtener una línea base y así poder comparar los diferentes pH, los ensayos siempre se iniciaron a pH 6. A continuación, el pH se varió siguiendo un ciclo: 6-3-6-9-6, añadiendo ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido sódico (NaOH) a la solución de cloruro sódico (NaCl) como modificadores de pH, tal y como se describe en la sección Experimental (apartado 3.3.7.2), registrando la variación en frecuencia y disipación durante todo el proceso. Estas variaciones en frecuencia y disipación se asocian a cambios estructurales del film adsorbido sobre el soporte de QCM-D y permiten evaluar el hinchamiento de los films en función del pH.

La Figura 4.32 muestra como la frecuencia y la energía de disipación varían ampliamente cuando el pH se reduce de pH 6 a 3, para los dos tiempos de entrecruzamiento (1 y 6 h). La frecuencia varía de 0,2 Hz a pH 6 (línea base) a alrededor de -5 Hz a pH 3, y la disipación aumenta de  $0,1 \cdot 10^{-6}$  a  $1,1 \cdot 10^{-6}$ . La disminución de pH produce la protonación de los grupos amino del quitosano, que causa el hinchamiento de los films a pH 3, inferior al  $pK_a$  del quitosano ( $\sim 6.5$ ) [Rinaudo, 1999]. A continuación, el pH se incrementó de pH 3 a pH 6, y se observa cómo los parámetros de frecuencia y disipación regresan aproximadamente a los valores iniciales. Este comportamiento podría mostrar el hinchamiento reversible de estos films de quitosano entrecruzados, probablemente debido a la desprotonación parcial de los grupos amino, produciendo una reducción de las repulsiones electrostáticas y una reagrupación de las moléculas de quitosano en los films [Indest, 2008]. Tras pH 6, el pH se incrementó a pH 9, por encima del  $pK_a$  del quitosano, en el cual prácticamente todos los grupos  $-NH_2$  estarían desprotonados. A este pH, los films entrecruzados a tiempos de 1 h (Figura 4.32 a) y 6 h (Figura 4.32 b) muestran diferentes comportamientos. Para los films entrecruzados durante 1 h, la frecuencia varía de -0,15 Hz a 1 Hz y la disipación incrementa de  $0,05 \cdot 10^{-6}$  a  $-0,3 \cdot 10^{-6}$ , indicando el encogimiento del film que tiene lugar a pH básico. Sin embargo, para los films entrecruzados durante 6 h, las variaciones son inferiores, ya que la frecuencia varía de -0,15 a 0,13 Hz y la disipación de  $0,02 \cdot 10^{-6}$  a  $0,08 \cdot 10^{-6}$ . Se observa entonces que se obtienen menores variaciones de frecuencia y disipación al incrementar el tiempo de entrecruzamiento. Estos resultados indicarían que el entrecruzamiento produjo films más rígidos. El encogimiento a pH 9 es más evidente a tiempos de entrecruzamiento de 1 h, debido a un mayor número de grupos  $-NH_2$  desprotonados. Finalmente, el pH se cambió de nuevo a pH 6. En este caso,

los films entrecruzados durante 1 h mostraban una importante disminución de la disipación, que podría ser producida por la precipitación de quitosano no entrecruzado. Este comportamiento no se observa en los films entrecruzados a 6 h, indicando una mayor estabilidad de los films a mayores tiempos de entrecruzamiento.

En conclusión, la técnica de QCM-D permitió caracterizar la respuesta al pH de estos films de quitosano, asociada a un comportamiento de hinchamiento/encogimiento de los films. Se ha puesto de manifiesto que los nanofilms de quitosano reticulados con genipina presentan un hinchamiento a pH ácido y un encogimiento a pH básico y este proceso es reversible. Para poder estudiar con más detalle este fenómeno, la respuesta al pH de los nanofilms de quitosano también fue caracterizada mediante AFM.

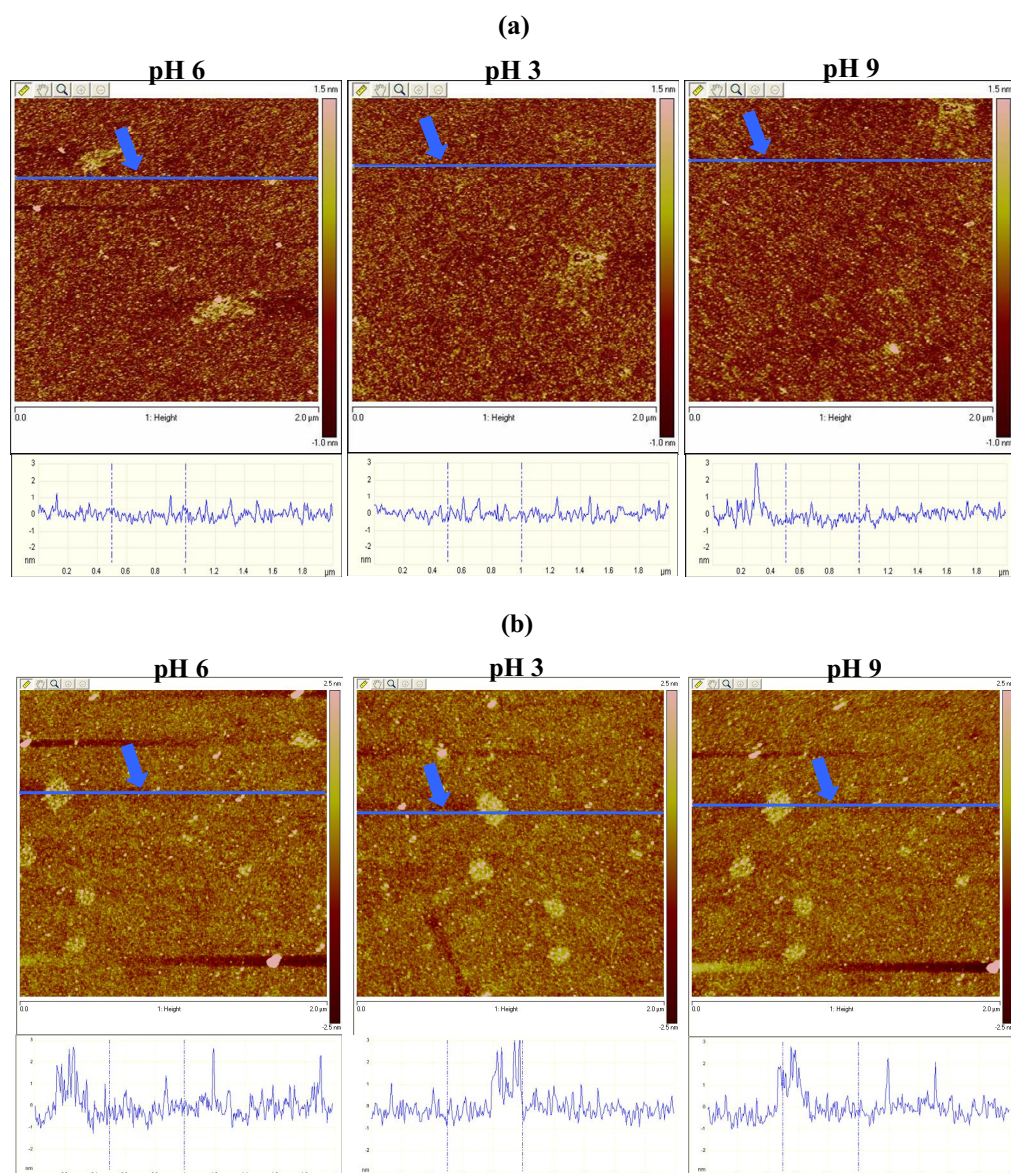
En primer lugar, se determinó mediante AFM el grosor de los films de quitosano entrecruzados con genipina. En este caso, los ensayos se realizaron con los films secos que se habían entrecruzado durante 1 h, sin introducir soluciones acuosas. Dichas medidas se llevaron a cabo en modo dinámico, realizando un nanoescaneo de manera repetitiva sobre una pequeña sección y aplicando fuerzas elevadas (Modo *PeakForce QNM*) para producir un orificio sobre el film que permitiera conocer su grosor. Este método fue publicado previamente por otros autores [Kujama, 2005], quienes describieron la capacidad del modo dinámico para raspar una región de un film y poder así determinar su grosor mediante el análisis de la topografía. Se obtuvo un grosor de film de  $40 \pm 14$  nm, como resultado medio de cuatro réplicas. Una de estas medidas se muestra en la Figura 4.33. Los resultados obtenidos indican que los films eran homogéneos y con una rugosidad superficial reducida.



**Figura 4.33** Determinación del grosor de los films de quitosano (Entrecruzados durante 1 h) mediante el modo PeakForce QNM en AFM. Se muestra un ejemplo de una imagen y del perfil de altura obtenido por un escaneo (indicado con línea azul) alrededor del orificio.

El estudio de la respuesta al pH de los films de quitosano mediante AFM se llevó a cabo utilizando soluciones acuosas de pH controlado, siguiendo el mismo procedimiento utilizado en las medidas de QCM-D. En primer lugar, los films fueron caracterizados a pH 6, posteriormente a pH 3 y finalmente, a pH 9. Los films se lavaron con una solución de pH 6 tras realizar la medida a pH 3 y antes de medir a pH 9 para evitar cualquier influencia del pH anterior utilizado. Mediante AFM se caracterizó la influencia del pH en los films al comparar dos parámetros: topografía (Figura 4.34) y módulo elástico (Figura 4.35).



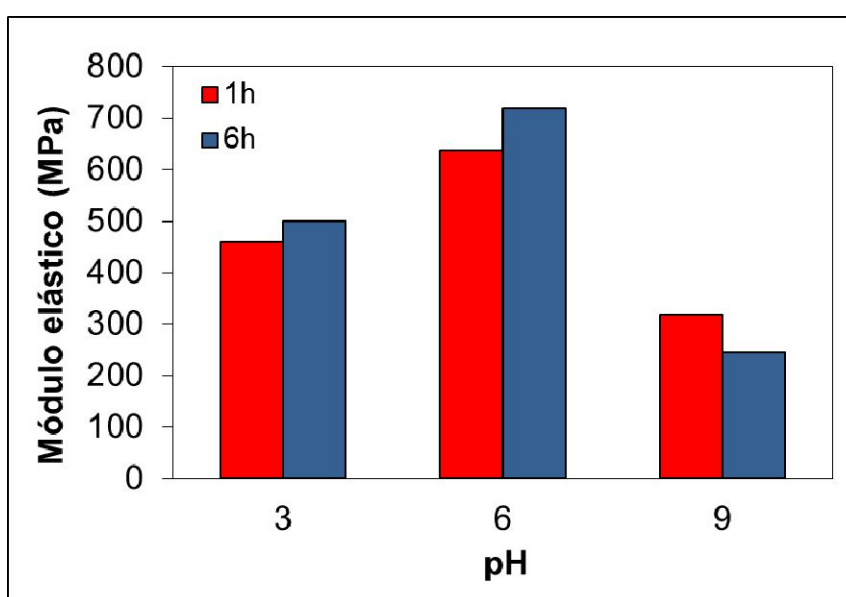


**Figura 4.34** Topografía de los films por AFM, en función del pH (3, 6 y 9). Imágenes de films de quitosano entrecruzados durante 1 h (a) y 6 h (b). Debajo de las imágenes de AFM se muestran los perfiles de altura, medidos en la línea indicada por una flecha en las imágenes.

La Figura 4.34 muestra la influencia del tiempo de entrecruzamiento de 1 y 6 h en la topografía de los films de quitosano. Se observa una baja rugosidad para ambos films (los perfiles en altura indican variaciones de  $\pm 1$  nm) a los tres valores de pH. No obstante, los films entrecruzados durante 6 h (Figura 4.34b) presentan pequeños agregados aislados con un diámetro de  $0,2 \mu\text{m}$ , alcanzando aproximadamente 3 nm en altura, los cuales fueron observadas a los pH 3, 6 y 9. Estos agregados podrían haberse producido por las interacciones iónicas entre las moléculas de quitosano y los aniones

de la solución de fosfatos donde se disuelve la genipina, la aparición de los cuales podría tener lugar a tiempos largos.

El análisis topográfico de las imágenes de AFM no muestra diferencias importantes al variar el pH, sugiriendo que la topografía o rugosidad de los films no depende de los procesos de hinchamiento o encogimiento. Este resultado no implica que no haya variaciones en la conformación molecular de los films en función del pH. Así que se midió el módulo elástico (Figura 4.35) para analizar los posibles cambios en las propiedades mecánicas de los films a nivel molecular en función del pH.



**Figura 4.35** Módulo elástico de los films de quitosano, en función del pH (3, 6 y 9) para tiempos de entrecruzamiento de 1 (rojo) y 6 h (azul).

Como cabría esperar, los resultados muestran que el módulo elástico de los films se incrementa de pH 3 a pH 6, para ambos tiempos de entrecruzamiento. A pH 6, los films probablemente presentan una mayor compresión que a pH 3, debido a un menor hinchamiento, dando lugar a un incremento del módulo elástico. Además, el módulo elástico de los films entrecruzados durante 6 h muestra un ligero aumento en comparación con los entrecruzados durante 1 h. Este resultado es coherente y puede ser debido a la mayor rigidez de los films al incrementar el tiempo de entrecruzamiento. Sin embargo, a pH 9 se obtienen valores de módulo elástico menores. Este resultado inesperado podría deberse a algún proceso de inestabilidad en condiciones básicas, causado probablemente por la baja solubilidad del quitosano a dicho pH.

En resumen, estos resultados mostraron que el sistema modelo de films de quitosano entrecruzados con genipina es sensible al pH, tal como indican los resultados de ángulo de contacto dinámico, QCM-D y AFM. El ángulo de contacto demostró la mayor mojabilidad de los films de quitosano a pH 3, así como el proceso de hinchamiento/encogimiento de los films en función del pH y del tiempo de entrecruzamiento. Estos resultados preliminares indicarían que los sistemas de quitosano entrecruzados con genipina son adecuados para procesos de hinchamiento/encogimiento, obteniendo nanofilms sensibles al pH.

Una vez estudiado este sistema modelo, el quitosano y la genipina se incorporaron en emulsiones altamente concentradas con la finalidad de utilizarlas como medios de reacción en la obtención de espumas de quitosano. Dichos materiales fueron sometidos a diversos ensayos de adsorción/desorción para estudiar su posible aplicación como sistemas de eliminación de colorantes. Los resultados obtenidos se muestran en el siguiente apartado.

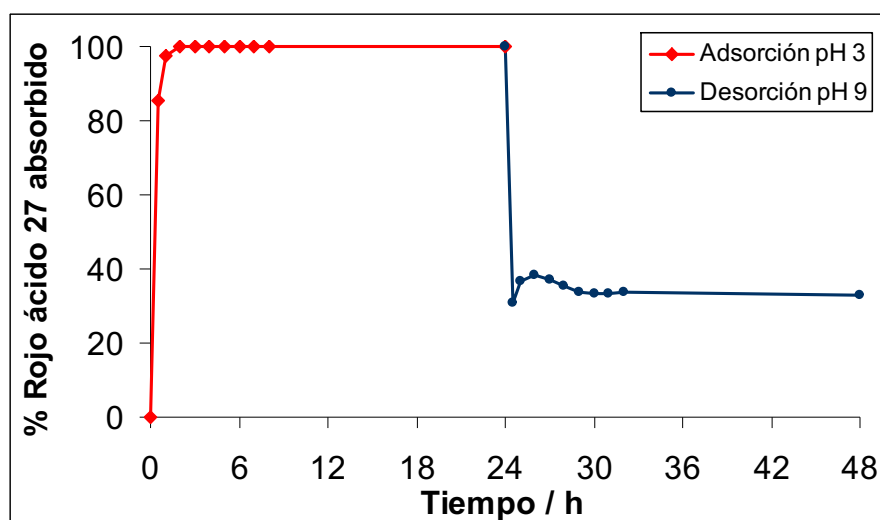
#### **4.3.4 Ensayos de adsorción/desorción de colorantes**

La utilización de biopolímeros, como el quitosano, ha mostrado un gran interés en las últimas décadas en el tratamiento de aguas residuales para la eliminación de diversos contaminantes como colorantes o metales pesados mediante procesos de adsorción, denominado biosorción para este tipo de polímeros. Biopolímeros de origen natural como el quitosano han sido reconocidos como efectivos y económicos para la eliminación de contaminantes en aguas residuales. Debido a sus relativos bajos costes de obtención y producción, ya que se obtiene como producto secundario de procesos industriales en la industria pesquera, principalmente [Agulló, 2004], ha presentado gran interés para este tipo de aplicaciones. Para controlar y/o mejorar los procesos de adsorción mediante la utilización de quitosano, puede modificarse la morfología de éste mediante la formación de partículas, geles, membranas o fibras o puede modificarse su estructura química, principalmente, mediante procesos de entrecruzamiento [Guibal, 2004; Ravi Kumar, 2004]. En el caso específico de materiales de quitosano entrecruzados, es conocido que dicho entrecruzamiento, en el caso de producirse a través de los grupos amino, puede reducir en mayor o menor medida su capacidad de adsorción [Dzul Erosa, 2001; Guibal, 2004; Gerente, 2007; Azlan, 2009]. Sin embargo,

estos procesos, como el entrecruzamiento, confieren a estos materiales estabilidad química en un rango amplio de pH, evitando así su disolución en medios ácidos. Estas características permiten que los materiales de quitosano entrecruzados presenten un amplio abanico de posibilidades en su aplicación en la eliminación de contaminantes en aguas residuales.

Los resultados obtenidos para las espumas de quitosano mostraron que se habían conseguido unos materiales macroporosos con un volumen de poro muy elevado. A partir de estos resultados prometedores, se estudió su posible aplicación como adsorbentes de colorantes. Para ello, se seleccionó como sistema modelo las espumas de quitosano obtenidas a 700 rpm. Se realizaron ensayos de adsorción/desorción con el colorante rojo ácido 27. El proceso de adsorción se llevó a cabo a pH 3 y el de desorción a pH 9, durante un periodo de tiempo de 24 h en cada caso. La principal interacción entre quitosano y colorante es de tipo iónico. A pH ácido, inferior al pKa del quitosano ( $\text{pH} < \text{pK}_a = 6,5$  [Rinaudo, 1999]), los grupos amino del quitosano están protonados ( $-\text{NH}_3^+$ ) así como los grupos sulfonato del colorante presentan forma aniónica ( $-\text{SO}_3^-$ ), pudiendo producirse la interacción iónica entre ambos al presentar cargas opuestas. A valores superiores al  $\text{pK}_a$ , ambos grupos quedan desprotonados y las interacciones iónicas son prácticamente despreciables. No obstante, otro tipo de interacciones, como los puentes de hidrógeno, pueden tener lugar [Wong, 2003; Jovic, 2005b].

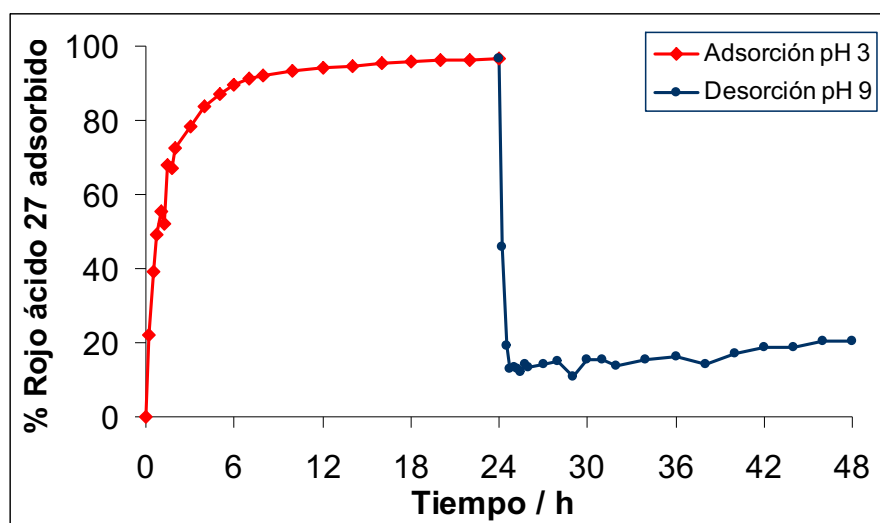
Se realizaron ensayos preliminares estudiando la cinética de adsorción/desorción, con una relación en peso colorante:espuma quitosano de 0,025. Estos ensayos cinéticos se cuantificaron mediante espectrofotometría UV-Vis (detalles experimentales en la sección 3.3.8 y curvas de calibrado en Anexos, apartado 8.4). Los resultados muestran una rápida adsorción del colorante por parte de la espuma a pH 3, alcanzando una adsorción del 100 % en un tiempo inferior a 1 h (Figura 4.36). En cambio, al aumentar el pH a 9, se produce la desorción del colorante, alcanzando el equilibrio después de la disminución del 100 % al 30 %. Por lo tanto, el proceso no es completamente reversible. Una posible explicación de dicho proceso sería la aparición de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo del quitosano con los grupos sulfonato del colorante [Wong, 2003; Jovic, 2005b].



**Figura 4.36** Curvas de adsorción a pH 3 y de desorción a pH 9 para una relación en masa colorante:espuma quitosano de 0,025.

En conclusión, estos ensayos preliminares muestran que se alcanzó una rápida y elevada adsorción del colorante en aproximadamente 1 hora (próxima al 100 %). Esta relación de colorante:espuma (0,025) era inferior en comparación a las utilizadas en la literatura, alcanzando relaciones peso colorante:espuma entre 0,1 y 2 para sistemas de quitosano entrecruzado [Chiou, 2004, Hu, 2006, Crini 2008a, Crini 2008b, Srinivasan 2010]. Los valores más elevados de adsorción se alcanzan con sistemas de partículas de quitosano entrecruzadas iónicamente con tripolifosfato [Chiou 2004, Hu 2006]. Por ello, se realizaron ensayos preliminares cualitativos mediante observación visual para delimitar una relación óptima de colorante:espuma superior a 0,025. Se realizaron ensayos de adsorción durante 24 h a diferentes relaciones: 0,25, 0,125, 0,0625 y 0,042, para observar el cambio de color de la solución debido a la adsorción del colorante. No se alcanzó la completa eliminación del colorante en ninguna de las relaciones utilizadas. Las relaciones superiores de colorante:espuma (0,25 y 0,125) mostraron la menor eliminación del color tras 24 h de adsorción, indicando la posible saturación de los grupos amino del quitosano. No obstante, se observó una reducción de color considerable a una relación de 0,042. Estos resultados preliminares podrían indicar que la concentración de saturación de colorante para este sistema era próxima a 0,042, por lo que se seleccionó una relación en masa colorante:espuma de 0,033 para realizar nuevos ensayos y obtener una completa adsorción de colorante. En este caso, se utilizó un sistema automatizado de toma de muestra (Vision Elite 8TM, apartado 3.3.8), el cual

permitió obtener valores de adsorción a intervalos de tiempo inferiores. Los resultados para una relación de 0,033 se muestran en la Figura 4.37.



**Figura 4.37** Curvas de adsorción a pH 3 y de desorción a pH 9 para una relación en masa colorante:masa espuma de quitosano de 0,033, y utilizando un dispositivo de difusión tipo “cestillo”.

Como se puede apreciar en la Figura 4.37, los resultados obtenidos difieren ligeramente de los obtenidos en ensayos previos con una relación 0,025 (Figura 4.36). Se obtiene nuevamente una adsorción muy alta de colorante a pH 3, al alcanzar un 96 % de adsorción a las 24 h. Es un proceso relativamente rápido, ya que se obtienen valores de adsorción del 90 % en 6 h. Que no se alcance el 100 % de adsorción podría ser debido al incremento de la relación colorante:espuma, ya que ensayos previos reflejaron que la concentración de saturación estaba próxima a 0,042. No obstante, los resultados muestran que la desorción a pH 9 fue ligeramente superior (~ 90 %) a la obtenida en los ensayos preliminares (~70 %, Figura 4.36). La utilización del dispositivo automatizado conllevó un cambio en el mecanismo de agitación del sistema. En los ensayos preliminares (Figura 4.36) la solución de colorante se mantuvo en agitación y la espuma de quitosano permanecía estática en un soporte esférico (diámetro = 2,5 cm). Sin embargo, en el dispositivo automatizado, la muestra estaba colocada en un “cestillo” metálico cilíndrico (2 x 3,5 cm) que giraba de forma rotacional mientras que la solución de colorante se mantenía sin agitar. Este cambio en el tipo de agitación y forma del soporte utilizado podría haber incrementado la eficacia del proceso de desorción. A tiempos elevados durante el proceso de desorción (pH 9) se puede apreciar un ligero incremento del colorante adsorbido. Se atribuyó, como con la relación de 0,025, a la

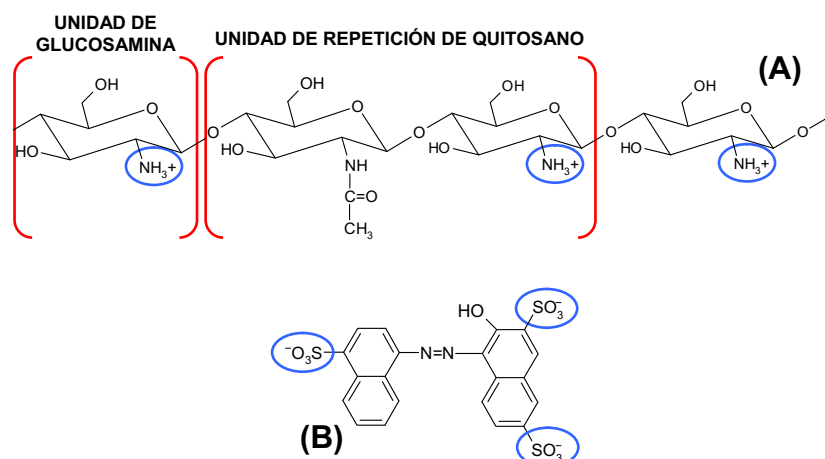
posible aparición de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo del quitosano con el colorante [Wong, 2003; Jovic, 2005b].

El proceso de adsorción de colorantes se basa en las interacciones iónicas por complejación de los grupos sulfonato del colorante con los grupos amino del quitosano. La rápida saturación de las espumas de quitosano a concentraciones bajas de colorante podría indicar que dichas espumas presentan pocos grupos amino libres. Esto significaría que la mayoría de grupos amino habría reaccionado de manera covalente con la genipina dando lugar a espumas de quitosano con un porcentaje de entrecruzamiento elevado, como demostrarían los valores de grado de entrecruzamiento, alrededor del 97 %, obtenidos en trabajos previos [Miras, 2011, 2013a].

Los resultados de adsorción muestran que la concentración de saturación de colorante para los materiales de quitosano utilizado está próxima a 0,033. A partir de este valor y de las propiedades químicas del quitosano y colorante utilizados (apartado Experimental 3.1), es posible determinar el porcentaje de grupos amino que han reaccionado con la genipina y por lo tanto, que no están disponibles para interactuar con los grupos sulfonato ( $-\text{SO}_3^-$ ) del colorante en medio ácido (Ecuación 4.5).

$$\% \text{Reacción grupos amino con genipina} = \left( 1 - \frac{0,033}{g.\text{colorante} / g.\text{material}(\text{teórico})} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 4.5}$$

Como se comentó en la Introducción, la molécula de quitosano se considera una unidad de repetición de grupos N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina (Figura 4.38). Las unidades D-glucosamina presentan los grupos amino que reaccionan con los grupos sulfonato del colorante en una relación molar 3 a 1, ya que el colorante presenta tres grupos sulfonato (Figura 4.38).



**Figura 4.38** Representación de grupos amino protonados del quitosano (A) y los grupos sulfonato del colorante rojo ácido 27 (B).

A partir de los pesos moleculares de la unidad de glucosamina ( $M_w = 161 \text{ g/mol}$ ) y de la unidad de repetición de quitosano ( $M_w = 203 \text{ g/mol}$ ) y del grado de desacetilación del quitosano (85 %), es posible calcular la relación teórica máxima de gramos de colorante adsorbidos por gramo de quitosano (sin entrecruzar, con la totalidad de los grupos amino libres). Como se comentó en la parte Experimental (apartado 3.1.3), los ensayos se realizaron con una solución de quitosano al 2 % y una solución de genipina al 1 %. Fijado un peso de material durante los ensayos de 0,15 gramos, éstos corresponden a 0,1 gramos de quitosano. A partir de estos valores, junto con la relación molar de glucosamina:colorante de 3:1, se calcula un valor de 1,54 gramos de colorante por gramo de material. Dicha relación es muy superior a la obtenida experimentalmente de 0,033, que corrobora el alto porcentaje de entrecruzamiento de estos materiales. Finalmente, a partir de estos dos valores se obtiene un porcentaje de reacción de los grupos amino del quitosano con la genipina del 98 %. Este valor coincide aproximadamente con el valor del grado de entrecruzamiento (97 %), hecho que confirmaría que una relación de 0,033 gramos de colorante por gramo de material está próxima a la saturación del sistema en los ensayos de adsorción realizados.

Para realizar un estudio en mayor profundidad e identificar el mecanismo predominante en el proceso de adsorción para este sistema, se analizó la isoterma de adsorción de dicho sistema (Figura 4.37), que se ajustó a diferentes modelos matemáticos para clasificar el tipo de adsorción producida y la cinética de ésta. Los mecanismos de adsorción de un colorante en un material adsorbente se pueden clasificar en procesos de

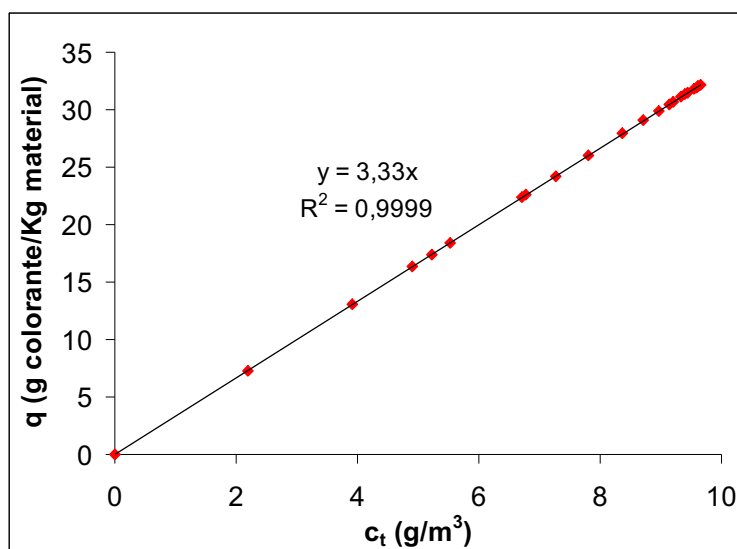


difusión (en bulk, difusión tipo film o difusión a través de los poros o interparticular del material adsorbente) o mediante interacciones entre grupos reactivos (mediante cambio iónico, complejación o quelación) [Crini, 2008a]. El caso concreto de la adsorción de colorantes por parte de materiales de quitosano se ha estudiado ampliamente aunque los diferentes autores han sugerido varias hipótesis sobre el mecanismo involucrado en la adsorción de colorante por parte del quitosano. En los procesos de adsorción el pH juega un rol muy importante debido a que el quitosano es sensible al pH al producirse la protonación de los grupos amino a pH ácido [Rinaudo, 1999]. Dicha propiedad indica que en el caso de colorantes aniónicos, como en este caso, la presencia de interacciones iónicas reversibles sea el proceso que presente una mayor contribución a pH ácido. No obstante, a pH básico durante el proceso de desorción, pueden producirse interacciones no iónicas irreversibles que dan lugar a un proceso de desorción que no alcanza el 100 %. En los sistemas en los que el quitosano está anclado o entrecruzado, la gran mayoría de autores concluyen que durante la adsorción/desorción de un colorante los mecanismos predominantes son el intercambio iónico, las interacciones electrostáticas o la formación de puentes de hidrógeno [Wong, 2003; Chiou, 2004; Gibbs, 2004; Chatterjee, 2005].

A partir de los resultados de adsorción de colorante realizados a pH 3 (Figura 4.37), se obtuvo la capacidad de adsorción o la cantidad de colorante adsorbido por cantidad de material utilizado ( $q$ , g/Kg) en función de la concentración de colorante en solución a un determinado tiempo  $t$  ( $c_t$ , g/m<sup>3</sup>) al aplicar la Ecuación 4.6, mostrada en la Figura 4.39.

$$q = (c_0 - c_t)V / W \quad \text{Ecuación 4.6}$$

donde  $c_0$  es la concentración de colorante inicial,  $V$  es el volumen de la solución de colorante y  $W$  el peso del material de quitosano.



**Figura 4.39** Isoterma de adsorción del colorante rojo ácido 27 a pH 3 con espumas de quitosano y una relación en peso colorante:espuma de 0,033.

La forma de estas isotermas de adsorción se ha utilizado históricamente para agrupar las diferentes isotermas, que indican la naturaleza del material adsorbente y las posibles interacciones adsorbente-adsorbato. El primer autor que clasificó estas isotermas fue Giles [Giles, 1974a, 1974b], agrupándose en S, L, H y C. Según esta clasificación, las isotermas de tipo L o Langmuir son las más comunes [Wong, 2003; Chiou, 2004; Crini, 2008a], las cuales indican una interacción débil entre adsorbente y colorante. Sin embargo, los resultados obtenidos (Figura 4.39) muestran que es una isoterma lineal de tipo C, que refleja una relación constante entre el colorante adsorbido en el material y el colorante en solución. Se obtiene un ajuste lineal, con una pendiente constante de 3,33 m<sup>3</sup>/Kg para cualquier concentración, conocida como coeficiente de partición ( $K_d$  o  $K_p$ , m<sup>3</sup>/kg) [Limousin, 2007]. Este valor indica una afinidad del colorante por parte del material constante en todo el rango de concentraciones de colorante estudiado [Hinz, 2001]. Este tipo de isotermas indican una mayor afinidad del colorante por el adsorbente que la presentada por el disolvente utilizado. Dichas isotermas son características de algunos sistemas microporosos o también pueden observarse en ciertos sistemas hidrofóbicos [Giles, 1974a, 1974b]. Estos resultados podrían apoyar la hipótesis realizada inicialmente. El sistema presenta un porcentaje de entrecruzamiento elevado que reduce su hidrofiliidad al haber reaccionado la mayoría de grupos amino (sitios activos) del quitosano con la genipina durante el proceso de entrecruzamiento.

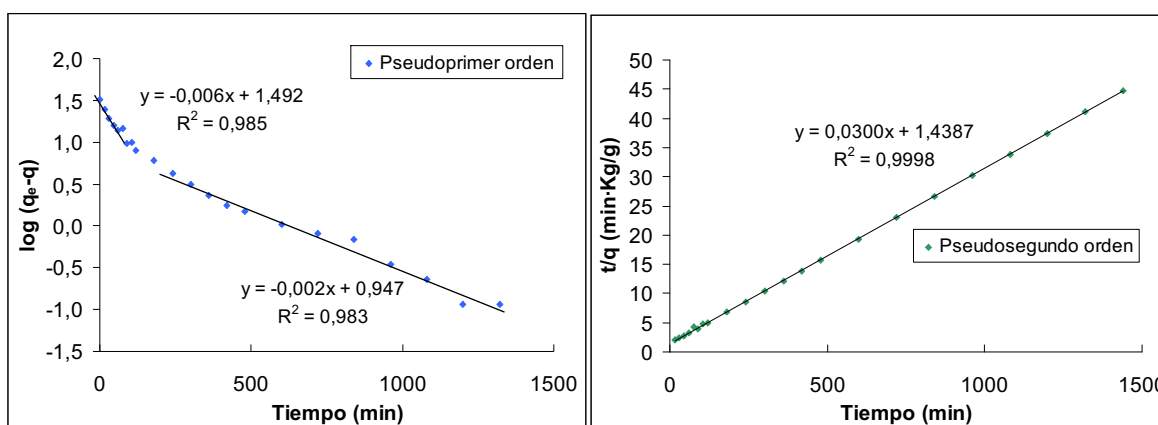
A partir de estos resultados se ha obtenido información sobre las características de las espumas de quitosano. Además, se puede extraer información adicional sobre la cinética del proceso de adsorción y del tipo de mecanismo involucrado en dicho proceso [Crini, 2008a]. Los modelos cinéticos más utilizados para describir el proceso involucrado en la adsorción de colorantes son el modelo de pseudoprimer orden (o modelo Lagergren) [Lagergren, 1898; Ho, 1999; Crini, 2008a] y el modelo de pseudosegundo orden (o modelo de Ho y McKay) [Ho, 1999], mostrados en la Tabla 4.6.

**Tabla 4.6** Ecuaciones de los modelos cinéticos más utilizados y las correspondientes formas linealizadas.

Modelo	Ecuación	Forma linealizada
Pseudoprimer orden	$\log\left(\frac{q_e}{q_e - q}\right) = \frac{k_1}{2,303} t$	$\log(q_e - q) = \log q_e - \frac{k_1}{2,303} t$
Pseudosegundo orden	$\frac{1}{(q_e - q)} = \frac{1}{q_e} + k_2 t$	$\frac{t}{q} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e}$

donde  $q$  es la cantidad de colorante adsorbido por cantidad de material utilizado a un tiempo  $t=t$  y  $q_e$  tras alcanzar el equilibrio y  $k_1$  y  $k_2$  son las respectivas constantes cinéticas de pseudoprimer y pseudosegundo orden, respectivamente.

Las correspondientes formas linealizadas de ambos modelos (Tabla 4.6) se representaron para los resultados obtenidos con las espumas de quitosano (Figura 4.40). El modelo de pseudoprimer orden implica un proceso de difusión del colorante antes de producirse la adsorción. Se pueden apreciar dos rangos de adsorción, aunque no muestran buenos ajustes lineales ( $R^2 = 0.98$ ) al representar  $\log(q_e - q)$  vs.  $t$ . Dicho modelo no presenta un buen ajuste en todo el periodo de adsorción, al obtenerse valores de  $R^2 = 0.96$ . Sin embargo, el modelo de pseudosegundo orden muestra un buen ajuste en todo el rango de adsorción (Figura 4.40), con  $R^2 = 0.9998$  al representar  $t/q$  vs.  $t$ .



**Figura 4.40** Representaciones lineales de los modelos cinéticos de pseudoprimer y pseudosegundo orden.

Este modelo implica que el proceso de adsorción está controlado por la presencia de interacciones iónicas debido a procesos de complejación iónica [Ho, 1999; Chiou, 2004; Crini, 2008a].

Los resultados de adsorción/desorción de colorante con rojo ácido 27 han mostrado que las espumas de quitosano permiten una adsorción prácticamente completa en aproximadamente 6 h. Sin embargo, el elevado porcentaje de entrecruzamiento presentado por estos materiales (97 %) no permite utilizar relaciones colorante:espuma superiores y alcanzar valores de adsorción elevados. Un mayor entrecruzamiento implica un menor número de grupos amino del quitosano libres que puedan interactuar electrostáticamente con los grupos sulfonato del colorante.

El sistema estudiado utilizando el tensioactivo Synperonic A7 para la preparación de materiales porosos mostró la naturaleza macroporosa, con tamaños de poro inferiores a 500 nm. Los resultados indicaron que la velocidad de agitación no afectaba, en gran medida, a las propiedades porosas de las espumas obtenidas. Además, se concluyó que la temperatura era un parámetro que poseía una gran influencia en la cinética del proceso de entrecruzamiento, ya que un incremento de temperatura de 25 a 40 °C producía una reducción del proceso de entrecruzamiento de 14 días a alrededor de 24 h. Este estudio se centró en una concentración de tensioactivo constante, que correspondía a una región micelar (Figura 4.1). La formación de espumas de quitosano en presencia de estructuras tensioactivas más complejas (cristales líquidos) no fue posible, con este tensioactivo, debido a un fenómeno de inversión de fases al incrementar el porcentaje de

tensioactivo y decano añadidos, tal y como se ha descrito en un trabajo previo [Miras, 2011]. Con la finalidad de obtener espumas de quitosano en emulsiones con fase externa de cristal líquido, se utilizó el tensioactivo Pluronic<sup>®</sup> P123. El diagrama ternario obtenido para el sistema Solución de quitosano / Solución reguladora de fosfatos / Pluronic<sup>®</sup> P123 / Decano (Figura 4.5) mostró que el tensioactivo Pluronic<sup>®</sup> P123 podría ser un óptimo candidato para la obtención de dichos materiales. Los resultados obtenidos y las conclusiones alcanzadas para el sistema con el tensioactivo Synperonic A7 permitieron optimizar las condiciones experimentales para este segundo sistema a estudiar. A partir de dichos resultados, se decidió realizar todo el estudio con el tensioactivo Pluronic<sup>®</sup> P123 a 40 °C y a una única velocidad de agitación de 700 rpm.

#### **4.4 PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EMULSIONES ALTAMENTE CONCENTRADAS CON LOS SISTEMAS ÁCIDO ACÉTICO / SOLUCIÓN REGULADORA DE FOSFATOS / PLURONIC<sup>®</sup> P123 / DECANO Y QUITOSANO / SOLUCIÓN REGULADORA DE FOSFATOS / PLURONIC<sup>®</sup> P123 / DECANO**

Como en el sistema anterior, en este nuevo sistema constituido por Solución de quitosano / Solución de reguladora de fosfatos / Pluronic<sup>®</sup> P123 / Decano se estudió la estabilidad cinética de las emulsiones y cómo la presencia de quitosano en la fase continua influía en sus propiedades. Además, se llevó a cabo un estudio de cómo estas propiedades podían variar en función de la concentración de tensioactivo.

Como reflejaron los resultados del diagrama de fases ternario (Figura 4.5), el incremento de concentración de tensioactivo podría posibilitar la obtención de emulsiones altamente concentradas, en presencia de quitosano, con fase externa de cristal líquido (CL), es decir, emulsiones de tipo aceite en cristal líquido (O/CL). La presencia de estructuras de cristal líquido en la fase continua de las emulsiones les podría proporcionar mayor estabilidad cinética. La elevada viscosidad de la fase continua, debido a la presencia del cristal líquido, dificulta el movimiento de las gotas y evita o reduce procesos de desestabilización como coalescencia o cremado/sedimentación [Friberg, 1971, 1976; Rodríguez-Abreu, 2008; Alam 2014]. Dicho incremento de la estabilidad cinética confiere a este tipo de emulsiones un interés

especial en el campo de la cosmética [Makai, 2003] o para sistemas de liberación controlada de principios activos [Saulnier, 2008]. Otra interesante aplicación de este tipo de emulsiones sería la obtención de espumas de quitosano duales meso/macroporosas. La preparación de este tipo de emulsiones se ha descrito en mayor detalle en la Introducción (apartado 1.4.2). Las estructuras características de estas emulsiones permiten obtener macroporos por el efecto plantilla de las gotas de la emulsión y mesoporos debido a la estructura nanométrica de las fases de cristal líquido presente en la fase continua de las emulsiones [Esquena, 2012; Nestor, 2013].

Un posible método de preparación de emulsiones de tipo O/CL es realizando el proceso de emulsificación a temperaturas superiores a la temperatura de fusión del cristal líquido presente en la fase continua de las emulsiones, para de esta manera facilitar la agitación durante la emulsificación [Rodríguez-Abreu, 2008; Alam, 2014]. En este sistema, el diagrama de fases ternario (Figura 4.5) indicó que se debería trabajar a una temperatura mínima de 50 °C para fundir el cristal líquido. No obstante, ensayos preliminares evidenciaron un proceso de evaporación, probablemente del ácido acético presente en la fase continua de las emulsiones. Para evitar dicho proceso y, por lo tanto, cambios en la composición de las emulsiones, éstas se prepararon a 25 °C, tal como se describe detalladamente en la sección Experimental (apartado 3.3.2).

#### **4.4.1 Influencia del quitosano, de la concentración de tensioactivo y del tiempo en el tamaño de gota**

Se siguió un procedimiento de caracterización similar al utilizado para el sistema con Synperonic A7. Las emulsiones con el tensioactivo Pluronic<sup>®</sup> P123, descritas en el apartado Experimental (Tabla 3.2), se prepararon a dos concentraciones, 2 y 9 %. Dichas concentraciones, según el diagrama ternario (Figura 4.5), corresponden a fases de solución micelar y de cristal líquido laminar, respectivamente. Por lo tanto, se obtuvieron dos tipos de emulsiones altamente concentradas, emulsiones de tipo aceite en fase de solución micelar (O/W<sub>m</sub>) y de tipo aceite en fase de cristal líquido (O/CL). Estas dos composiciones se caracterizaron mediante diversas técnicas: microscopía óptica, difracción de luz láser y reología. Debido a la obtención de emulsiones O/CL, fue necesaria también la utilización de la técnica de SAXS para identificar dichas estructuras de agregados tensioactivos.

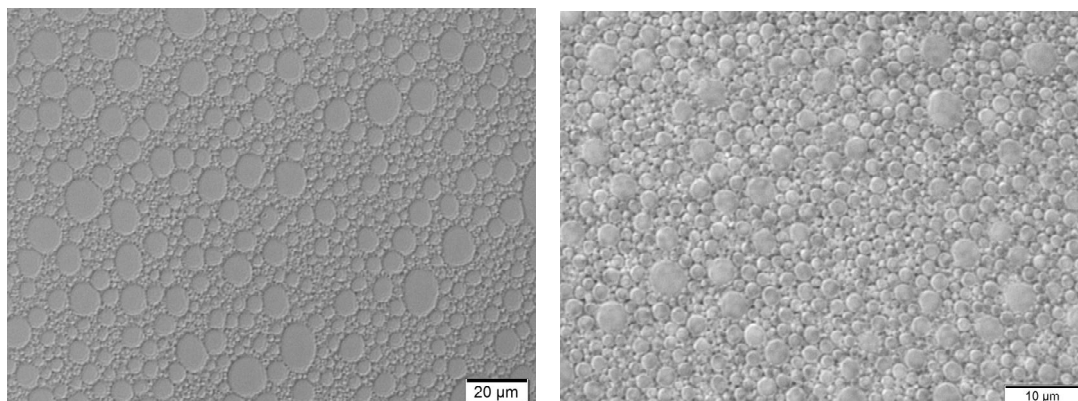
#### ***4.4.1.1 Microscopía óptica***

Las emulsiones preparadas al 2 y 9 % Pluronic<sup>®</sup> P123 se caracterizaron mediante microscopía óptica para analizar la influencia de la concentración de tensioactivo en la estabilidad y tamaño de gota de dichas emulsiones. Además, como en el sistema anterior, también se estudió la influencia de la incorporación del quitosano. La caracterización de las emulsiones preparadas al 9 % Pluronic<sup>®</sup> P123 (EAC7 y EAC8), mediante microscopía óptica, se tuvo que realizar diluyendo la muestra, con una solución del tensioactivo a la concentración de la CMC. Esta dilución fue necesaria debido a la elevada elasticidad que presentaba la emulsión y a la dificultad de obtener una capa fina para realizar una correcta observación. Además, la muestra presentaba un aspecto translúcido que indicaba que el índice de refracción entre ambas fases era similar, lo cual dificultaba la observación de la interfase de las gotas. Las Figura 4.41 y Figura 4.42 muestran las imágenes de microscopía óptica a una concentración de tensioactivo del 2 y 9 %, respectivamente, en ausencia y presencia de quitosano para analizar la variación del tamaño de gota en función del tiempo (recién preparada, a  $t = 0$  h, y transcurridas  $t = 72$  h).

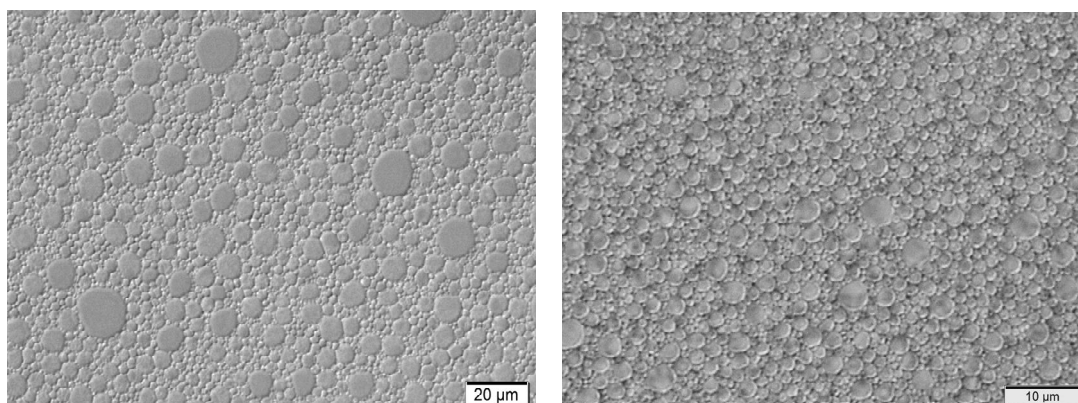
EAC4 (sin quitosano), 2% P123

EAC5 (con quitosano), 2% P123

t=0 h



t=72 h



**Figura 4.41** Fotografías de microscopía óptica de las emulsiones a tiempos  $t = 0$  h y  $t = 72$  h, a  $40$  °C, para una concentración de tensioactivo Pluronic<sup>®</sup> P123 del 2 % (EAC4 y EAC5), en ausencia y presencia de quitosano.

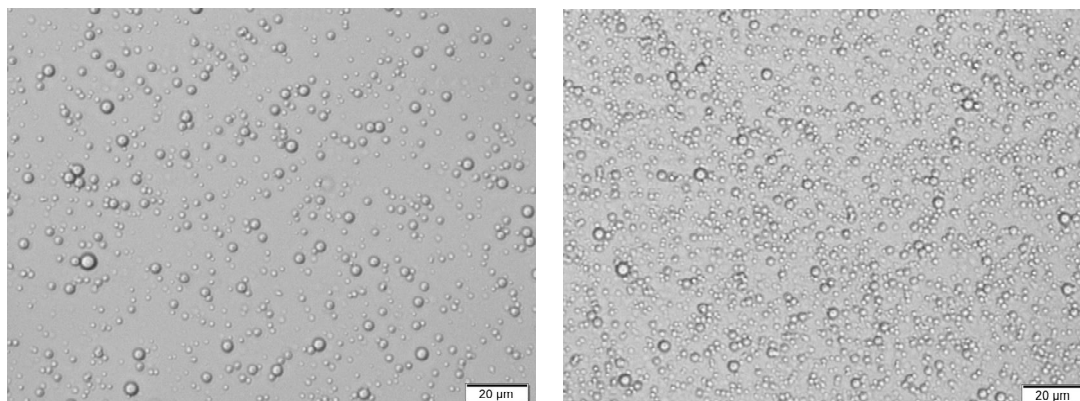
Las imágenes de microscopía óptica muestran una clara reducción del tamaño de gota debido a la incorporación de quitosano en las emulsiones con un 2 % Pluronic<sup>®</sup> P123 (Figura 4.41, EAC4 y EAC5), al observar una reducción del diámetro de gota de aproximadamente el 50%.



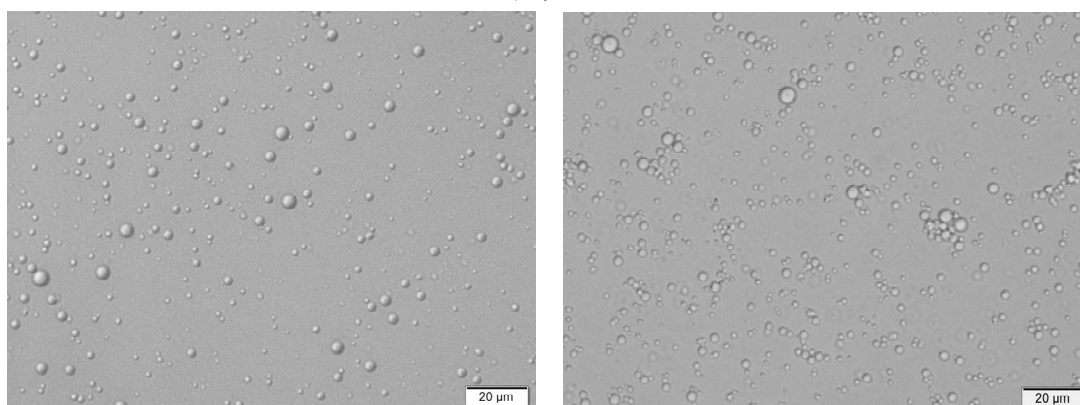
EAC7 (sin quitosano), 9% P123

EAC8 (con quitosano), 9% P123

t=0 h



t=72 h

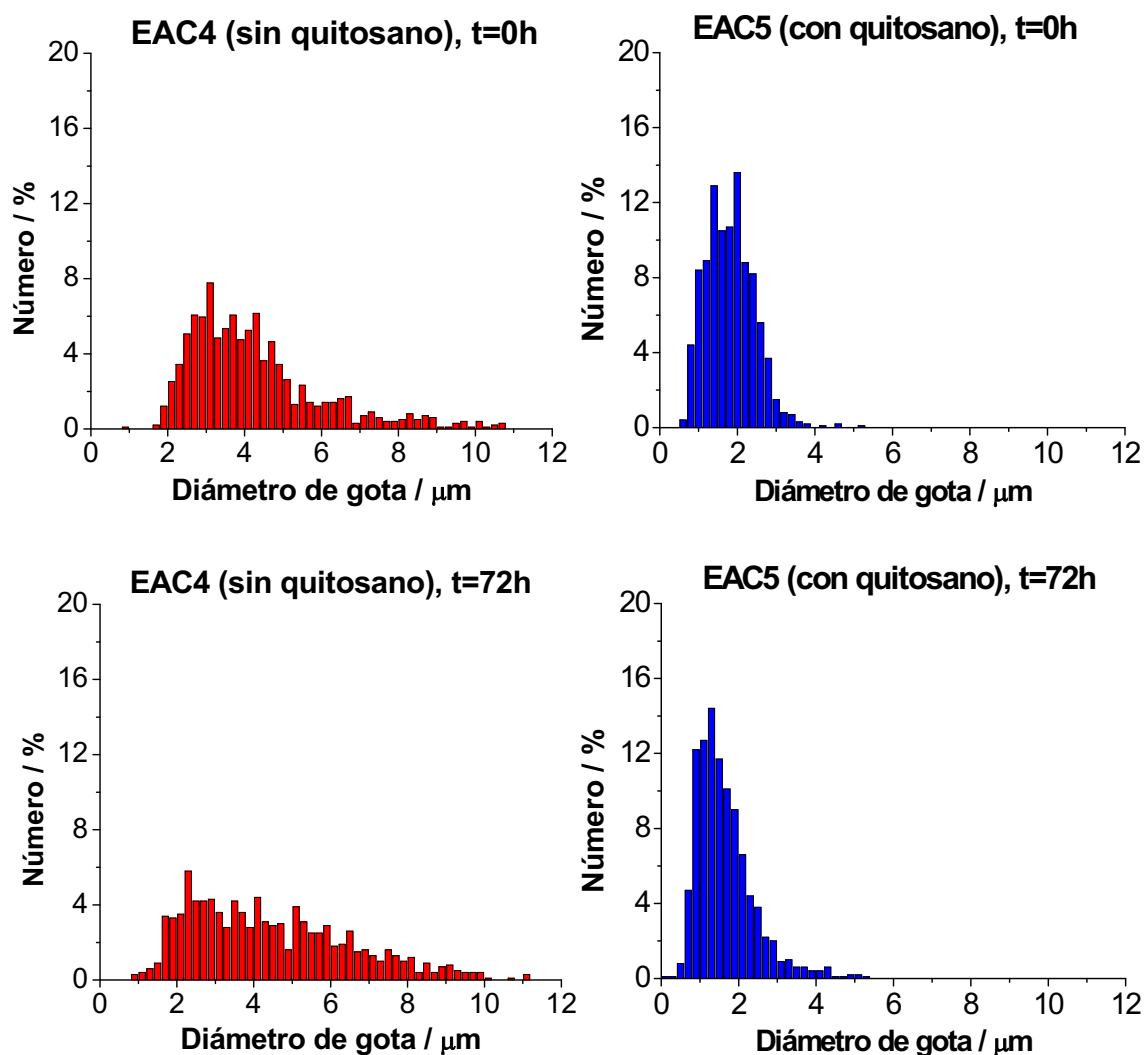


**Figura 4.42** Fotografías de microscopía óptica de las emulsiones a tiempos  $t = 0$  h y  $t = 72$  h, a  $40$  °C, para una concentración de tensioactivo Pluronic<sup>®</sup> P123 del 9 % (EAC7 y EAC8), en ausencia y presencia de quitosano.

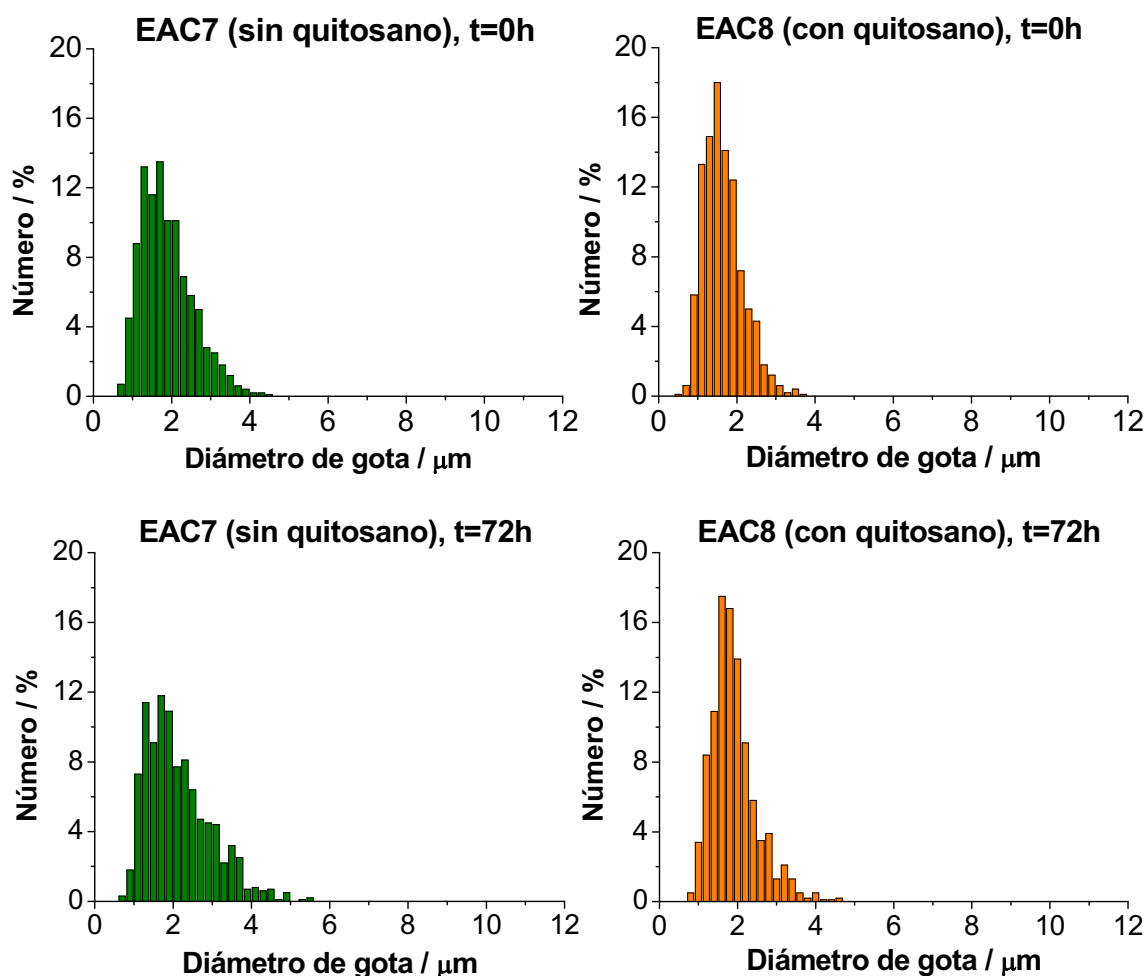
La reducción del tamaño de gota observada al 2 % de tensioactivo (Figura 4.41) no es tan clara o evidente en las emulsiones preparadas con un 9 % de Pluronic<sup>®</sup> P123 (Figura 4.42, EAC7 y EAC8). En este caso, la incorporación de quitosano parece no afectar al diámetro de gota. Dicho comportamiento podría estar relacionado con la presencia de cristal líquido y la elevada viscosidad de este tipo de emulsiones. Este comportamiento se analizará en los siguientes apartados.

En relación a la estabilidad cinética de estas emulsiones a las dos concentraciones de tensioactivo utilizadas, no se observó un incremento relevante del tamaño de gota de las emulsiones durante los 3 días de observación. Para analizar estos parámetros con mayor precisión, se obtuvieron las distribuciones de diámetro de gota de las emulsiones a partir

de las imágenes de microscopía óptica (Figura 4.43 y Figura 4.44). Dichas distribuciones se representan en número (%), aunque posteriormente también se presentarán las distribuciones en volumen (%) para comparar estos resultados con los obtenidos mediante difracción de luz láser.



**Figura 4.43** Distribuciones de tamaño de gota, en número (%), de las emulsiones EAC4 (sin quitosano) y EAC5 (con quitosano) a tiempos  $t = 0$  h y  $t = 72$  h, a  $40$   $^{\circ}\text{C}$ , para una concentración de tensioactivo de 2 %, obtenidas a partir de las imágenes de microscopía óptica.



**Figura 4.44** Distribuciones de tamaño de gota, en número (%), de las emulsiones EAC7 (sin quitosano) y EAC8 (con quitosano) a tiempos  $t = 0$  h y  $t = 72$  h, a  $40$  °C, para una concentración de tensioactivo de 9 %, obtenidas a partir de las imágenes de microscopía óptica.

Las distribuciones de diámetro de gota muestran con mayor claridad la influencia de la incorporación de quitosano y el incremento de la concentración de tensioactivo. Se debe destacar que el quitosano produce un desplazamiento del histograma a tamaños de gota inferiores, efecto observado principalmente al 2 % P123 al comparar la emulsión EAC4 con EAC5 (Figura 4.43). Sin embargo, cuando la concentración de tensioactivo se incrementa al 9 % P123, la incorporación de quitosano no produce cambios importantes (Figura 4.44). Este incremento de concentración de tensioactivo da lugar también a un desplazamiento a valores inferiores de tamaño de gota si se comparan EAC4 con EAC7 y EAC8 (Figura 4.43 y Figura 4.44). Además, tanto la incorporación de quitosano, como el incremento de la concentración de tensioactivo, producen también una reducción en la polidispersidad de las emulsiones.

A partir de los histogramas mostrados (Figura 4.43 y Figura 4.44), se calculó la media geométrica del diámetro de gota,  $D_{m.g.}$  (Ecuación 3.7) y su intervalo de confianza,  $IC$  (Ecuación 3.8) a los tiempos 0, 24, 48 y 72 h. Dichos resultados se muestran en la Tabla 4.7, para las dos composiciones estudiadas en ausencia y presencia de quitosano. Como la distribución del diámetro de gota es asimétrica con cola a la derecha (Figura 4.43 y Figura 4.44), la media aritmética no es un buen estadístico de centralidad, por lo que se utilizó la media geométrica.

**Tabla 4.7** Media geométrica del diámetro de gota,  $D_{m.g.}$  ( $\mu\text{m}$ ), e intervalo de confianza del 95 %,  $IC_{95\%}$ , para las emulsiones EAC4 y EAC5 (2 % P123, en ausencia y presencia de quitosano respectivamente) y EAC7 y EAC8 (9 % P123, en ausencia y presencia de quitosano respectivamente) obtenidas de las imágenes de microscopía óptica.

		$D_{m.g.}$ ( $IC_{95\%}$ ) / $\mu\text{m}$			
		t = 0 h	t = 24 h	t = 48 h	t = 72 h
<b>2 % P123</b>	<b>EAC4</b>	3,14 (3,05-3,23)	3,41 (3,32-3,50)	3,75 (3,65-3,86)	3,96 (3,85-4,08)
	<b>EAC5</b>	1,71 (1,67-1,74)	1,57 (1,53-1,60)	1,56 (1,52-1,61)	1,50 (1,46-1,54)
<b>9 % P123</b>	<b>EAC7</b>	1,76 (1,72-1,80)	2,07 (2,03-2,12)	2,07 (2,02-2,11)	1,98 (1,94-2,03)
	<b>EAC8</b>	1,57 (1,54-1,60)	1,60 (1,57-1,64)	1,81 (1,77-1,84)	1,82 (1,79-1,85)

A continuación, se realizó un análisis estadístico de las variables involucradas (concentración de tensioactivo, presencia de quitosano y tiempo) a partir de los valores del diámetro de gota para las cuatro composiciones estudiadas. Los resultados se muestran a continuación.

4.4.1.1.1 Análisis estadístico para los sistemas Solución ácido acético / Solución reguladora de fosfatos / Pluronic® P123 / Decano y Quitosano / Solución reguladora de fosfatos / Pluronic® P123 / Decano

Para el análisis estadístico, se siguió el mismo procedimiento que con el anterior sistema formado por el tensioactivo Synperonic A7. Como en el caso anterior, la variable diámetro de gota no seguía una distribución Normal( $\mu, \sigma^2$ ) y fue transformada

mediante la aplicación del logaritmo neperiano. Los tests no paramétricos de la suma de rangos de Wilcoxon y el test de Kruskal-Wallis [Wilcoxon, 1945, Kruskal, 1957] mostraron que existían diferencias significativas en la distribución del logaritmo neperiano del diámetro de gota para las diferentes categorías de los factores (presencia de quitosano, concentración de tensioactivo y tiempo), como se muestra en Anexos (Anexos, apartado 8.5). Respecto a la presencia de quitosano, la distribución del logaritmo neperiano del diámetro de gota es menor al incorporar el quitosano a la emulsión. En este ocasión, al realizar las comparaciones dos a dos entre pares de tiempos, también se encontraron diferencias estadísticamente significativas para todas las comparaciones, después de ajustar por comparaciones múltiples, utilizando el método False Discovery Rate [Simes, 1986; Benjamini, 1995; Benjamini, 2001].

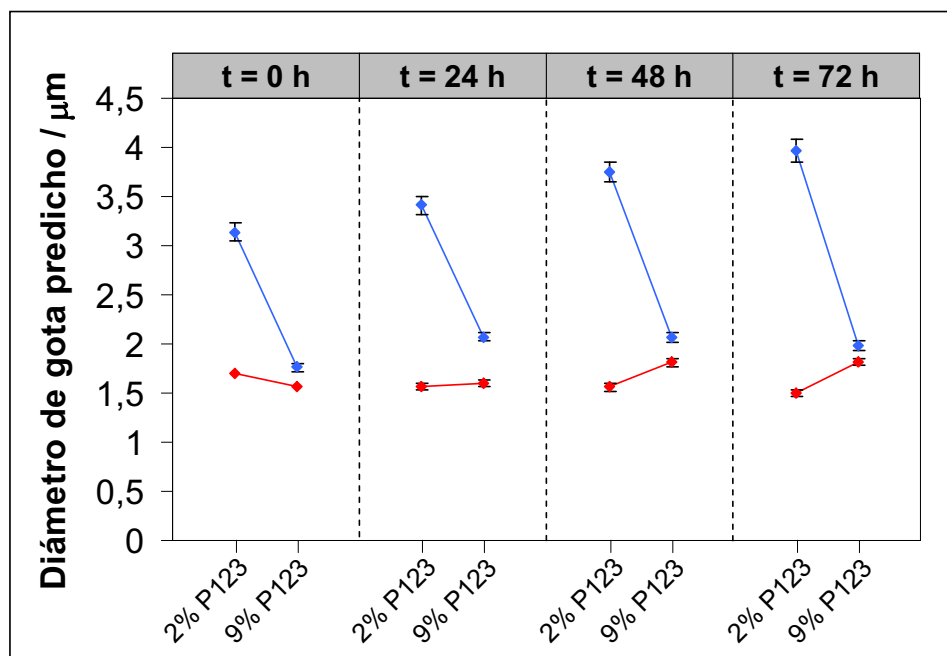
Además de los tests no paramétricos, como en el sistema anterior, se realizó un análisis de regresión lineal múltiple y se ajustó una ecuación lineal empírica para estimar cómo afectaban los factores estudiados y sus interacciones de segundo y tercer orden en el logaritmo neperiano del diámetro de gota (Ecuación 4.7) [Kleinbaum, 1988; Peña, 2002; Mitchell, 2012] (Anexos: apartado 8.6). Este modelo explica el 41,6 % de la variabilidad del logaritmo neperiano del diámetro de gota mediante los valores introducidos y sus interacciones. Debido a que la interacción de tercer orden es significativa, los resultados se deben interpretar teniendo en cuenta la combinación de los tres factores estudiados. El ajuste empírico corresponde a la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} \ln(\text{diámetro de gota}) = & 1,143 + (-0,577)*9\% \text{ Pluronic}^{\text{®}} \text{ P123} + \\ & (-0,609)*\text{siCHT} + 0,083*24\text{h} + 0,179*48\text{h} + 0,234*72\text{h} + 0,496*9\% \\ & \text{Pluronic}^{\text{®}} \text{ P123}*\text{siCHT} + 0,078*9\% \text{ Pluronic}^{\text{®}} \text{ P123}*24\text{h} + (-0,184)*9\% \\ & \text{Pluronic}^{\text{®}} \text{ P123}*48\text{h} + (-0,115)*9\% \text{ Pluronic}^{\text{®}} \text{ P123}*72\text{h} + \text{Ecuación 4.7} \\ & (-0,168)*\text{siCHT}*24\text{h} + (-0,266)*\text{siCHT}*48\text{h} + (-0,364)*\text{siCHT}*72\text{h} + \\ & 0,027*9\% \text{ Pluronic}^{\text{®}} \text{ P123}*\text{siCHT}*24\text{h} + 0,245*9\% \text{ Pluronic}^{\text{®}} \\ & \text{P123}*\text{siCHT}*48\text{h} + 0,392*9\% \text{ Pluronic}^{\text{®}} \text{ P123}*\text{siCHT}*72\text{h} \end{aligned}$$

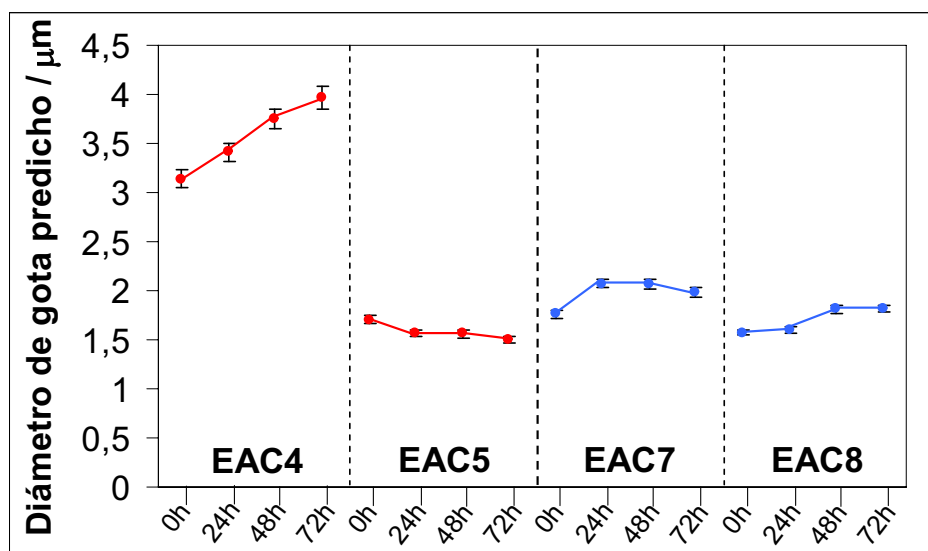
donde “siCHT” indica las composiciones en presencia de quitosano.

A continuación, se estimó el logaritmo del diámetro de gota medio predicho mediante el *Margins* del software Release 12 de STATA<sup>®</sup> [Baum, 2006; Cameron, 2010]. Los

resultados se exponenciaron para expresarlos en términos de la variable diámetro de gota original y se muestran en las Figura 4.45 y Figura 4.46. La Tabla 4.8 muestra los valores predichos por el modelo del diámetro de gota medio y su intervalo de confianza del 95 %.



**Figura 4.45** Diámetro de gota predicho considerando las variables independientes concentración de tensioactivo (2 y 9% Pluronic® P123), la presencia de quitosano y el tiempo. En azul, se indican las composiciones sin quitosano y en rojo, las que presentan quitosano.



**Figura 4.46** Valores del diámetro de gota predicho de las emulsiones al 2% Pluronic® P123, en ausencia (EAC4) y presencia (EAC5) de quitosano y las emulsiones al 9% Pluronic® P123, en ausencia (EAC7) y presencia (EAC8) de quitosano. Cada punto de cada serie indica los tiempos 0, 24, 48 y 72 h.

**Tabla 4.8** Estimación del diámetro medio de gota, junto con el intervalo de confianza del 95%, mediante el comando *Margins* de STATA® para EAC4 y EAC5 (2 % P123, en ausencia y presencia de quitosano respectivamente) y EAC7 y EAC8 (9 % P123, en ausencia y presencia de quitosano respectivamente).

		t=0h	t=24h	t=48h	t=72h
<b>2% P123</b>	<b>EAC4</b>	3,14 (3,05-3,23)	3,41 (3,32-3,50)	3,75 (3,65-3,88)	3,96 (3,85-4,08)
	<b>EAC5</b>	1,71 (1,67-1,74)	1,57 (1,53-1,60)	1,56 (1,52-1,61)	1,50 (1,46-1,54)
<b>9% P123</b>	<b>EAC7</b>	1,76 (1,72-1,80)	2,07 (2,03-2,12)	2,07 (2,02-2,11)	1,98 (1,94-2,03)
	<b>EAC8</b>	1,57 (1,54-1,60)	1,60 (1,57-1,64)	1,81 (1,77-1,84)	1,82 (1,79-1,85)

Los resultados muestran que el diámetro de gota medio predicho se mantiene aproximadamente constante, en el tiempo, en las emulsiones EAC5 (2 % P123, en presencia de quitosano), EAC7 y EAC8 (9 % P123, en ausencia y presencia de quitosano, respectivamente), mientras que EAC4 (2 % P123, en ausencia de quitosano) presenta un leve incremento del diámetro de gota medio predicho. Estos resultados indicarían que el sistema presenta una mayor estabilidad que el sistema formado con Synperonic A7 (Figura 4.15 y Figura 4.16). La composición EAC4 (2 % Pluronic® P123 en ausencia de quitosano) muestra una reducción significativa y del mismo orden del diámetro de gota predicho, tanto al incorporar el quitosano (EAC5), como al incrementar la concentración de tensioactivo (EAC7). Los resultados también indican que la incorporación de quitosano produce una reducción del diámetro de gota medio bastante menor en presencia de cristal líquido, de EAC7 a EAC8, al compararla con la reducción de diámetro de gota producido de EAC4 a EAC5.

A partir del análisis estadístico, los resultados indicaron que tanto la presencia de quitosano como la formación de una estructura de cristal líquido producen una reducción en el diámetro de gota medio. Esto podría ser debido al incremento de la viscosidad de la fase continua de las emulsiones y la consiguiente reducción del diámetro de gota al producirse una mayor cizalla durante el proceso de emulsificación. Este incremento de cizalla produce un aumento de la deformación de las gotas que origina la reducción del tamaño de gota [Walstra, 1983; Tadros, 2009b; Miras, 2013a, 2013b]. La diferencia de viscosidad entre las emulsiones con fase externa micelar

(EAC4 y EAC5) y las que presentan fase externa de cristal líquido (EAC7 y EAC8) era apreciable macroscópicamente, por observación visual, tras finalizar el proceso de emulsificación. Estos resultados indicarían que la presencia de cristal líquido produce un incremento de viscosidad superior en la fase continua que la incorporación de quitosano. No obstante, este importante incremento de viscosidad debido a la presencia de cristal líquido (EAC7 y EAC8) no produce la reducción del diámetro de gota que cabría esperar. Estos resultados muestran una reducción de tamaño similar a la producida por la incorporación de quitosano en emulsiones de fase micelar (EAC5). Este efecto se estudiará más detalladamente en los siguientes apartados.

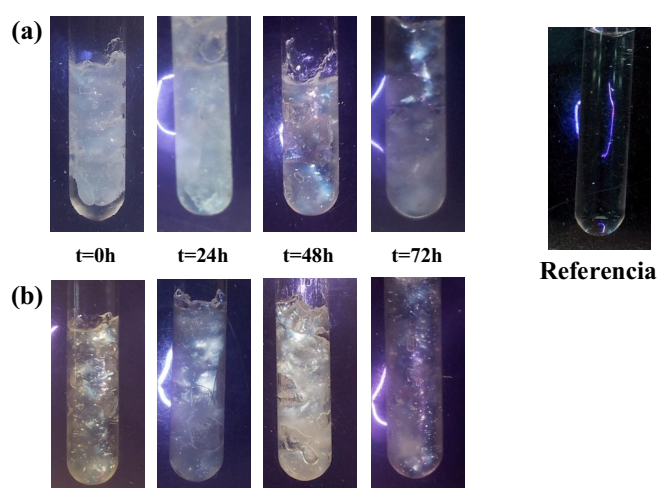
Como ya se comentó con el sistema anterior utilizando el tensioactivo Synperonic A7, es posible determinar la eficacia del proceso de emulsificación a partir del cálculo de un diámetro medio de gota teórico ( $D_{teórico}$ ). A partir de la Ecuación 3.9 [Vilasau, 2011], presentada en la sección Experimental, se obtuvo un  $D_{teórico}$  de 4,6 y 1  $\mu\text{m}$ , para las dos concentraciones de tensioactivo estudiadas, 2 y 9 % Pluronic<sup>®</sup> P123, respectivamente. Al comparar estos dos valores con los resultados a  $t = 0$  h (Tabla 4.7) muestran que las emulsiones EAC4 y EAC5 presentan valores de 3,1 y 1,7  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Dichos valores experimentales son inferiores al valor mínimo teórico ( $D_{teórico} = 4,6 \mu\text{m}$ ), lo que implica una contradicción. El valor del tamaño de gota mínimo teórico podría ser erróneo, debido a la imprecisión del valor del área superficial por molécula de tensioactivo ( $a_s$ ) encontrado en la literatura [Alexandridis, 1994], 0,5  $\text{nm}^2/\text{molécula}$ , que parece un valor excesivamente bajo. Estudios recientes han sugerido que la determinación del valor del  $a_s$  de tensioactivos poliméricos, como el Pluronic<sup>®</sup> P123, mediante tensión superficial podría presentar cierto error experimental debido a que estos sistemas requieren de tiempos de equilibrio relativamente elevados. Otros autores [Wanka, 1994] obtuvieron valores de  $a_s = 2 \text{ nm}^2/\text{molécula}$ , superior al descrito por Alexandridis, que podría ser más representativo para un tensioactivo copolímero de bloque. A partir de este valor, se obtuvieron unos valores de  $D_{teórico}$  de 1,1 y 0,2  $\mu\text{m}$  para 2 y 9 % Pluronic<sup>®</sup> P123, respectivamente. Estos resultados, inferiores a los obtenidos experimentalmente, estarían indicando que sería posible reducir el tamaño de gota a través de una mayor cizalla aplicada al sistema durante la emulsificación.



El estudio realizado mediante microscopía óptica y el análisis estadístico realizado posteriormente mostraron que la incorporación de quitosano produjo un incremento de viscosidad. Además, se pudo observar que el incremento de la concentración de tensioactivo, del 2 (EAC4 y EAC5) al 9 % Pluronic<sup>®</sup> P123 (EAC7 y EAC8) dio lugar a un incremento de viscosidad muy superior y a un cambio de comportamiento estructural, obteniendo una emulsión totalmente elástica. Este cambio de comportamiento al incrementar la concentración de tensioactivo se atribuyó a la presencia de cristal líquido en la fase continua de las emulsiones, como indicaba el diagrama de fases (Figura 4.5), que mostraba la presencia de una fase de cristal líquido laminar a una concentración del con 9 % de Pluronic<sup>®</sup> P123. Para confirmar la presencia de dicha estructura en las emulsiones, detectada en el diagrama de fases, se caracterizaron las emulsiones con fase externa de cristal líquido, primero mediante observación visual y posteriormente, mediante dispersión de rayos X a ángulo pequeño (SAXS).

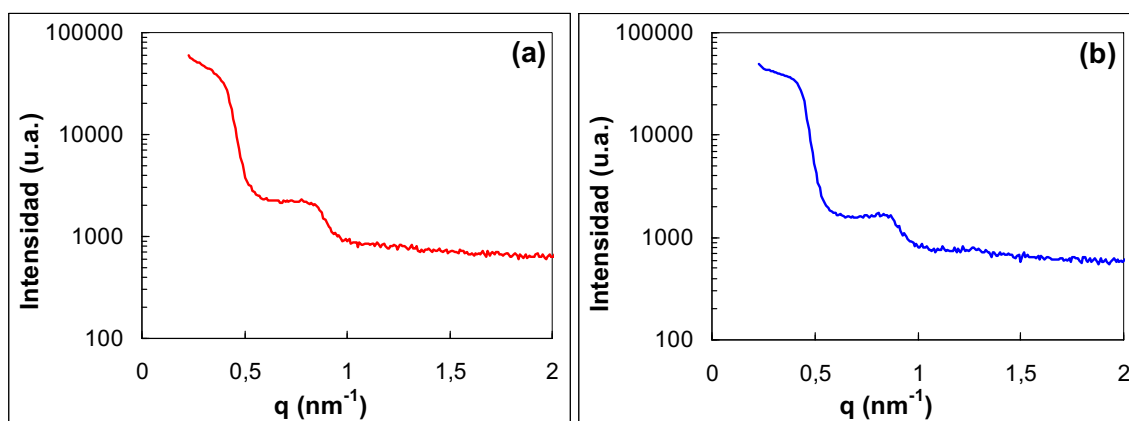
4.4.1.1.2 *Determinación de las estructuras tensioactivas de la fase continua de las emulsiones*

La formación de una estructura de cristal líquido en la fase continua de las emulsiones se identificó, inicialmente, mediante observación visual a través de polarizadores cruzados en función del tiempo (Figura 4.47). Ambas emulsiones, EAC7 y EAC8, sin y con quitosano respectivamente, presentaron birrefringencia durante las 72 h de observación, confirmando la presencia de cristal líquido.



**Figura 4.47** Fotografías de las emulsiones (a) EAC7 y (b) EAC8, con una concentración de tensioactivo del 9 % Pluronic<sup>®</sup> P123, a través de polarizadores cruzados a 40°C y a los tiempos 0, 24, 48 y 72 h. Se muestra una fotografía, como referencia, de un sistema isótropo o no birrefringente.

Según el diagrama de fases (Figura 4.5), una concentración de tensioactivo del 9 % Pluronic® P123 en un rango de temperaturas entre 25 y 60 °C corresponde a una fase de cristal líquido laminar. Para confirmar dicha estructura en la fase continua de las emulsiones altamente concentradas (Tabla 3.2), éstas se caracterizaron mediante microscopía óptica con luz polarizada. Mediante esta técnica se estudió la textura de la muestra para identificar el tipo de cristal líquido formado. Sin embargo, en la muestra no se observó birrefringencia al observarla por microscopía óptica con luz polarizada. Una posible explicación sería la deformación de la estructura de cristal líquido por procesos de cizalla durante la preparación de la muestra [Basappa, 1999]. A partir de estos resultados, se caracterizaron estas emulsiones mediante dispersión de rayos X a ángulo pequeño (SAXS) a 25 y 40 °C para identificar la estructura de cristal líquido, como se muestra en la Figura 4.48.



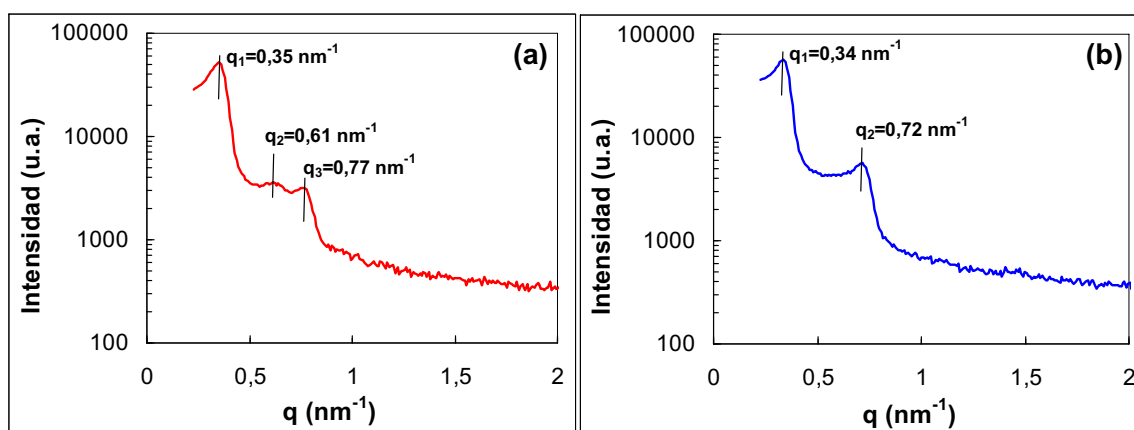
**Figura 4.48** Espectros de SAXS de la emulsión altamente concentrada EAC8 (9 % Pluronic® P123 y en presencia de quitosano) a 25 °C (a) y a 40 °C (b).

Los espectros obtenidos para la EAC8 indican que la emulsión podría presentar una cierta mesoestructura ordenada debido a la presencia de agregados tensioactivos (estructura de cristal líquido), aunque no fue posible confirmar el tipo de cristal líquido por la poca intensidad de los picos. Una posible explicación podría ser el bajo porcentaje de cristal líquido presente en una emulsión altamente concentrada con un 20 % de fase continua. Para incrementar este porcentaje de cristal líquido y obtener espectros de mayor nitidez, se preparó una emulsión diluida aceite en agua (O/W) invirtiendo los porcentajes de ambas fases y preparando una emulsión con relación fase continua:fase dispersa de 80:20. La composición se modificó manteniendo constante la concentración de tensioactivo en la fase continua de la emulsión (45 % Pluronic® P123).

Dicha composición se muestra en la Tabla 4.9 y sus correspondientes espectros de SAXS en la Figura 4.49.

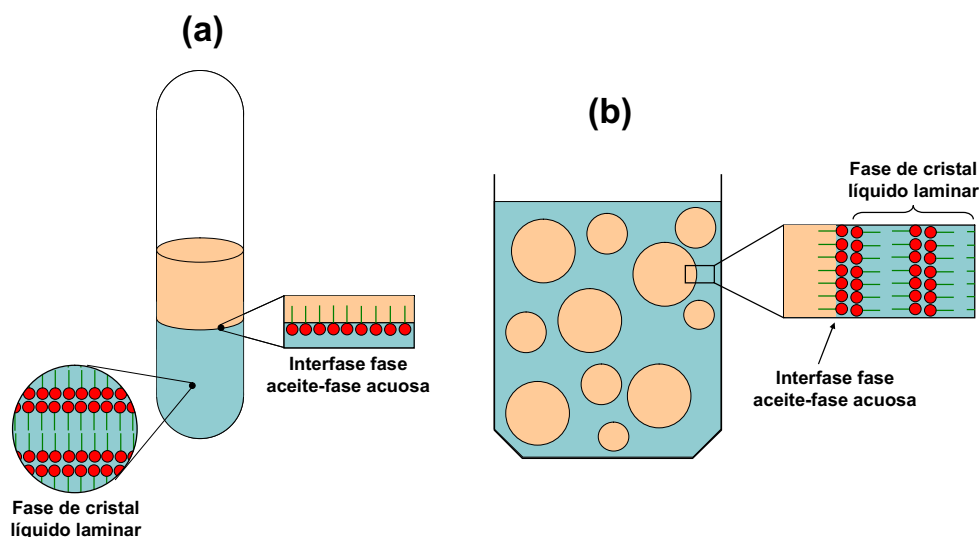
**Tabla 4.9** Composición (% p/p) de la emulsión diluida con un 45 % de Pluronic® P123 en la fase continua.

Pluronic® P123	Quitosano 2 % (p/v)	Solución reguladora de fosfatos	Decano
36	22	22	20



**Figura 4.49** Espectros de SAXS de la emulsión diluida con la misma concentración de P123 en la fase continua que la EAC8 (9 % Pluronic® P123 y en presencia de quitosano) a 25 °C (a) y a 40 °C (b).

Los espectros de SAXS muestran que la emulsión presentaba un cristal líquido hexagonal a 25 °C, al mantener una relación aproximada entre picos de  $1:\sqrt{3}:2$ , y un cristal líquido laminar al incrementar la temperatura a 40 °C, al presentar una relación entre picos de 1:2. Los resultados obtenidos mediante el diagrama de fases ternario (Figura 4.5), indicaron que este comportamiento fásico se observó a 25 y 40 °C en un rango de concentraciones de tensioactivo entre 7 y 8 %, aproximadamente. Este ligero desplazamiento a una concentración de tensioactivo inferior al 9 % podría estar relacionado con el incremento del área interfacial producido en las emulsiones (Figura 4.50), al compararse con una muestra de comportamiento fásico. Dicho incremento conlleva un desplazamiento de las moléculas de tensioactivo a la interfase para estabilizar la emulsión (Figura 4.50b). El tensioactivo situado en la interfase proviene de la fase continua de la emulsión, con la consiguiente reducción en concentración, obteniendo una menor cantidad de tensioactivo en la fase continua de lo esperado, como podrían estar reflejando los resultados de SAXS de la EAC8 (Figura 4.49).



**Figura 4.50** Esquema de la formación de fases de cristal líquido en muestras de (a) comportamiento fásico y (b) emulsiones.

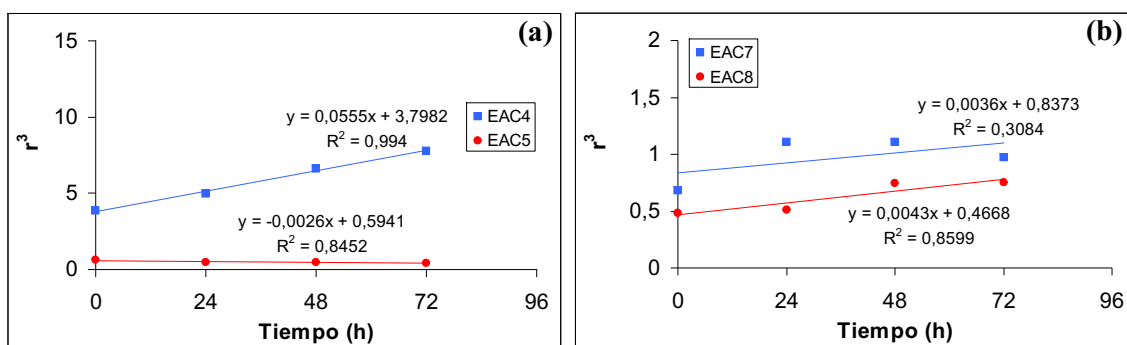
En conclusión, los resultados obtenidos mediante SAXS han demostrado la presencia de una estructura de cristal líquido laminar, en la fase continua de las emulsiones, al incrementar la concentración de tensioactivo del 2 al 9 %. Además, la caracterización de las emulsiones por microscopía óptica ha mostrado una clara influencia de la incorporación del quitosano y la presencia de estructuras de cristal líquido, al dar lugar, en ambos casos, a una reducción importante en el tamaño de gota y la polidispersidad. Estos resultados podrían indicar la gran influencia de la viscosidad de la fase continua sobre el tamaño de gota de las emulsiones, la cual se discutirá en una sección posterior.

A continuación, también se determinó la estabilidad de las emulsiones en función de la presencia de quitosano y las estructuras tensioactivas presentes (micelar o cristal líquido) en la fase continua.

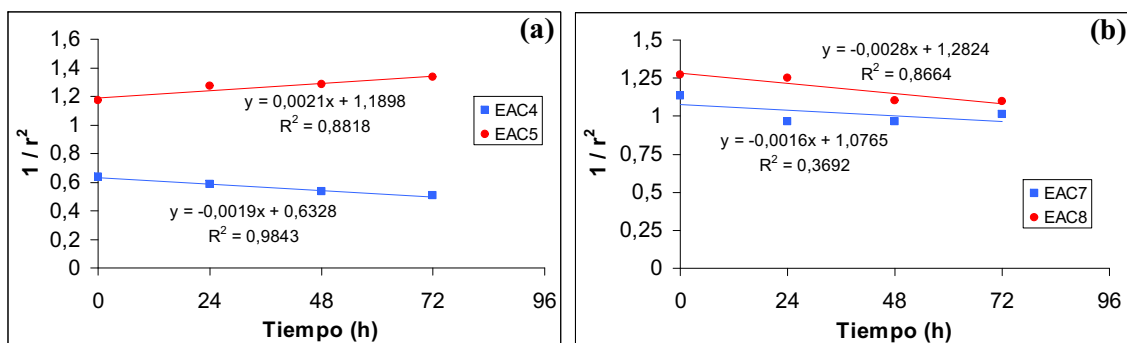
#### 4.4.1.1.3 *Determinación de los posibles mecanismos de desestabilización*

Aunque se observa un leve aumento del tamaño de gota en función del tiempo durante las 72 h de caracterización a 40 °C, principalmente para EAC4, los resultados obtenidos (Figura 4.43 - Figura 4.46 y Tabla 4.7) muestran que las emulsiones podrían considerarse estables. Estas características serían ideales para utilizar dicho sistema como medio de reacción en la preparación de materiales porosos de quitosano. No obstante, se analizó si el ligero incremento del diámetro medio de gota detectado podría

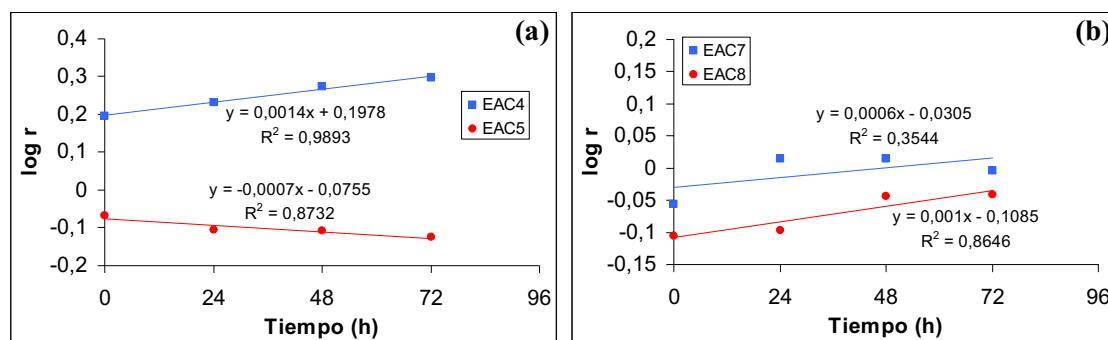
ser debido a coalescencia y/o maduración de Ostwald [Lifshitz, 1961; Wagner, 1961; Tadros, 1983], estudiando ambas posibilidades, como en el sistema anterior con el tensioactivo Synperonic A7. Se determinó si la variación de tamaño se debía a maduración de Ostwald (Ecuación 4.2) o a coalescencia según el modelo de Deminière (Ecuación 4.3) o un modelo de cinética de primer orden (Ecuación 4.4). Estos resultados se muestran en las Figura 4.51, Figura 4.52 y Figura 4.53, respectivamente.



**Figura 4.51** Radio de gota al cubo ( $r^3$ ) en función del tiempo para (a) EAC4 y EAC5 (2 % P123, en ausencia y presencia de quitosano, respectivamente) y (b) EAC7 y EAC8 (9 % P123, en ausencia y presencia de quitosano, respectivamente).



**Figura 4.52** Inverso del radio de gota al cuadrado ( $1/r^2$ ) en función del tiempo para (a) EAC4 y EAC5 (2 % P123, en ausencia y presencia de quitosano, respectivamente) y (b) EAC7 y EAC8 (9 % P123, en ausencia y presencia de quitosano, respectivamente).



**Figura 4.53** Logaritmo del radio de gota ( $\log r$ ) en función del tiempo para (a) EAC4 y EAC5 (2 % P123, en ausencia y presencia de quitosano, respectivamente) y (b) EAC7 y EAC8 (9 % P123, en ausencia y presencia de quitosano, respectivamente).

Los resultados obtenidos, tanto para maduración de Ostwald como coalescencia, muestran buenos coeficientes de regresión ( $R^2 \approx 0,99$ ) para EAC4, que podrían indicar que ambos mecanismos tienen lugar de forma simultánea y que son los responsables del leve incremento de tamaño de gota observado en función del tiempo. Los valores que presentan EAC5 y EAC8 ( $R^2 < 0,87$ ) y EAC7 ( $R^2 < 0,36$ ) no permiten identificar el mecanismo de desestabilización y tampoco es posible determinar una clara influencia en la estabilidad de las emulsiones debido a la presencia de quitosano. No obstante, la incorporación de quitosano muestra una menor influencia sobre la estabilidad de las emulsiones en presencia de cristal líquido (EAC7 y EAC8), al presentar valores más parecidos.

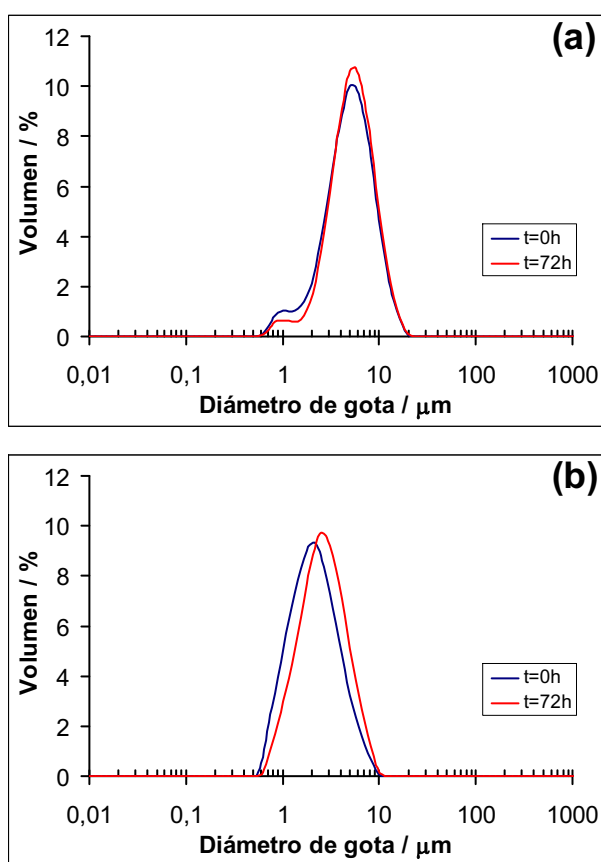
Al comparar los resultados de estabilidad de las emulsiones preparadas con Synperonic A7 con los obtenidos con Pluronic<sup>®</sup> P123, se observa que las pendientes de las cuatro composiciones obtenidas con Pluronic<sup>®</sup> P123, excepto EAC4, para maduración de Ostwald (Figura 4.51a) son ligeramente inferiores a las presentadas por el sistema con Synperonic A7 (Figura 4.17 - Figura 4.19). Este hecho demostraría que con el sistema con el tensioactivo Pluronic<sup>®</sup> P123 se pueden obtener emulsiones ligeramente más estables que con el Synperonic A7, aunque ambos sistemas presentan la estabilidad cinética necesaria para su utilización como medios de reacción en la preparación de espumas de quitosano.

Una vez caracterizadas las emulsiones altamente concentradas mediante microscopía óptica, también se estudió la distribución de tamaño de gota de dichas emulsiones mediante difracción de luz láser para realizar un estudio comparativo entre ambas

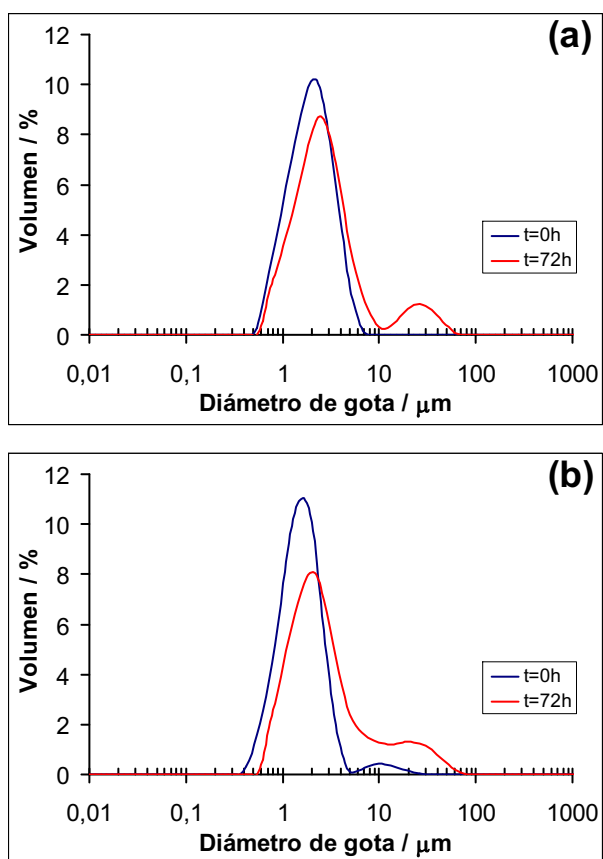
técnicas y obtener información adicional sobre la estabilidad cinética de estas emulsiones.

#### 4.4.1.2 Difracción de luz láser

Se determinó el tamaño de gota de las emulsiones mediante difracción de luz láser y se compararon los resultados con los obtenidos mediante microscopía óptica (apartado 4.4.1.1) Estos resultados se muestran en las Figura 4.54 y Figura 4.55, para el 2 % P123 y 9 % P123, respectivamente.



**Figura 4.54** Distribuciones de tamaño de gota, en volumen (%), de las emulsiones (a) EAC4 (sin quitosano) y (b) EAC5 (con quitosano) a tiempos  $t = 0$  h y  $t = 72$  h a  $40$  °C para una concentración de tensioactivo de 2 %, obtenidas mediante difracción de luz láser.



**Figura 4.55** Distribuciones de tamaño de gota, en volumen (%), de las emulsiones (a) EAC7 (sin quitosano) y (b) EAC8 (con quitosano) a tiempos  $t = 0$  h y  $t = 72$  h a  $40$  °C para una concentración de tensioactivo de 9 %, obtenidas mediante difracción de luz láser.

A partir de las distribuciones en volumen (%), se calcularon los valores de diámetro medio de gota de Brouckere,  $D[4,3]$  (Ecuación 3.5) y la polidispersidad,  $Span$  (Ecuación 3.6) para los tiempos 0, 24, 48 y 72 h, que se muestran en la Tabla 4.10.

**Tabla 4.10** Diámetro medio de gota,  $D[4,3]$ , y polidispersidad,  $Span$ , para las emulsiones EAC4 y EAC5 (2 % P123, en ausencia y presencia de quitosano respectivamente) y EAC7 y EAC8 (9 % P123, en ausencia y presencia de quitosano respectivamente) obtenidas de las medidas de difracción de luz láser.

	t = 0 h		t = 24 h		t = 48 h		t = 72 h	
	D[4,3]	Span	D[4,3]	Span	D[4,3]	Span	D[4,3]	Span
<b>EAC4</b>	6,0	1,5	6,0	1,5	6,1	1,4	6,2	1,4
<b>EAC5</b>	2,6	1,7	3,0	1,7	3,0	1,6	3,2	1,6
<b>EAC7</b>	2,3	1,4	2,5	1,5	7,6	8,2	5,7	4,7
<b>EAC8</b>	2,1	1,3	3,4	2,4	4,4	3,5	5,9	6,0



Para poder comparar los resultados de difracción de luz láser con los obtenidos mediante microscopía óptica fue necesario transformar las distribuciones de tamaño de gota representadas en número (%), mostradas en las Figura 4.43 y Figura 4.44, por su equivalente en volumen (%). A partir de las cuales, se obtuvieron los valores de  $D[4,3]$  y  $Span$ , procedentes de las medidas de microscopía óptica y mostrados en la Tabla 4.11. Los histogramas en volumen (%) correspondientes a EAC4, EAC5, EAC7 y EAC8 a  $t = 0$  h y  $t = 72$  h se muestran en el Anexo (Anexos, apartado 8.7).

**Tabla 4.11** Diámetro medio de gota,  $D[4,3]$ , y polidispersidad,  $Span$ , para las emulsiones EAC4 y EAC5 (2 % P123, en ausencia y presencia de quitosano respectivamente) y EAC7 y EAC8 (9 % P123, en ausencia y presencia de quitosano respectivamente) obtenidas de las imágenes de microscopía óptica.

	<b>t = 0 h</b>		<b>t = 24 h</b>		<b>t = 48 h</b>		<b>t = 72 h</b>	
	<b>D[4,3]</b>	<b>Span</b>	<b>D[4,3]</b>	<b>Span</b>	<b>D[4,3]</b>	<b>Span</b>	<b>D[4,3]</b>	<b>Span</b>
<b>EAC4</b>	6,5	1,0	6,6	1,1	6,8	0,9	7,0	0,7
<b>EAC5</b>	2,4	0,7	2,5	1,0	2,8	1,0	2,8	1,2
<b>EAC7</b>	2,6	0,7	2,8	0,6	2,9	0,7	3,1	0,8
<b>EAC8</b>	2,1	0,7	2,2	0,7	2,5	0,7	2,5	0,8

Las distribuciones de diámetro de gota de las emulsiones obtenidas mediante difracción de luz láser muestran una clara tendencia. Las emulsiones preparadas a una concentración de tensioactivo del 2 % (Figura 4.54) presentan una distribución monomodal y no se observa un incremento de tamaño de gota importante durante 72 h, indicando que las emulsiones son estables. La presencia de quitosano produce una reducción notable del tamaño de gota aunque la polidispersidad se mantiene en valores similares. Sin embargo, las emulsiones EAC7 y EAC8 (Figura 4.55), con un 9 % P123, muestran una población bimodal en función del tiempo. En base a los resultados obtenidos mediante microscopía óptica (Tabla 4.11 y Anexos, apartado 8.7), la segunda población, ubicada en tamaños de gota alrededor o superior a 10  $\mu\text{m}$ , probablemente se produce por algún proceso de floculación de las emulsiones, al diluirlas para su caracterización mediante difracción de luz láser.

Al comparar los resultados obtenidos mediante microscopía óptica (Tabla 4.11 y Anexos, apartado 8.7) y difracción de luz láser (Figura 4.54, Figura 4.55 y Tabla 4.10), sin considerar las segundas poblaciones detectadas mediante difracción de luz láser,

dichos resultados indican que ambas técnicas son adecuadas para la caracterización de emulsiones. No obstante, la caracterización por difracción de luz láser podría considerarse menos precisa para sistemas que presenten floculación. Este proceso produce desplazamientos importantes de tamaño de gota a valores superiores o incluso la aparición de segundas poblaciones. Por este motivo, junto con la dificultad de identificar los posibles procesos de desestabilización presente en las emulsiones mediante microscopía óptica, es necesaria la utilización de técnicas complementarias como la reología.

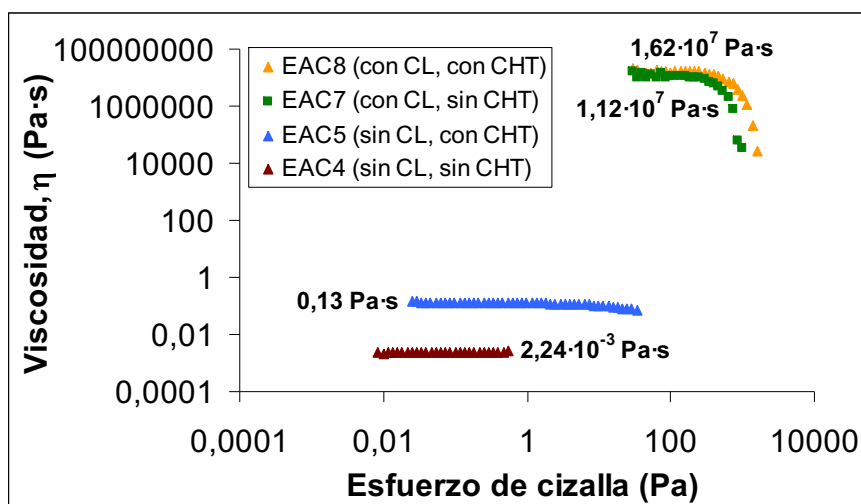
Tras los resultados obtenidos mediante microscopía óptica, se planteó la hipótesis que tanto la presencia de quitosano como la de estructuras de cristal líquido influían de forma importante sobre la variación del tamaño de gota, debido a un incremento de la viscosidad de la fase continua de las emulsiones. La incorporación de quitosano pero, en especial, el incremento de concentración de tensioactivo, del 2 al 9 % Pluronic® P123, produjo un importante aumento de la viscosidad de las emulsiones, que pudo detectarse visualmente. Este cambio estructural de las emulsiones se caracterizó mediante reología por dos motivos: para completar el estudio sobre la estabilidad de las emulsiones utilizadas para la preparación de las espumas de quitosano y para determinar la evolución de los parámetros reológicos, paso previo necesario para la caracterización del proceso de entrecruzamiento, el cual se presentará en apartados posteriores.

#### **4.4.1.3 Reología**

Como ya reflejaron los resultados de microscopía óptica (Figura 4.43, Figura 4.44 y Tabla 4.7), la presencia de cristal líquido (CL) en la fase continua de las emulsiones produjo una disminución importante del tamaño de gota que se atribuyó a un incremento de viscosidad ( $\eta$ ) de la fase continua de éstas. En este caso, la incorporación de quitosano (CHT) tuvo un menor efecto en la reducción del tamaño de gota debido a que la presencia de cristal líquido, *per se*, incrementaba de manera importante la viscosidad de la emulsión. Cuando la fase externa de la emulsión presentaba solución micelar, la incorporación de quitosano produjo una reducción de tamaño de gota de 3,1 a 1,7  $\mu\text{m}$ , correspondiente a la EAC4 y a la EAC5, respectivamente (Tabla 4.7). Sin embargo, en presencia de cristal líquido (CL) en la fase externa, la reducción de tamaño

de gota fue de 1,8 a 1,6  $\mu\text{m}$ , correspondiente a EAC7 y EAC8, respectivamente, produciéndose un menor efecto de la presencia de quitosano en el tamaño de gota.

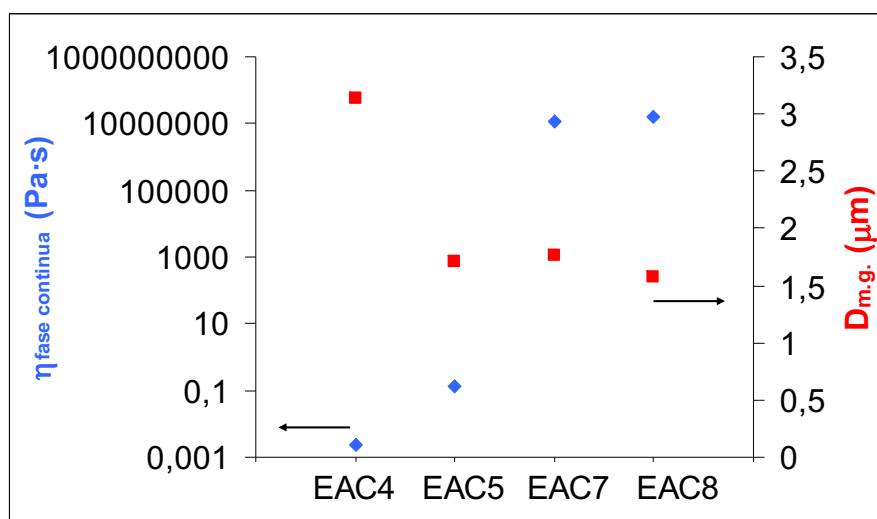
Para estudiar en mayor detalle la influencia de la viscosidad en el tamaño de gota de estas emulsiones, se determinó mediante ensayos de flujo la viscosidad de la fase continua de las emulsiones EAC4 (10 % Pluronic<sup>®</sup> P123 en solución acuosa), EAC5 (10 % Pluronic<sup>®</sup> P123, 45 % solución de quitosano 2 % (CHT) y 45 % solución reguladora de fosfatos), EAC7 (45 % Pluronic<sup>®</sup> P123, 27,5 % ácido acético 1 % y 27,5 % solución reguladora de fosfatos) y EAC8 (45 % Pluronic<sup>®</sup> P123, 27,5 % solución de quitosano 2 % (CHT) y 27,5 % solución reguladora de fosfatos), como se muestra en la Figura 4.56.



**Figura 4.56** Ensayos de flujo en estado estacionario de las fases continuas de las emulsiones EAC4, EAC5, EAC7 y EAC8.

Como se puede apreciar en la Figura 4.56, la fase continua de la EAC4 presenta un comportamiento newtoniano con valores constantes de viscosidad a cualquier esfuerzo de cizalla aplicado. La incorporación de quitosano en la fase continua (EAC5) produce un ligero incremento de la viscosidad, de  $2,24 \cdot 10^{-3}$  a  $0,13 \text{ Pa}\cdot\text{s}$  y un cambio en el comportamiento reológico de newtoniano a pseudoplástico con una disminución de viscosidad observada a esfuerzos de cizalla a partir de  $\sim 10 \text{ Pa}$ . Este comportamiento podría indicar algún tipo de interacción con el quitosano. La formación de una estructura de cristal líquido en la fase continua de las emulsiones EAC7 y EAC8 da lugar también un comportamiento pseudoplástico, con un incremento importante de

viscosidad, de ocho órdenes de magnitud. Ambas emulsiones, EAC7 y EAC8, muestran una disminución abrupta de la viscosidad a esfuerzos de cizalla superiores a 300 Pa, indicativo de la ruptura de la estructura del cristal líquido. Al comparar los valores de viscosidad de la fase continua de las emulsiones con los valores de diámetro medio de gota (Tabla 4.7) no se observó una clara tendencia entre el incremento de viscosidad y la reducción de tamaño de gota. Por ello, se representaron los valores de viscosidad de la fase continua en la zona lineal mostrados en la Figura 4.56 con los valores de diámetro de gota medio geométrico,  $D_{m.g.}$  a  $t = 0$  h (Tabla 4.7). De esta manera se identificó la influencia de la viscosidad debida a la adición de quitosano y/o la formación de estructuras de cristal líquido en el tamaño de gota de las emulsiones. Este estudio comparativo se muestra en la Figura 4.57.

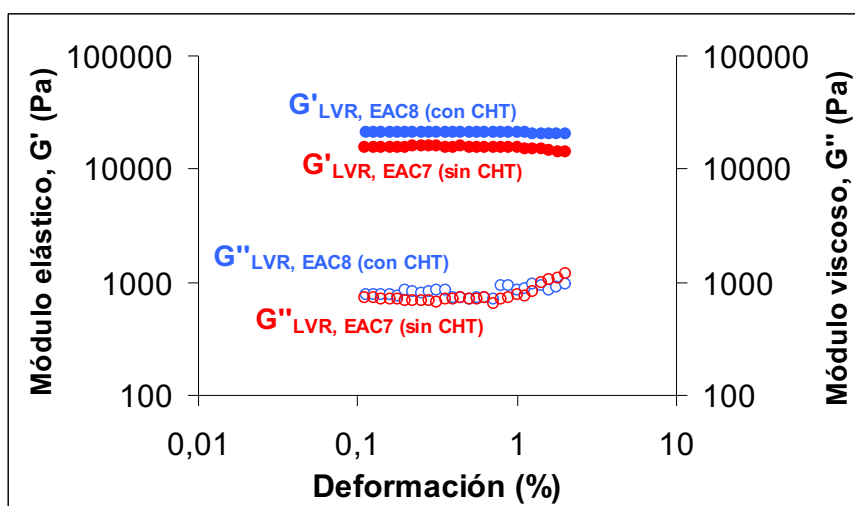


**Figura 4.57** Gráfico comparativo entre los valores de viscosidad de la fase continua ( $\eta_{fase\ continua}$ ) de las emulsiones EAC4, EAC5, EAC7 y EAC8 y los correspondientes valores de la media geométrica del diámetro de gota medio ( $D_{m.g.}$ ) obtenidos mediante microscopía óptica a  $t = 0$ h.

Los resultados obtenidos muestran la influencia de la incorporación de quitosano y de las estructuras de cristal líquido en el tamaño de gota de las emulsiones. En primer lugar, la incorporación de quitosano produce un ligero incremento de la viscosidad de la fase continua con el que se obtiene una importante disminución del diámetro de gota del 45 % en emulsiones con fase externa micelar (EAC4 y EAC5). No obstante, la incorporación de quitosano en emulsiones de fase externa de cristal líquido (EAC7 y EAC8) no produce un cambio importante de viscosidad y muestra una menor reducción del tamaño de gota, del 11 %. En segundo lugar, la presencia de una fase externa de

cristal líquido produce una reducción de tamaño del 44 %, prácticamente idéntica a la producida por la incorporación de quitosano en EAC5 al comparar los valores de diámetro de gota de EAC5 y EAC7. Sin embargo, el incremento de viscosidad de la fase continua debido a la presencia del cristal líquido es de ocho órdenes de magnitud y cabría esperar una reducción del tamaño de gota superior. Como se puede apreciar en la Figura 4.57, la viscosidad de la fase continua incrementa drásticamente de EAC5 a EAC7. No obstante, dicho incremento no produce una reducción importante del diámetro de gota medio,  $D_{m.g.}$ , que se mantiene aproximadamente constante. Aunque la fase continua de EAC7 y EAC8 presenta una viscosidad superior a la de EAC5, los valores de diámetro de gota obtenidos son similares. No obstante, la viscosidad de EAC5 se incrementa levemente por la adición de quitosano, en comparación con EAC4. Estos resultados podrían indicar la existencia de un valor mínimo del tamaño de gota al incrementar la viscosidad de la fase continua. Dicho efecto, también ha sido observado en otros sistemas al aumentar la concentración de polímero [Martínez-Rodríguez, 2014]. Un efecto parecido, estudiado ampliamente en bibliografía [Walstra, 1983; Tadros, 2009b], es el que se observa al incrementar la concentración de tensioactivo en un sistema, el cual también produce una disminución de tamaño de gota. A concentraciones bajas de tensioactivo, se produce una disminución importante del tamaño de gota hasta alcanzar un valor mínimo en el cual el tamaño de gota se mantiene prácticamente constante aunque se incremente la concentración de tensioactivo. Este comportamiento indicaría que la única manera de reducir el tamaño de gota sería mediante la aportación de mayor cizalla durante el proceso de emulsificación, como se observó con el tensioactivo Synperonic A7 en el que al incrementar la velocidad de agitación, para una misma concentración de tensioactivo, el tamaño de gota disminuía. En conclusión, para reducir aún más el tamaño, no es suficiente con aumentar la viscosidad de la fase externa, sino que se debería incrementar la cizalla aplicada durante la emulsificación.

Además de los ensayos de flujo para determinar la viscosidad de las fases continuas de las emulsiones EAC4, EAC5, EAC7 y EAC8, también se realizaron ensayos oscilatorios de deformación para caracterizar las fases externas de las emulsiones que presentaron estructuras de cristal líquido laminar (EAC7 y EAC8). Estos ensayos permitieron determinar los valores de módulo elástico en la zona de viscoelasticidad lineal ( $G'_{LVR}$ ) para las dos composiciones. Los resultados se muestran en la Figura 4.58.



**Figura 4.58** Ensayos oscilatorios de deformación en el que se indica el valor medio del módulo elástico y viscoso en la región de viscoelasticidad lineal ( $G'_{LVR}$  y  $G''_{LVR}$ , respectivamente) a  $t = 0$  h para las fases continuas correspondientes a las emulsiones EAC7 (sin quitosano) y EAC8 (con quitosano).

Los ensayos oscilatorios de deformación para las fases continuas de las emulsiones en presencia de fase de cristal líquido laminar muestran elevados valores del módulo elástico, 15650 Pa en ausencia de quitosano (EAC7) y 21220 Pa en presencia de quitosano (EAC8). Los valores de módulo elástico obtenidos para las dos composiciones en presencia de cristal líquido son del mismo orden de magnitud que los consultados en bibliografía para determinados sistemas binarios de cristal líquido laminar o sistemas ternarios con un bajo porcentaje de fase dispersa [Makai, 2003; Siddig, 2006; Savic, 2011]. Además, a partir de los módulos viscosos de ambas fases continuas ( $G''_{LVR, EAC7} = 700$  Pa y  $G''_{LVR, EAC8} = 775$  Pa), se puede obtener el valor de *tangente*  $\delta$ , como el cociente entre  $G''$  y  $G'$ . La disminución de dicho valor indica una mayor viscoelasticidad del sistema estudiado. En dicho sistema, se obtiene un valor de aproximadamente 0,04 para ambas fases continuas, que indica unas propiedades elásticas similares para ambas fases. Los resultados obtenidos mediante los ensayos oscilatorios muestran la misma tendencia que medidas realizadas mediante los ensayos de flujo (Figura 4.56). La incorporación de quitosano en presencia de estructuras de cristal líquido no produce cambios importantes en las propiedades viscoelásticas del sistema estudiado.

La incorporación de la fase dispersa o externa sobre la fase continua o interna realizada durante un proceso de emulsificación produce ciertos cambios en las propiedades

reológicas del sistema. Dichos cambios, entre otros parámetros, serán función del tipo de estructura tensioactiva presente en la fase continua. Como ya describió Princen y coautores [Princen, 1979, 1983, 1985, 1986], la incorporación de fase dispersa produce un incremento de las propiedades reológicas, que aumentan rápidamente para fracciones de volumen de fase dispersa ( $\phi$ ) superior a 0,74. No obstante, esta tendencia no se cumple en presencia de una fase de cristal líquido en la fase externa. Los resultados mostrados en la Figura 4.56 y Figura 4.58 presentan elevados valores de viscosidad y módulo elástico de la fase continua de las emulsiones debido a una estructura de cristal líquido. En el caso de emulsiones altamente concentradas,  $\phi = \phi_c > 0,74$ , en presencia de cristal líquido en la fase externa, la incorporación de fase dispersa muestra una reducción importante de las propiedades reológicas (viscosidad y módulo elástico) [Rodríguez-Abreu, 2004; Alam, 2009].

Por otra parte, la incorporación de fase dispersa sobre la fase continua puede producir un leve incremento de las propiedades viscoelásticas de la emulsión por un proceso de hinchamiento de las estructuras de cristal líquido [Rodríguez-Abreu, 2004] que puede modificar la estructura de cristal líquido, produciendo por ejemplo un cambio de curvatura [Kunieda, 1998]. Otro aspecto que influye en las propiedades reológicas es la longitud de cadena alquílica del aceite utilizado. Siddig et al. [Siddig, 2006] observaron como la incorporación de aceites de mayor cadena alquílica producían una mayor reducción de las propiedades reológicas de una emulsión, en comparación con las propiedades de la fase continua.

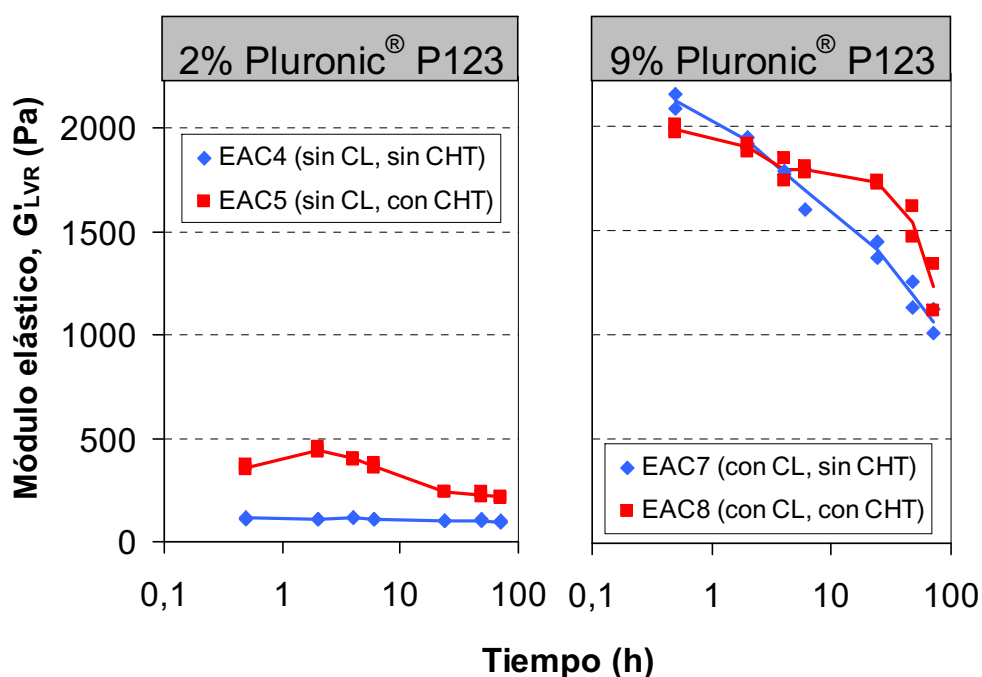
Tras el estudio de la influencia de la fase continua, a continuación, las emulsiones también se caracterizaron mediante ensayos reológicos, donde se tuvo en consideración el diferente comportamiento que podían mostrar las emulsiones con fase externa micelar o de cristal líquido. Para ello, se realizaron ensayos oscilatorios para las cuatro composiciones estudiadas: EAC4, EAC5, EAC7 y EAC8 (Experimental, apartado 3.3.3.1), determinando el módulo elástico en la zona de viscoelasticidad lineal ( $G'_{LVR}$ ) en función del tipo de estructura tensioactiva presente en la fase continua de las emulsiones, de la presencia de quitosano y del tiempo. Como el sistema anterior con el tensioactivo Synperonic A7, se realizó un análisis estadístico de dicha variable realizando el mismo procedimiento. Se evaluó si existían diferencias estadísticamente

significativas en el módulo elástico ( $G'_{LVR}$ ) para las diferentes categorías de los factores (presencia de quitosano, concentración de tensioactivo y tiempo). Para ello, se utilizaron las pruebas no paramétricas del test de la suma de rangos de Wilcoxon [Wilcoxon, 1945] y del test de Kruskal-Wallis [Kruskal, 1957]. Los resultados obtenidos, presentados gráficamente utilizando diagramas de caja o *box-plots* (Anexos, apartado 8.8) muestran que sólo existen diferencias estadísticamente significativas del  $G'_{LVR}$  con la concentración de tensioactivo, observándose un incremento muy importante del módulo elástico del 2 al 9 % de Pluronic® P123. La presencia de quitosano muestra un p-valor de 0,064 por lo tanto, no sería estadísticamente significativo, a pesar que este valor esté cercano al nivel de significación  $\alpha = 0,05$  indicando que existe una tendencia a que el módulo elástico sea mayor con la presencia de quitosano.

La variable  $G'_{LVR}$  no seguía una distribución Normal( $\mu, \sigma^2$ ) ni simétrica, ni siquiera transformándola. Por este motivo, no se pudo aplicar un modelo de regresión lineal. Se optó por realizar una regresión de cuantiles modelizando la mediana [Koenker, 2005], sin embargo, el número de datos experimentales no era suficiente para generar un modelo de regresión válido.

Debido al bajo número de valores experimentales para la obtención de un modelo predictivo de los valores de  $G'_{LVR}$ , este análisis no se pudo aplicar. Por ello, se describen y discuten a continuación las tendencias observadas en los valores experimentales de  $G'_{LVR}$  en función de la presencia de quitosano, de las estructuras tensioactivas presentes en la fase continua de las emulsiones (concentración de tensioactivo) y del tiempo. La Figura 4.59 muestra los valores del módulo elástico en la zona de viscoelasticidad lineal ( $G'_{LVR}$ ) a los tiempos 0,5, 2, 4, 6, 24, 48 y 72 h, realizando dos medidas por cada tiempo y trazando una línea que pasa por la media de estas dos medidas.





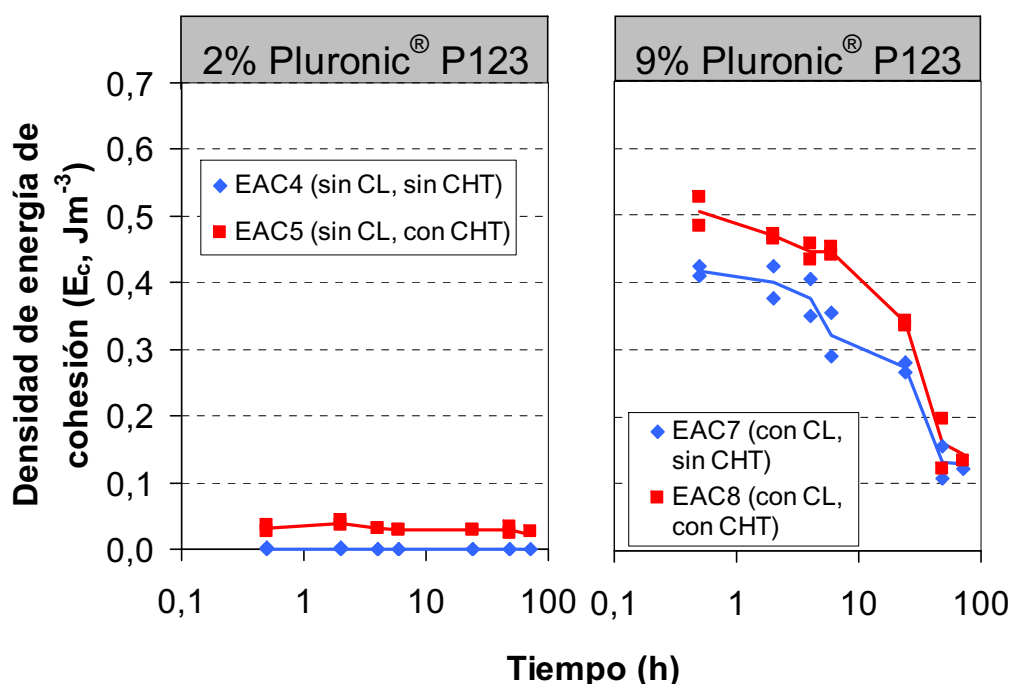
**Figura 4.59** Valores del módulo elástico en la región de viscoelasticidad lineal ( $G'_{LVR}$ ) en función del tiempo al 2 % Pluronic® P123 (EAC4 y EAC5) y 9 % Pluronic® P123 (EAC7 y EA8).

El módulo elástico ( $G'_{LVR}$ ) de las emulsiones en ausencia o presencia de quitosano se comparó en función del tipo de fase externa presente: estructura micelar (2 % Pluronic® P123) y cristal líquido (9 % Pluronic® P123). Dicha comparativa se muestra en la Figura 4.59. Como se comentó anteriormente, el tipo de agregado tensioactivo en la fase externa de las emulsiones influye considerablemente en las propiedades viscoelásticas y en la estabilidad de las emulsiones. El cambio de fase externa micelar (2 % Pluronic® P123) a fase de cristal líquido laminar (9 % Pluronic® P123) produce un incremento de  $G'_{LVR}$  de un orden de magnitud, confirmando la importante influencia del tipo de autoagregados tensioactivos presentes. Cabe remarcar que dicho incremento es principalmente debido a la presencia de cristal líquido, ya que el tamaño de gota de las emulsiones con fase externa micelar, EAC5 (1,7  $\mu\text{m}$ ), y de las emulsiones con fase externa de cristal líquido, EAC7 y EAC8 (1,8 y 1,6  $\mu\text{m}$ , respectivamente), era muy similar.

Se puede apreciar una reducción importante del módulo elástico de 15000-20000 Pa (Figura 4.58), correspondiente al sistema binario con fase de cristal líquido, a valores de aproximadamente 2000 Pa, que corresponden a las emulsiones EAC7 y EAC8 a  $t = 0\text{h}$

(Figura 4.59). Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores [Rodríguez-Abreu, 2004; Alam, 2009], que demuestran que la incorporación de fase dispersa en un sistema binario formado por una estructura de cristal líquido produce una reducción de las propiedades viscoelásticas de la emulsión formada.

Como se demostró con las emulsiones preparadas con Synperonic A7, la reología es una técnica útil y sensible para el estudio de la estabilidad cinética de emulsiones. El análisis de los resultados obtenidos de diámetro de gota medio (Tabla 4.7 y Figura 4.51 - Figura 4.53) mostró que las emulsiones se podían considerar estables. Sin embargo, los resultados obtenidos mediante reología (Figura 4.59) indican que esta técnica presenta una mayor sensibilidad a cambios estructurales de las emulsiones producidos por la presencia de fuerzas de interacción y/o variaciones de diámetro de gota. Los resultados obtenidos muestran que la incorporación del quitosano afecta de diferente forma a las emulsiones en función de la estructura tensioactiva presente en la fase continua. Cuando la fase externa es micelar (Figura 4.59), EAC4 se podría considerar estable cinéticamente. La incorporación de quitosano (EAC5) produce un incremento de los valores de  $G'_{LVR}$  de las emulsiones debido a la reducción de tamaño de gota (3,1 a 1,7  $\mu\text{m}$  a  $t = 0$  h). No obstante, las emulsiones con quitosano presentan una mayor inestabilidad al aplicar cizalla, debido a que se observa una mayor variación de los valores de  $G'_{LVR}$ , hecho que se puede atribuir a un posible incremento de la tensión interfacial. La variación de  $G'_{LVR}$  de la emulsión con fase externa micelar EAC5 (Figura 4.59) muestra un incremento del módulo elástico a  $t = 2$  h, que podría implicar un ligero proceso de floculación de las gotas de la emulsión, y una disminución gradual de dichos valores a  $t > 2$  h, que indicaría algún proceso de coalescencia [Pal, 1996; Langenfeld, 1999; Tadros, 2004a; Masalova, 2011]. Al comparar los valores de  $G'_{LVR}$  al 9 % Pluronic<sup>®</sup> P123, se puede apreciar que, inicialmente, EAC7 y EAC8 muestran valores similares. No obstante, se pudo observar una mayor variación del módulo elástico con el tiempo en EAC7, siendo éste inferior al de EAC8 a partir de 6 h. Estos resultados podrían indicar una mayor estabilidad de las emulsiones con fase externa de cristal líquido en presencia de quitosano (EAC8).



**Figura 4.60** Valores de densidad de energía de cohesión ( $E_c$ ) en función del tiempo al 2 % Pluronic<sup>®</sup> P123 (EAC4 y EAC5) y al 9 % Pluronic<sup>®</sup> P123 (EAC7 y EAC8). Las líneas indican los valores medios de  $E_c$ .

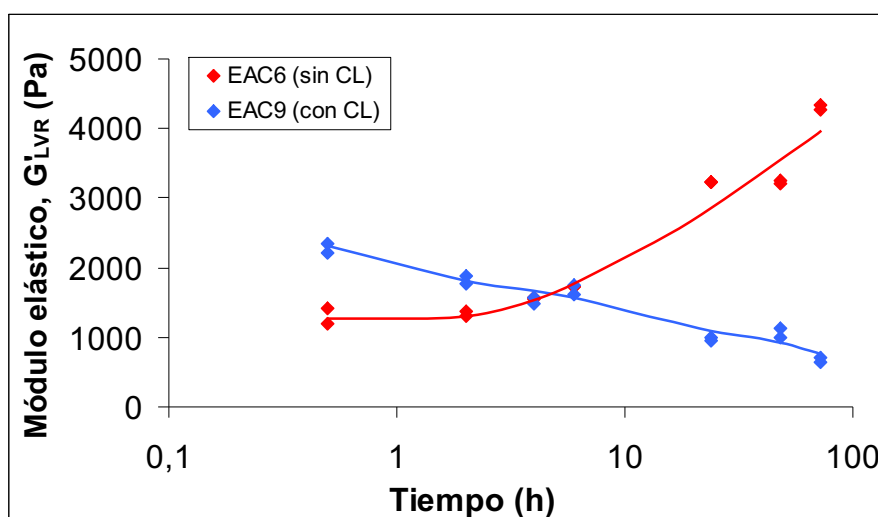
También se determinó la variación de la densidad de energía de cohesión ( $E_c$ ) con el tiempo (Figura 4.60). La  $E_c$  proporciona información sobre las interacciones entre las gotas de las emulsiones y/o el número de contactos entre gotas. Se puede observar claramente un incremento de un orden de magnitud de la  $E_c$  debido a la presencia de cristal líquido en la fase externa de las emulsiones. Dicha comparativa también muestra claramente la influencia de la incorporación del quitosano en la fase continua de las emulsiones, tanto en presencia de fase micelar (EAC4 y EAC5), como en presencia de fase de cristal líquido (EAC7 y EAC8), produciendo un incremento de  $E_c$ . En fase micelar, muestra un comportamiento similar a  $G'_{LVR}$ . Los valores de  $E_c$  para las emulsiones en presencia de cristal líquido (EAC7 y EAC8) muestran una diferencia de  $E_c \approx 0,1 \text{ Jm}^{-3}$  hasta 24 h. Estos resultados podrían indicar de forma más clara la influencia del tamaño de gota entre EAC7 y EAC8 (1,8 y 1,6  $\mu\text{m}$ , respectivamente). A partir de 24 h, la mayor variación de  $E_c$  observada da lugar a valores muy similares entre EAC7 y EAC8.

En resumen, los resultados obtenidos mediante microscopía óptica indicaron que las emulsiones EAC5 y EAC8 podrían considerarse estables para ser utilizadas como medios de reacción debido a la reducida variación del diámetro de gota con el tiempo a 40 °C. Sin embargo, la mayor sensibilidad a variaciones de diámetro de gota y/o presencia de fuerzas de interacción mostrada por la técnica de reología indicó la existencia de un leve proceso de coalescencia, bastante reducido, como muestran los valores del diámetro de gota que se podrían considerar constantes durante 72 h. La caracterización mediante ensayos reológicos también es un paso previo para el estudio del proceso de entrecruzamiento del quitosano, ya que permite conocer las propiedades reológicas de las emulsiones utilizadas como medios de reacción.

A continuación, las emulsiones preparadas al 2 y 9 % de concentración de Pluronic® P123 se utilizaron para la preparación de espumas de quitosano. Para dicho propósito, inicialmente, se estudió mediante reología la cinética de entrecruzamiento del quitosano ya que, como mostraron los resultados de reología de las emulsiones, el cambio de tensioactivo producía cambios importantes en las propiedades reológicas de las emulsiones.

#### 4.4.2 Estabilidad y cinética del proceso de entrecruzamiento del quitosano

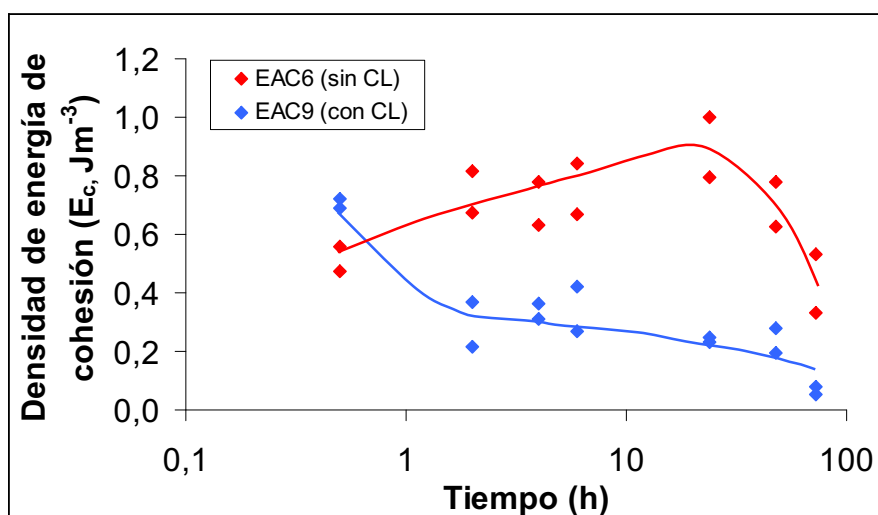
Se estudió el proceso de entrecruzamiento del quitosano con genipina en la emulsión constituida por Solución de quitosano / Solución de genipina / Pluronic® P123 / Decano mediante ensayos reológicos realizados a 40 °C durante 72 h. El estudio se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento que con el tensioactivo Synperonic A7 (Apartado 3.3.3.2). Se determinó mediante ensayos oscilatorios de deformación la variación de  $G'_{LVR}$  (en la zona de viscoelasticidad lineal a una frecuencia de 2 Hz) en función del tiempo para las emulsiones EAC6 (2 % P123, fase externa micelar) y EAC9 (9 % P123, fase externa de cristal líquido). Estos resultados se muestran en la Figura 4.61 para las dos concentraciones de tensioactivo estudiadas, mostrando las dos medidas realizadas para cada tiempo.



**Figura 4.61** Valores del módulo elástico en la zona de viscoelasticidad lineal ( $G'_{LVR}$ ) en función del tiempo para las emulsiones EAC6 (2 % P123) y EAC9 (9 % P123), con genipina, obtenidos mediante ensayos oscilatorios de deformación. Todas las medidas se realizaron a una frecuencia constante de 2 Hz. Las líneas indican las curvas de tendencia.

Los resultados indican dos comportamientos opuestos en la evolución de  $G'_{LVR}$  con el tiempo en función de la concentración de tensioactivo. El proceso de entrecruzamiento del quitosano llevado a cabo en las emulsiones al 2 % P123 (EAC6) muestra un incremento de los valores del módulo elástico hasta las 72 h, evolución característica del proceso de entrecruzamiento. Al incrementar la concentración de tensioactivo al 9 % P123 (EAC9) y obtener una estructura de cristal líquido en la fase continua de las emulsiones, se observa en este caso una disminución de los valores de  $G'_{LVR}$  con el tiempo. Estos resultados indicarían algún proceso de desestabilización del gel formado por el entrecruzamiento del quitosano o de la propia estructura de cristal líquido. Otra posible explicación sería la presencia de algún tipo de interacción entre el quitosano y el tensioactivo que produjera la desestabilización de la estructura de cristal líquido. Esta interacción podría impedir un mayor entrecruzamiento del quitosano con la genipina. Dicho proceso se estudiará en mayor detalle en los siguientes apartados.

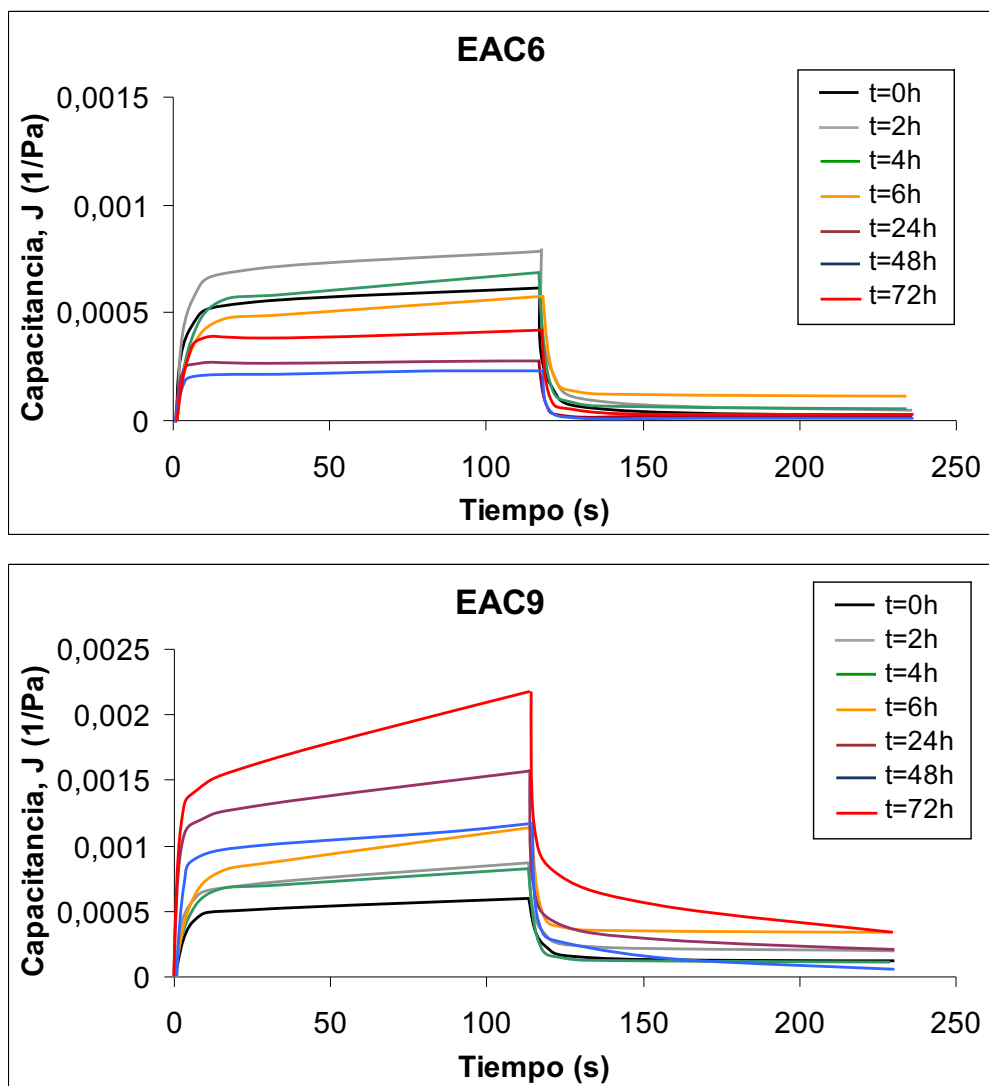
También se compararon los valores de la densidad de energía de cohesión ( $E_c$ ) en las emulsiones EAC6 y EAC9 para obtener información adicional y comprobar si mostraban la misma tendencia que se observó en la variación del módulo elástico (Figura 4.61). Estos resultados se muestran en la Figura 4.62.



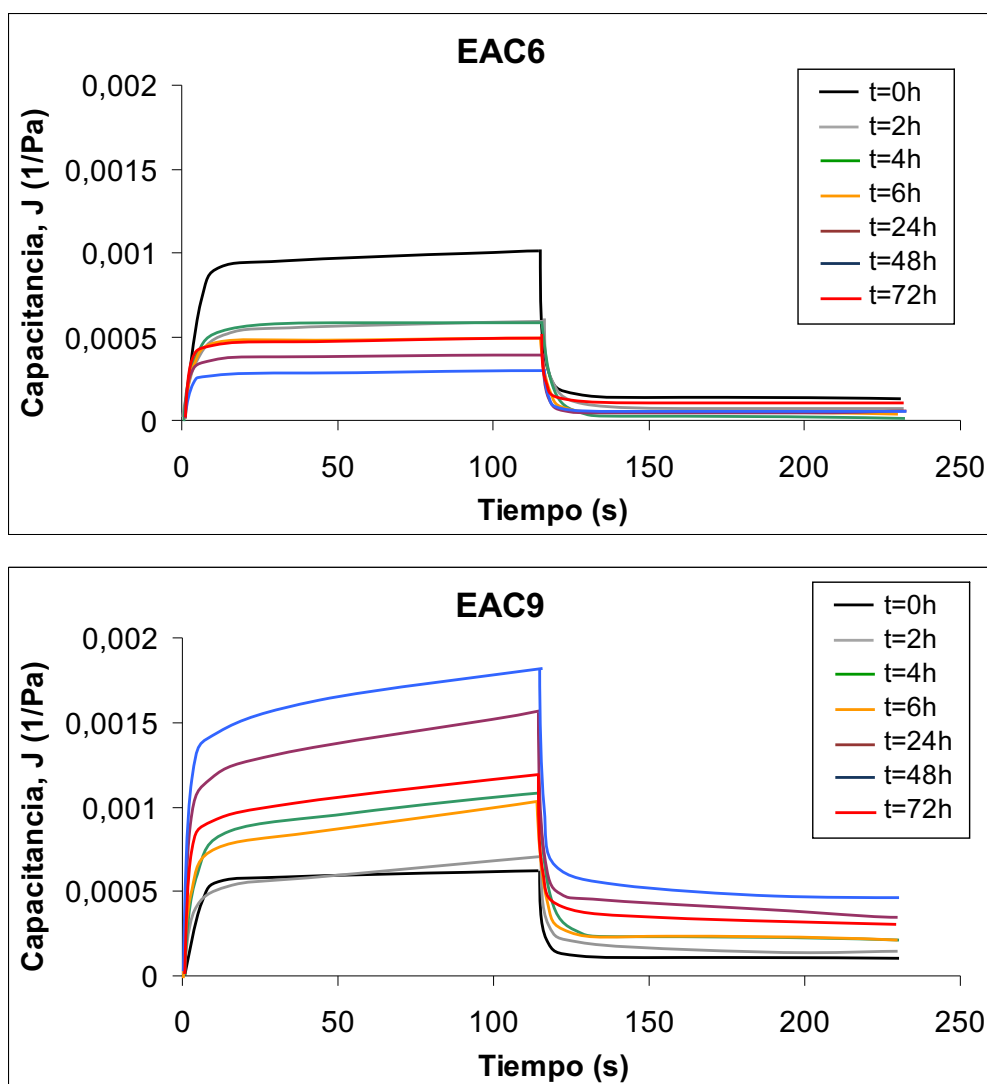
**Figura 4.62** Valores de la densidad de energía de cohesión ( $E_c$ ) en función del tiempo para las emulsiones EAC6 (2 % P123) y EAC9 (9 % P123), con genipina, obtenidos mediante ensayos oscilatorios de deformación. Todas las medidas se realizaron a una frecuencia constante de 2 Hz.

La evolución de  $E_c$  con el tiempo para EAC6 muestra ciertas diferencias con los resultados obtenidos para  $G'_{LVR}$  (Figura 4.61). Se observa el mismo tipo de incremento de  $E_c$  con el tiempo hasta las 24 h. A tiempos superiores, los resultados muestran una progresiva disminución de la  $E_c$  que podría indicar una posible desestabilización de la emulsión a  $t \geq 24$  h. En el caso de las emulsiones EAC9, no obstante, éstas mostraron un comportamiento de  $E_c$  muy similar al obtenido con  $G'_{LVR}$  (Figura 4.61), al observar una disminución constante de  $E_c$  en función del tiempo, probablemente producida en este caso por algún proceso de interacción entre los distintos componentes que reduciría la cinética de reacción de entrecruzamiento.

De forma complementaria a los ensayos oscilatorios, el proceso de entrecruzamiento de las emulsiones EAC6 y EAC9 se caracterizó mediante ensayos de fluencia, a partir de la evolución del comportamiento reológico de las emulsiones: viscoso, viscoelástico o elástico (mostrado en Introducción, apartados 1.3.2.2 y 1.5.3.1). Siguiendo el procedimiento utilizado en el sistema con el tensioactivo Synperonic A7, se realizaron ensayos de fluencia a 10 Pa (Figura 4.63) y a 40 Pa (Figura 4.64) en función del tiempo de entrecruzamiento (0, 2, 4, 6, 24, 48 y 72 h) para las emulsiones EAC6 (sin CL) y EAC9 (con CL) con un 2 y 9 % de P123, respectivamente.



**Figura 4.63** Medidas de fluencia para un esfuerzo de cizalla aplicado de 10 Pa y posterior recuperación para las emulsiones EAC6 (2 % P123) y EAC9 (9 % P123).



**Figura 4.64** Medidas de fluencia para un esfuerzo de cizalla aplicado de 40 Pa y posterior recuperación para las emulsiones EAC6 (2 % P123) y EAC9 (9 % P123).

Los resultados obtenidos mediante ensayos de fluencia a 10 y 40 Pa muestran claramente la evolución del proceso de entrecruzamiento del quitosano en EAC6 (Figura 4.63 y Figura 4.64). Las emulsiones EAC6 muestran una disminución de la capacitancia ( $J$ ) con el tiempo hasta  $t = 48$  h, tanto a 10 como a 40 Pa. Dicho comportamiento indica una variación de viscoelástico a elástico, debido al proceso de entrecruzamiento, al obtenerse valores de capacitancia durante la etapa de recuperación ( $t = 240$  s) próximos a cero. A  $t = 72$  h, se observa un incremento de la capacitancia debido probablemente a un proceso de desestabilización del sistema, como también se identificó en los resultados de densidad de energía de cohesión (Figura 4.62). En el sistema EAC9, como en los ensayos oscilatorios, se obtienen unos resultados opuestos a



EAC6. En las emulsiones con fase externa de cristal líquido, la capacitancia aumenta con el tiempo hasta 72 h que implica una desestabilización del sistema.

Al representar el logaritmo de la capacitancia ( $J$ ) al principio de la curva de recuperación ( $t = 120$  s) en función del tiempo, se puede apreciar de forma más clara la evolución de este parámetro para las dos concentraciones de tensioactivo utilizadas en los dos esfuerzos de cizalla aplicados, 10 y 40 Pa (Figura 4.65). En el caso de EAC6, se observa una ligera disminución de  $\log J$  hasta las 48 h debido al proceso de entrecruzamiento. A las 72 h, tiene lugar un leve aumento de  $\log J$ , relacionado con una posible desestabilización del sistema. Sin embargo, las emulsiones EAC9 muestran un incremento progresivo de  $\log J$  producido por la desestabilización del sistema o algún otro tipo de proceso que impide un mayor entrecruzamiento del quitosano. En ambas composiciones estudiadas, la variación de la capacitancia ( $J$ ) en función del tiempo es muy similar para los dos esfuerzos de cizalla utilizados (10 y 40 Pa). Este comportamiento es debido a los bajos valores de cizalla aplicados con el fin de evitar la ruptura de la estructura durante los ensayos en el estudio del proceso de entrecruzamiento.

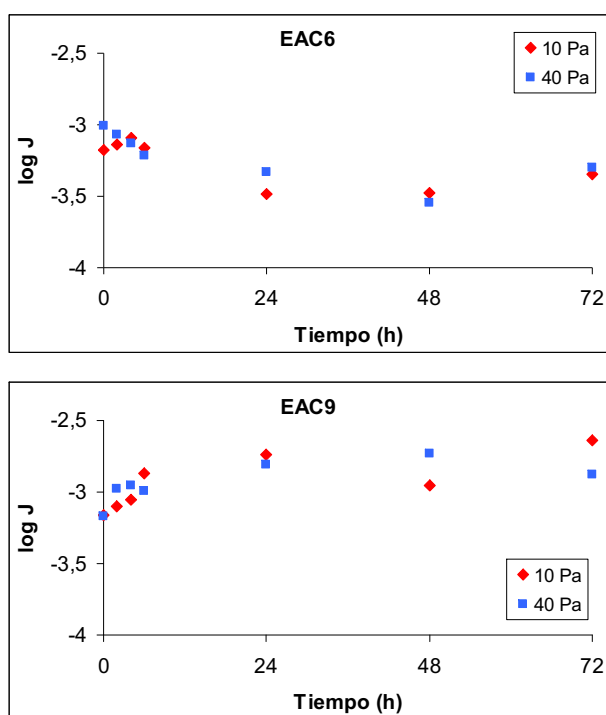


Figura 4.65 Variación de  $\log J$  en función del tiempo a esfuerzo de cizalla de 10 y 40 Pa para las emulsiones EAC6 (2 % P123) y EAC9 (9 % P123).

En resumen, los resultados obtenidos mediante microscopía óptica indican que las emulsiones mostraron una estabilidad adecuada para su utilización como medios de reacción a 40 °C durante 72 h, condiciones utilizadas para el proceso de entrecruzamiento del quitosano, tanto con fase externa micelar (EAC5), como con fase externa de cristal líquido (EAC8). La caracterización del proceso de entrecruzamiento por reología para EAC6 y EAC9 (con genipina) muestra una fuerte influencia de la naturaleza de los agregados tensioactivos presentes en la fase continua de las emulsiones, y que dichos agregados modifican enormemente la cinética del proceso de entrecruzamiento. A continuación, se estudió cómo esta variación en la cinética de entrecruzamiento, detectada mediante reología, afectaba a la estructura de los materiales de quitosano obtenidos a partir de las emulsiones altamente concentradas. Con dicho objetivo, se obtuvieron las espumas de quitosano y se determinó mediante diferentes técnicas la influencia de los autoagregados tensioactivos en las propiedades de las espumas de quitosano, obtenidas con el tensioactivo Pluronic® P123.

#### **4.5 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ESPUMAS DE QUITOSANO A PARTIR DE EMULSIONES ALTAMENTE CONCENTRADAS CON EL SISTEMA QUITOSANO / GENIPINA / PLURONIC® P123 / DECANO**

Como en el sistema con el tensioactivo Synperonic A7, las muestras de quitosano entrecruzado con genipina con composición EAC6 (2 % Pluronic® P123 / 9 % Solución de quitosano / 9 % Solución de genipina / 80 % Decano) y EAC9 (9 % Pluronic® P123 / 5,5 % Solución de quitosano / 5,5 % Solución de genipina / 80 % Decano) se purificaron mediante extracción Soxhlet, para eliminar el decano y el tensioactivo. Finalmente, se liofilizaron para obtener las correspondientes espumas de quitosano. Tras los procesos de lavado y liofilización, se observaron diversos efectos sobre los materiales obtenidos. En esta ocasión también se detectó un encogimiento de los materiales durante los procesos de lavado y liofilización, tal y como ocurrió al utilizar el tensioactivo Synperonic A7 (Apartado 4.3.1).

Con el fin de evitar el encogimiento de los materiales, se realizó un estudio preliminar de extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico (scCO<sub>2</sub>) de la emulsión EAC6 para eliminar el

decano (fase dispersa), el tensioactivo y el agua. Dicho experimento se realizó en colaboración con Raul Solanas, de MATGAS (apartado Experimental 3.3.4.1). La técnica de scCO<sub>2</sub> permite realizar el proceso de lavado y secado del material de forma continua [Cooper, 2000; Marcus, 2005; Quignard, 2008; Mehling, 2009; Machado, 2013]. No obstante, las condiciones utilizadas (apartado Experimental 3.3.4.1) para realizar dicho proceso no permitieron solubilizar el decano, el tensioactivo y el agua. Tras el estudio preliminar realizado se observó un encogimiento parcial de la muestra, presencia de decano no eliminado y probablemente, agua y tensioactivo. En condiciones supercríticas, los hidrocarburos, compuestos no polares como el decano, son solubles en CO<sub>2</sub> [Marcus, 2005]. Probablemente, el porcentaje de decano presente (80 %) podría requerir un tiempo de extracción superior al empleado (1 h). En lo referente al tensioactivo, diversos autores han demostrado la posibilidad de eliminar tensioactivos de tipo copolímero de bloque, como el utilizado en el presente trabajo (Pluronic<sup>®</sup> P123) mediante scCO<sub>2</sub> [Kawi, 1998, 2002; Van Grieken, 2003]. Sin embargo, al ser polímeros de cadena larga y un peso molecular considerable ( $M_w = 5750$  g/mol), en comparación con el CO<sub>2</sub>, dicha solubilización requiere condiciones elevadas de presión, temperatura y/o tiempos de ensayo. Van Grieken [Van Grieken, 2003] muestra que a 120 bar y 60 °C es posible alcanzar una eliminación del tensioactivo del 74 %, con periodos de extracción de 24 h, superiores a los utilizados. No obstante, tiempos de ensayo de aproximadamente 3 h [Kawi, 1998, 2002] implican un necesario incremento de la temperatura y presión (80-90 °C, 350 bar) y la utilización de cosolventes como el etanol para alcanzar valores de eliminación de tensioactivo del 85 %. Finalmente, respecto a la fase acuosa no eliminada, el scCO<sub>2</sub> no es capaz de solubilizar fases acuosas [Marcus, 2005]. Sin embargo, la corriente de CO<sub>2</sub> inyectada en el reactor desplazó y eliminó una fracción de la fase acuosa. El total desplazamiento de la fase acuosa por la corriente de CO<sub>2</sub> podría requerir un periodo de tiempo elevado y, por lo tanto, sería necesaria la incorporación de un cosolvente, como el etanol, para incrementar la solubilidad de solventes polares como el agua en scCO<sub>2</sub> [Marcus, 2005] o la sustitución de las diversas fases presentes por una fase alcohólica, de mayor solubilidad en scCO<sub>2</sub> [Quignard, 2008; Mehling, 2009]. Como se ha comentado al inicio del apartado, los procesos de lavado en Soxhlet con etanol y agua de los materiales producían el encogimiento de éstos. En materiales biopoliméricos, como quitosano o alginato, dicho encogimiento se atribuye a las bajas propiedades mecánicas de este tipo de materiales [Quignard, 2008;

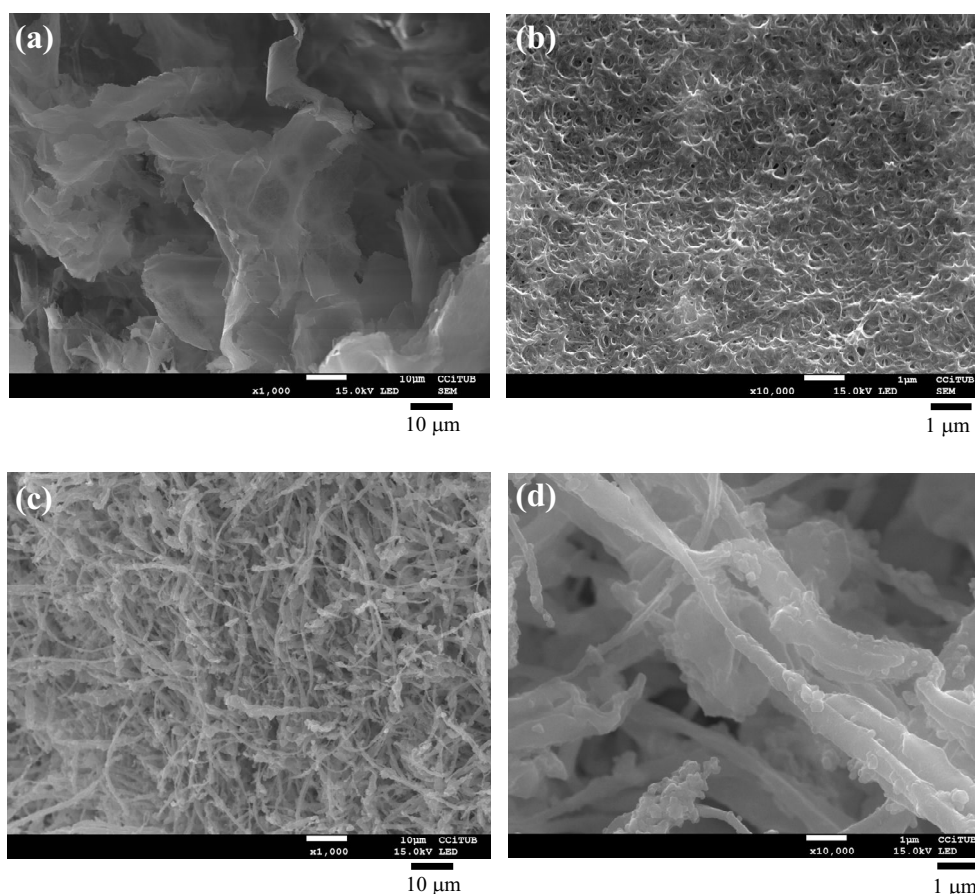
Mehling, 2009]. Estos últimos autores propusieron la sustitución paulatina de solvente para así reducir encogimientos importantes de los materiales. No obstante, no es posible evitar encogimientos de aproximadamente el 60 % en aerogeles de quitosano [Quignard, 2008]. Igualmente, en este caso, se intentó reemplazar el agua por etanol mediante cambios progresivos con soluciones hidroalcohólicas hasta alcanzar el 100 %, pero el encogimiento observado continuaba siendo importante y superior al 60 %. Estos resultados podrían indicar que las condiciones experimentales escogidas para realizar la extracción por CO<sub>2</sub> supercrítico no eran las adecuadas. No obstante, probablemente no pueda evitarse un encogimiento parcial debido a las propiedades mecánicas de los materiales quitosano. A partir de los resultados obtenidos, y debido a que el encogimiento observado era similar al obtenido mediante los procesos de lavado por extracción Soxhlet y liofilización, se decidió continuar con estos dos últimos procedimientos en la obtención de espumas de quitosano.

Tras los procesos de lavado en Soxhlet y liofilización, también se observó como las dos composiciones estudiadas, EAC6 (2 % Pluronic<sup>®</sup> P123) y EAC9 (9 % Pluronic<sup>®</sup> P123), mostraron un comportamiento diferente. Durante el proceso de entrecruzamiento, ambas composiciones presentaron el típico aspecto azul oscuro, debido a la reacción de la genipina con los grupos amino del quitosano en presencia de oxígeno [Mi, 2000]. Sin embargo, EAC9 mostró una estructura menos consistente y elástica tras 72 h y 40 °C, debido al menor entrecruzamiento detectado por reología, al comparar con EAC6. A partir de estas observaciones y los resultados de reología presentados anteriormente para EAC6 y EAC9, probablemente existía una disminución de la eficacia del proceso de entrecruzamiento de EA9, tras los procesos de lavado y secado. Considerando la eficacia como la relación entre el peso teórico del material y el experimental, se obtuvo una eficacia del 60 % en las emulsiones EAC6, similar a la obtenida con el sistema utilizando el tensioactivo Synperonic A7 (57 %), mientras que las emulsiones EAC9 mostraron una eficacia del 35 %. Para estudiar este fenómeno, se caracterizaron ambas composiciones mediante SEM y adsorción/desorción de nitrógeno.

#### 4.5.1 Topografía de las espumas

Las espumas obtenidas a las concentraciones de tensioactivo de 2 y 9 %, emulsiones EAC6 y EAC9, respectivamente, fueron caracterizadas mediante SEM. En principio,

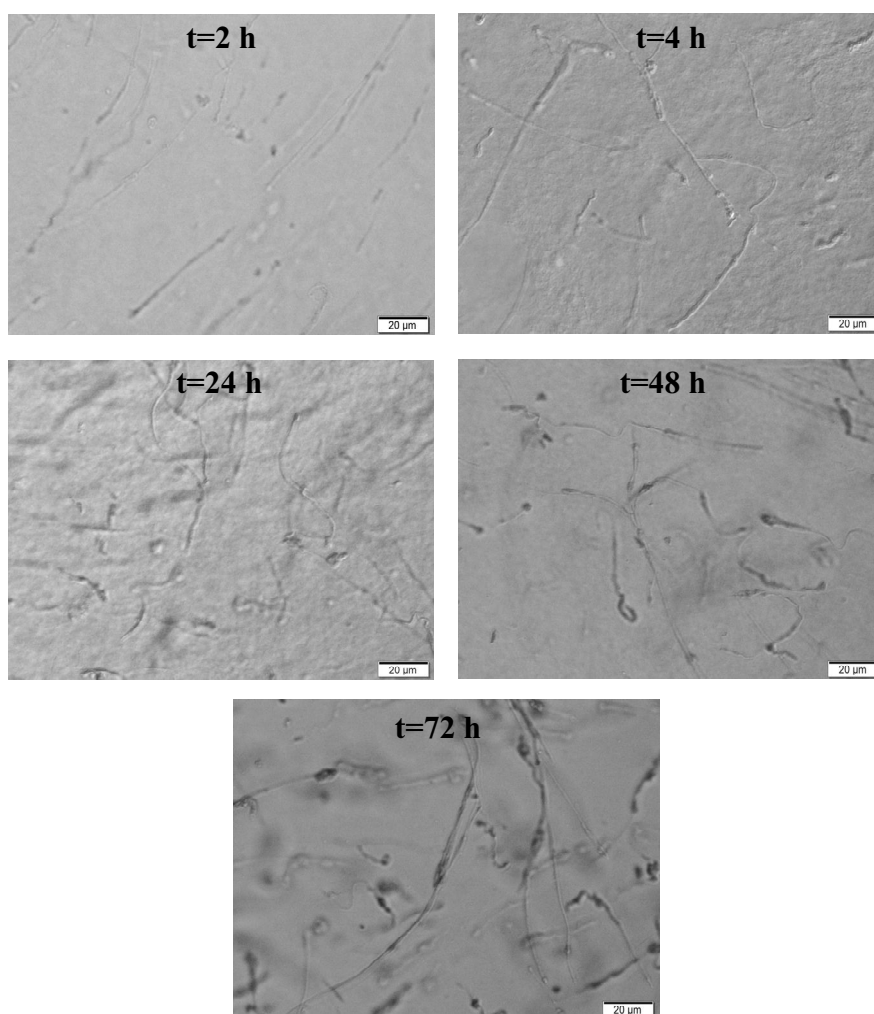
cabría esperar que ambas mostrasen una estructura macroporosa y que además, EAC9 mostrase una meso/macroporosidad dual debido a la formación de mesoporos, gracias al cristal líquido de la fase continua de las emulsiones, y la de macroporos, producida por la presencia de las gotas de la emulsión. La topografía de estas dos composiciones se muestra en la Figura 4.66. Para EAC6 (Figura 4.66, a y b), se observa una estructura de poros regulares, con un diámetro aproximado entre 200 y 500 nm, que indica la naturaleza macroporosa de estas muestras, como cabría esperar, ya que se utilizaron emulsiones altamente concentradas con fase externa micelar. Se observó que el diámetro de poro de las espumas obtenidas, entre 200 y 500 nm, aproximadamente, no coincidía con el tamaño de gota de las emulsiones (EAC5), que presentaban un tamaño medio de 1,5-1,7  $\mu\text{m}$  (Tabla 4.7). Esta diferencia se atribuyó al encogimiento de los materiales durante los procesos de lavado y secado. La composición EAC9 también se caracterizó mediante SEM (Figura 4.66, c y d). En este caso, EAC9 presenta una topografía completamente distinta a EAC6. Se observa una estructura claramente fibrosa que, a mayores aumentos (Figura 4.66 d), posee menor macroporosidad. La aparición de estas estructuras fibrosas podría ser debida a la solubilización parcial de la genipina en los agregados tensioactivos debido a la naturaleza anfifílica de la genipina, modificando la reacción de la genipina con el quitosano. Además, al producirse dicho proceso en presencia de estructuras de cristal líquido, indicaría que la presencia de agregados tensioactivos podría facilitar la nucleación en la formación de fibras.



**Figura 4.66** Imágenes de SEM de las espumas de quitosano obtenidas a partir de las composiciones: EAC6, 2 % P123 (a y b) y EAC9, 9 % P123 (c y d).

Como se ha descrito en bibliografía con anterioridad [Butler, 2003b; Moura, 2007; Matricardi, 2008; Ma, 2010; Testouri, 2010; Bonino, 2011; Miras, 2013b], los procesos de entrecruzamiento caracterizados mediante reología muestran un incremento de diversos parámetros característicos como el módulo elástico ( $G'$ ). Esta tendencia se ha observado en el sistema con el tensioactivo Synperonic A7 (EAC3) y con el tensioactivo Pluronic<sup>®</sup> P123 al 2 % de concentración (EAC6). Sin embargo, los resultados obtenidos mediante reología con el 9 % Pluronic<sup>®</sup> P123 (EAC9) mostraron una reducción progresiva del módulo elástico ( $G'_{LVR}$ ), de la densidad de energía de cohesión ( $E_c$ ) y de la capacitancia ( $J$ ). Dichos resultados podrían indicar que la estructura fibrosa observada en EAC9 se habría formado durante el proceso de entrecruzamiento. Para demostrar esta posible hipótesis, se realizó un seguimiento de la EAC9 durante 72 h a 40 °C mediante microscopía óptica. Las imágenes de microscopía óptica muestran la aparición de estructuras fibrosas desde el inicio del proceso de entrecruzamiento y cómo dichas fibras aumentan en número, aunque especialmente en

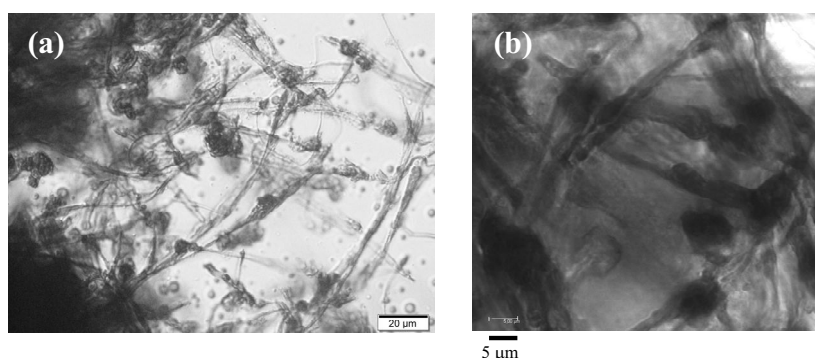
grosor, con el tiempo (Figura 4.67). En dichas imágenes, cabría esperar la observación de las gotas de la emulsión. No obstante, como se comentó previamente en la caracterización de las emulsiones mediante microscopía óptica, la muestra EAC9 presentaba un aspecto translúcido a  $t = 0$  h que indicaba que el índice de refracción de la fase continua de cristal líquido era similar al de la fase oleosa, lo cual dificultaba la observación de la interfase de las gotas. Además, la elevada elasticidad de este sistema dificultaba la obtención de capas finas para poder detectar las gotas de la emulsión.



**Figura 4.67** Imágenes de microscopía óptica de la emulsión EAC9 durante el proceso de entrecruzamiento a 40 °C durante 72 h.

Estos resultados demuestran que las estructuras fibrosas, observadas mediante SEM, se forman durante el proceso de entrecruzamiento del quitosano. Dichas fibras se formarían en la fase continua de las emulsiones. Estos materiales se lavaron mediante

Soxhlet, antes de liofilizar, y se volvieron a observar mediante microscopía óptica y microscopía confocal, para obtener imágenes de mayor resolución (Figura 4.68).



**Figura 4.68** Imágenes de microscopía óptica de la emulsión EAC9 tras los procesos de lavado, antes del proceso de liofilización, mediante microscopía óptica (a) y microscopía confocal (b).

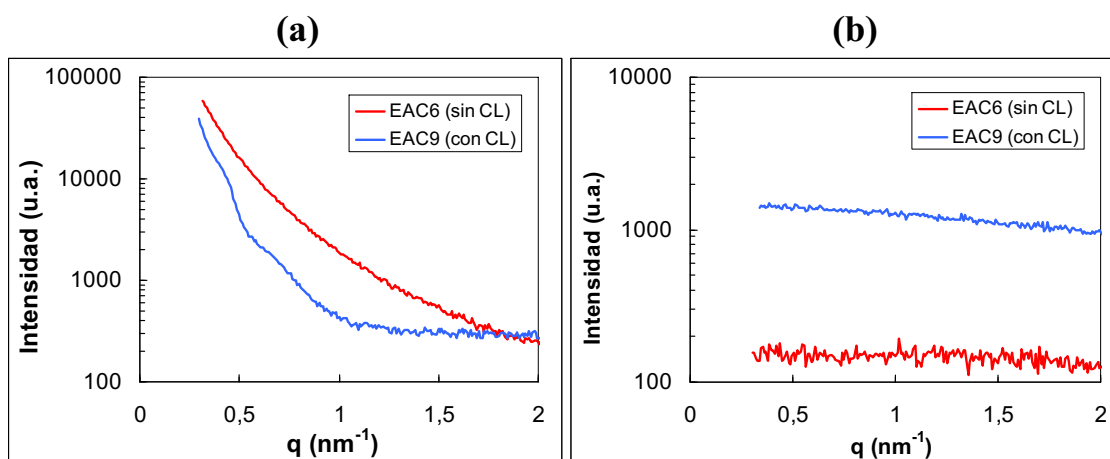
Las imágenes mostraron un proceso de concentración de las fibras debido a los procesos de lavado, al eliminar la fase dispersa de las emulsiones EAC9. Morfológicamente, estas fibras se asemejan a las observadas mediante SEM, tras el proceso de liofilización. De esta manera, se pudo confirmar que las estructuras fibrosas observadas inicialmente mediante SEM se habían formado durante el entrecruzamiento del quitosano. Estos resultados, junto con los obtenidos por reología, ponen de manifiesto que el tamaño de poro del material obtenido (EAC9) no está determinado por el tamaño de gota de la emulsión.

Como se ha podido observar en los resultados anteriores, el incremento de concentración de tensioactivo del 2 al 9 % de Pluronic<sup>®</sup> P123 produjo una importante variación en la macroestructura de las espumas de quitosano obtenidas. Los materiales obtenidos con un 9 % de Pluronic<sup>®</sup> P123 (EAC9) presentan una estructura fibrosa. Como la EAC9 se preparó con fase de cristal líquido en la fase continua, se estudió mediante SAXS la posibilidad que esta estructura fibrosa presentase nanoestructura. También se estudió la posible presencia de micro/mesoporosidad mediante adsorción/desorción de nitrógeno.



#### 4.5.2 Mesoporosidad de las espumas

Mediante SEM se ha caracterizado la macroestructura de las espumas de quitosano obtenidas a las dos concentraciones de P123, EAC6 y EAC9. Para poder estudiar la nanoestructura de dichas espumas, éstas también se caracterizaron mediante SAXS y WAXS. Dicha mesoestructura la podría presentar EAC9, ya que se utilizó una concentración de tensioactivo correspondiente a fase de cristal líquido. En la Figura 4.69 se muestran los espectros de SAXS y WAXS para EAC9. También se muestra el espectro de EAC6, con fase micelar, de forma comparativa.

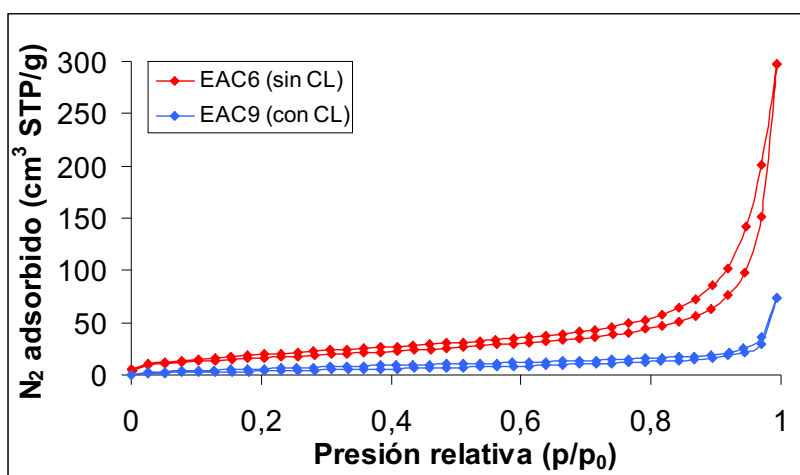


**Figura 4.69** Espectros de (a) SAXS y (b) WAXS para las espumas de quitosano obtenidas en EAC6 (2 % P123) y EAC9 (9 % P123) obtenidos a 25 °C. CL: cristal líquido.

Como se puede apreciar, los espectros de SAXS no muestran picos identificativos de nanoestructura ordenada debido al cristal líquido presente en la emulsión EAC9. Además, la mayor pendiente observada en EAC9, en comparación con EAC6, podría estar indicando una menor superficie específica de la espuma. Esta falta de nanoestructura muestra que las espumas obtenidas con composición EAC9 son principalmente amorfas. Ello se confirmó mediante el espectro de rayos X a ángulo grande (WAXS) donde no se observa ningún pico. La diferencia en intensidad del espectro entre EAC6 y EAC9 puede ser debida a diferencias en la cantidad de muestra utilizada para su caracterización. Para estudiar en más detalle la estructura de estos materiales, EAC6 y EAC9 se caracterizaron mediante adsorción/desorción de nitrógeno para determinar los valores de superficie específica, volumen y tamaño de poro.

### 4.5.3 Superficie específica, volumen y tamaño de poro

Las isothermas de adsorción y desorción de nitrógeno para EAC6 (2 % P123, sin cristal líquido) y EAC9 (9 % P123, con cristal líquido) se muestran en la Figura 4.70. Estas isothermas muestran claramente la importante influencia del cambio de macroestructura producida por la formación de diferentes agregados tensioactivos al incrementar la concentración de P123. La isoterma de la espuma de quitosano EAC6 se podría clasificar como de tipo II [Sing, 1985] con un ciclo de histéresis a presiones relativas altas que indica la naturaleza macroporosa de este tipo de espumas. No obstante, la formación de estructuras fibrosas observada en EAC9 produce una importante reducción del nitrógeno adsorbido en todo el rango de presión relativa, especialmente a presiones relativas altas. Por lo tanto, las isothermas muestran como, en función del volumen de nitrógeno adsorbido, la formación de estructuras en forma de fibras produce una reducción importante de la superficie específica y del volumen total de poro.



**Figura 4.70** Isothermas de adsorción/desorción de  $N_{2(g)}$  para las espumas de quitosano obtenidas en EAC6 (2 % P123) y EAC9 (9 % P123).

A partir de estas isothermas, aplicando el modelo BET (Ecuación 3.13) [Brunauer, 1938], se obtienen los valores de superficie específica ( $S_{BET}$ ). A partir del valor de nitrógeno adsorbido a  $p/p_0 \sim 1$  y de la Ecuación 3.14, se calcula el valor de volumen total ( $V_T$ ), para poros con un diámetro inferior a 300 nm, y el valor de volumen total de mesoporos ( $V_{Tm}$ ), a una presión relativa,  $p/p_0$ , de 0,955, para diámetros de poro inferiores a 50 nm. A partir de los valores,  $V_T$  y  $S_{BET}$ , se calcula el valor de diámetro medio de poro,  $D$

(Ecuación 3.15), considerando la aproximación de poros cilíndricos. Estos resultados se muestran en la Tabla 4.12.

**Tabla 4.12** Valores de superficie específica ( $S_{BET}$ ), volumen total de poro ( $V_T$ , para poros de diámetro inferior a 300 nm), volumen total de mesoporos ( $V_{Tm}$ , para poros de diámetro inferior a 50 nm) y diámetro de poro medio ( $D = 4V_T/S_{BET}$ ) para las espumas de quitosano obtenidas EAC6 (2 % P123) y EAC9 (9 % P123).

	Superficie específica, $S_{BET}$ (m <sup>2</sup> /g)	Volumen total de poro, $V_T$ (cm <sup>3</sup> /g)	Volumen total de mesoporos, $V_{Tm}$ (cm <sup>3</sup> /g)	Diámetro medio de poro, $D$ (nm)
<b>2 % P123</b>	63	0,46	0,192	29
<b>9 % P123</b>	17	0,11	0,039	27

Como ya reflejaban los valores de volumen de nitrógeno adsorbido en las isotermas (Figura 4.70), la espuma correspondiente a EAC6 (2 % P123) presenta una superficie específica superior a la mostrada por EAC9 (9 % P123). Dicha tendencia también se observa en los valores del volumen total de poro. Estos resultados indican la importante reducción de porosidad en EAC9 debido a la formación de estas estructuras fibrosas. En conclusión, las fibras observadas en la muestra EAC9 no son porosas. También se puede observar la importante aportación en el valor del volumen total de poro,  $V_T$ , de los poros con un diámetro inferior a 300 nm al comparar este valor con el volumen total de mesoporos,  $V_{Tm}$  (poros con un diámetro inferior a 50 nm). Esta considerable reducción en el valor de volumen de nitrógeno adsorbido indicaría que los materiales son principalmente macroporosos. Especialmente, cabe señalar la muestra EAC9, cuyos macroporos son grandes y corresponden al espacio entre fibras.

Una vez estudiados los sistemas formados por los tensioactivos Synperonic A7 y Pluronic® P123 en la aplicación de emulsiones altamente concentradas como medios de reacción para la obtención de materiales porosos de quitosano, se realizó un estudio comparativo entre ambos sistemas.

#### 4.6 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ESTABILIDAD DE LAS EMULSIONES CON LOS TENSIOACTIVOS SYNPERONIC A7 Y PLURONIC® P123 Y DE LAS PROPIEDADES FINALES DE LAS ESPUMAS DE QUITOSANO

En primer lugar, se realizó un análisis comparativo entre las composiciones formadas por los tensioactivos Synperonic A7 y Pluronic® P123 a partir del estudio de la variación del diámetro de gota en función del tiempo, al comparar los valores de las emulsiones preparadas con una concentración de tensioactivo del 2 % y a una velocidad de agitación de 700 rpm, factores que coinciden en ambos sistemas. Los valores de la media geométrica del diámetro de gota ( $D_{m.g.}$ ) se muestran en la Tabla 4.13.

**Tabla 4.13** Media geométrica del diámetro de gota,  $D_{m.g.}$  ( $\mu\text{m}$ ), e intervalo de confianza del 95 %,  $IC_{95\%}$ , para las emulsiones EAC1 (sin quitosano) y EAC2 (con quitosano), para el sistema con el tensioactivo Synperonic A7, y para las emulsiones EAC4 (sin quitosano) y EAC5 (con quitosano), para el sistema con el tensioactivo Pluronic® P123.

		$D_{m.g.} (IC_{95\%}) / \mu\text{m}$			
		t = 0 h	t = 24 h	t = 48 h	t = 72 h
<b>Sistema Synperonic A7</b>	<b>EAC1</b>	2,36 (2,27 - 2,45)	2,68 (2,59 - 2,79)	3,06 (2,92 - 3,20)	2,86 (2,73 - 3,00)
	<b>EAC2</b>	1,23 (1,21 - 1,25)	1,63 (1,60 - 1,66)	1,60 (1,57 - 1,64)	2,05 (2,00 - 2,11)
<b>Sistema Pluronic® P123</b>	<b>EAC4</b>	3,14 (3,05 - 3,23)	3,41 (3,32 - 3,50)	3,75 (3,65 - 3,86)	3,96 (3,85 - 4,08)
	<b>EAC5</b>	1,71 (1,67 - 1,74)	1,57 (1,53 - 1,60)	1,56 (1,52 - 1,61)	1,50 (1,46 - 1,54)

Se evaluó si la distribución del logaritmo neperiano del diámetro de gota obtenido en ambos sistemas para las diferentes categorías de factores estudiados (presencia de quitosano, sistema tensioactivo y tiempo) se podía considerar igual. Para ello, se utilizaron las pruebas no paramétricas de la suma de rangos de Wilcoxon [Wilcoxon, 1945] y del test de Kruskal-Wallis [Kruskal, 1957]. Los resultados mostraron que existían diferencias significativas en la distribución del logaritmo neperiano del diámetro de gota para cada uno de los factores estudiados (Anexos, apartado 8.9). La incorporación del quitosano produce una disminución de la distribución del logaritmo

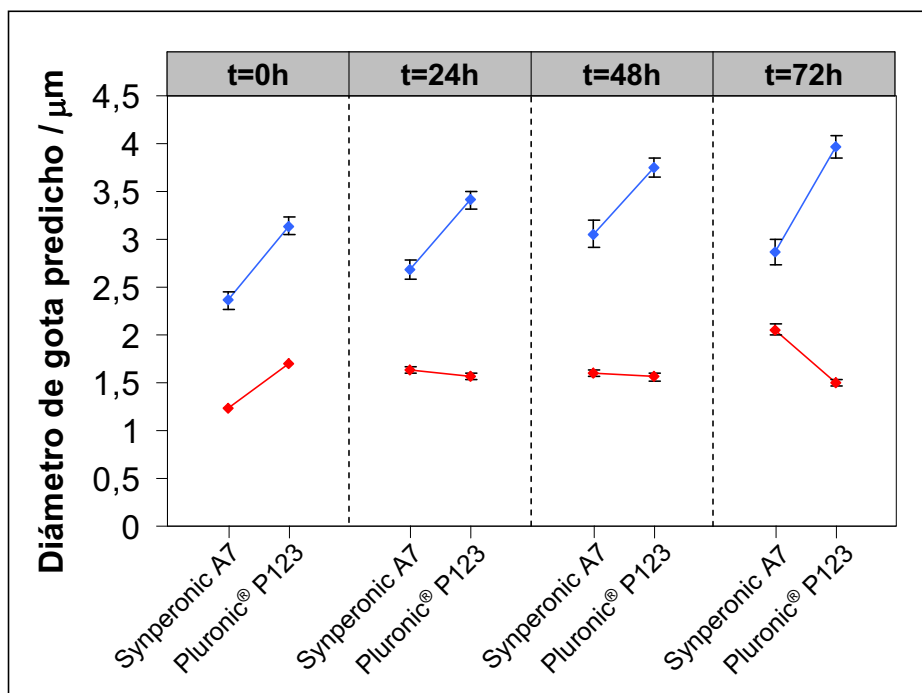
neperiano del diámetro de gota. El tiempo y el cambio de sistema tensioactivo (de Synperonic A7 a Pluronic® P123) producen un leve incremento de la distribución del logaritmo neperiano del diámetro de gota. Al ajustar por comparaciones múltiples con el método False Discovery Rate [Simes, 1986; Benjamini, 1995; Benjamini, 2001], se encontraron diferencias significativas para todas las comparaciones.

A continuación, se aplicó un modelo empírico de regresión lineal múltiple para estimar la influencia conjunta de los tres factores y sus interacciones de segundo y tercer orden en el logaritmo neperiano del diámetro de gota [Kleinbaum, 1998; Peña, 2002; Mitchell, 2012], obteniendo una ecuación lineal (Ecuación 4.8) (Anexos, apartado 8.10). Mediante este modelo, se explica el 44,2 % de la variabilidad del logaritmo neperiano del diámetro de gota por los tres factores introducidos y sus interacciones. Debido a que la interacción de tercer orden es significativa, los resultados se deben interpretar teniendo en cuenta la combinación de los tres factores estudiados. El ajuste de la ecuación empírica es el siguiente:

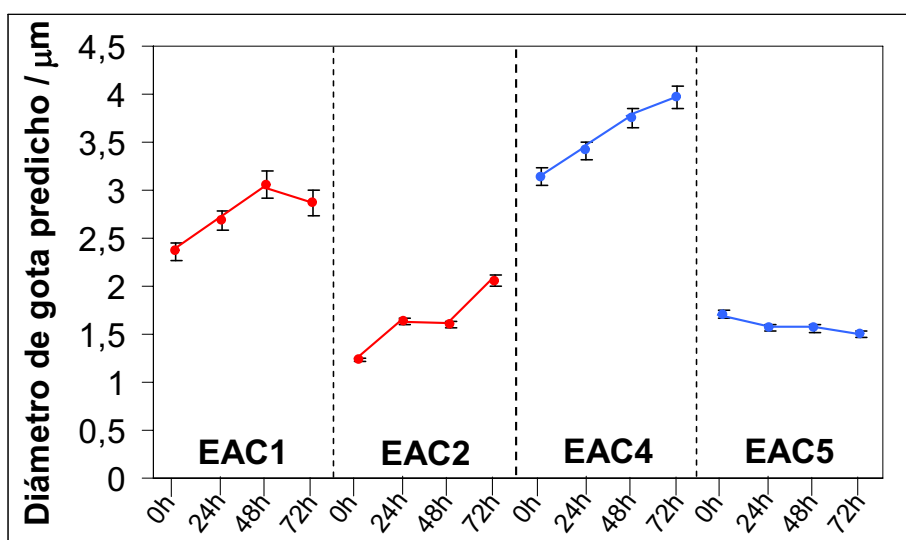
$$\begin{aligned} \ln(\text{diámetro de gota}) = & 0,859 + 0,285*\text{Pluronic}^{\text{®}} \text{ P123} + (-0,650)*\text{siCHT} \\ & + 0,129*24\text{h} + 0,259*48\text{h} + 0,192*72\text{h} + 0,041*\text{Pluronic}^{\text{®}} \text{ P123}* \text{siCHT} \\ & + (-0,046)*\text{Pluronic}^{\text{®}} \text{ P123}*24\text{h} + (-0,080)*9\% \text{ Pluronic}^{\text{®}} \text{ P123}*48\text{h} + \\ & 0,042*9\% \text{ Pluronic}^{\text{®}} \text{ P123}*72\text{h} + 0,150*\text{siCHT}*24\text{h} + 0,004*\text{siCHT}*48\text{h} \quad \text{Ecuación 4.8} \\ & + 0,319*\text{siCHT}*72\text{h} + (-0,319)*\text{Pluronic}^{\text{®}} \text{ P123}* \text{siCHT}*24\text{h} + \\ & (-0,271)*\text{Pluronic}^{\text{®}} \text{ P123}* \text{siCHT}*48\text{h} + (-0,683)*\text{Pluronic}^{\text{®}} \\ & \text{P123}* \text{siCHT}*72\text{h} \end{aligned}$$

donde “siCHT” indica las composiciones en presencia de quitosano.

A partir de la aplicación del modelo obtenido, se estimó el logaritmo neperiano del diámetro de gota medio predicho mediante el *Margins* del software Release 12 de STATA® [Baum, 2006; Cameron, 2011]. Los resultados se exponenciaron para expresarlos en términos de la variable diámetro de gota original y se presentan en la Figura 4.71 y la Figura 4.72. La Tabla 4.14 muestra los valores predichos por el modelo y su intervalo de confianza del 95 %.



**Figura 4.71** Diámetro de gota predicho considerando las variables independientes tipo de tensioactivo (Synperonic A7 y Pluronic® P123), la presencia de quitosano y el tiempo. En azul, se indican las composiciones sin quitosano y en rojo, las que presentan quitosano.



**Figura 4.72** Diámetro de gota predicho de las emulsiones preparadas, a una concentración de tensioactivo del 2 %, con el tensioactivo Synperonic A7, en ausencia (EAC1) y presencia (EAC2) de quitosano y las preparadas con el tensioactivo Pluronic® P123, en ausencia (EAC4) y presencia (EAC7) de quitosano. Cada punto de cada serie indica los tiempos 0, 24, 48 y 72 h.

**Tabla 4.14** Estimación del diámetro medio de gota predicho, junto con el intervalo de confianza del 95 %, mediante el comando *Margins* de STATA® para los sistemas formados con los tensioactivos Synperonic A7 y Pluronic® P123 a una concentración de tensioactivo del 2 %, en ausencia y presencia de quitosano (CHT).

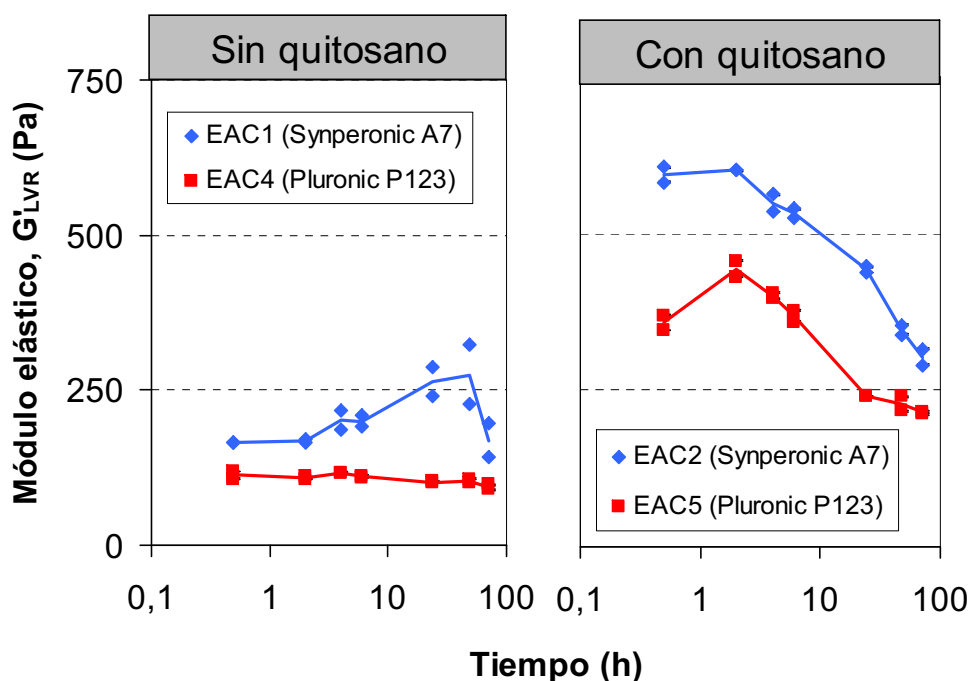
		t = 0 h	t = 24 h	t = 48 h	t = 72 h
<b>Synperonic A7</b>	<b>EAC1</b>	2,36 (2,27 - 2,45)	2,69 (2,59 - 2,79)	3,06 (2,93 - 3,20)	2,86 (2,73 - 3,00)
	<b>EAC2</b>	1,23 (1,21 - 1,25)	1,63 (1,60 - 1,66)	1,60 (1,57 - 1,64)	2,05 (2,00 - 2,11)
<b>Pluronic® P123</b>	<b>EAC4</b>	3,14 (3,05 - 3,23)	3,41 (3,32 - 3,50)	3,75 (3,65 - 3,86)	3,96 (3,85 - 4,08)
	<b>EAC5</b>	1,70 (1,67 - 1,74)	1,57 (1,53 - 1,60)	1,56 (1,52 - 1,61)	1,50 (1,46 - 1,54)

Diversas conclusiones pueden ser extraídas de los resultados obtenidos. En el sistema con el tensioactivo Synperonic A7, las emulsiones sin quitosano (EAC1) presentan menores diámetros de gota que con el tensioactivo Pluronic® P123 (EAC4), en todo el rango de tiempo estudiado. No obstante, ambos sistemas muestran la misma tendencia, un ligero incremento del diámetro de gota medio hasta 48 h. Este incremento, como se discutió para ambos sistemas anteriormente, podría ser debido a un proceso de coalescencia. Los ensayos que se realizaron para determinar qué mecanismos de desestabilización estaban presentes en cada sistema, indicaron que, probablemente, existía un proceso simultáneo de coalescencia y maduración de Ostwald. Este último proceso podría explicar la leve reducción del diámetro de gota observado en EAC1 a las 72 h. La maduración de Ostwald puede producir un aumento de la polidispersidad, aumentando el número de gotas de menor diámetro. Dado que la distribución del diámetro de gota se ha calculado en número, ello puede producir una disminución del diámetro medio.

La incorporación de quitosano produce un cambio de comportamiento en ambos sistemas. Se puede apreciar en ambas figuras (Figura 4.71 y Figura 4.72) que el sistema con Synperonic A7 (EAC2) proporciona diámetros de gota menores que los obtenidos con Pluronic® P123 (EAC5) hasta t = 24 h. No obstante, las emulsiones preparadas con el sistema Pluronic® P123 presentan una menor variación del diámetro con el tiempo.

Estos resultados indicarían una mayor estabilidad de las emulsiones EAC5, preparadas con Pluronic® P123.

Para la comparación de los valores del módulo elástico ( $G'_{LVR}$ ), se recopilan los valores experimentales para los dos sistemas tensioactivos estudiados en la Figura 4.73. Se realizaron dos medidas por cada tiempo (0,5, 2, 4, 6, 24, 48 y 72 h) y las líneas representan las medias de las observaciones.



**Figura 4.73** Valores del módulo elástico en la región de viscoelasticidad lineal ( $G'_{LVR}$ ) en función del tiempo para los sistemas tensioactivos Synperonic A7 (EAC1, sin quitosano, y EAC2, con quitosano) y Pluronic® P123 (EAC4, sin quitosano, y EAC5, con quitosano).

Se evaluó si existían diferencias estadísticamente significativas en el módulo elástico ( $G'_{LVR}$ ) para las diferentes categorías de los factores (presencia de quitosano, sistema tensioactivo y tiempo). Se utilizaron las pruebas no paramétricas de la suma de rangos de Wilcoxon [Wilcoxon, 1945] y del test de Kruskal-Wallis [Kruskal, 1957]. Los resultados obtenidos, presentados gráficamente utilizando diagramas de caja o *box-plots* (Anexos, apartado 8.11) indican que existen diferencias significativas con la variación del sistema tensioactivo y con la presencia de quitosano que da lugar a un incremento



del  $G'_{LVR}$ . Sin embargo, la variación del tiempo no produce cambios significativos en los valores de  $G'_{LVR}$ .

La variable  $G'_{LVR}$  no seguía una distribución Normal( $\mu, \sigma^2$ ) ni simétrica, ni siquiera transformándola. Por este motivo, no se pudo aplicar un modelo de regresión lineal. Se optó por realizar un modelo de regresión de cuantiles modelizando la mediana [Koenker, 2005], sin embargo, el número de datos experimentales no era suficiente para estimar un modelo de regresión válido. Por ello, se describen y discuten a continuación las tendencias observadas en los valores experimentales de  $G'_{LVR}$  en función de la presencia de quitosano, del sistema tensioactivo y del tiempo (Figura 4.73). El sistema formado por el tensioactivo Synperonic A7 presenta valores de  $G'_{LVR}$  superiores al sistema formado por el tensioactivo Pluronic<sup>®</sup> P123, en ausencia y presencia de quitosano y a cualquier tiempo. Este comportamiento implica, en este caso, la obtención de un menor diámetro de gota. No obstante, el sistema formado con Pluronic<sup>®</sup> P123 muestra una menor variación del módulo elástico con el tiempo que reflejaría una mayor estabilidad del sistema, como indica la menor variación del diámetro de gota obtenida con el Pluronic<sup>®</sup> P123 mediante microscopía óptica.

Con respecto a las espumas de quitosano obtenidas mediante los sistemas con Synperonic A7 y Pluronic<sup>®</sup> P123, a una concentración de tensioactivo del 2 %, las imágenes de SEM (Figura 4.29 y Figura 4.66, respectivamente) mostraron una topografía similar, con poros inferiores a 500 nm, indicando la naturaleza macroporosa de las dos composiciones utilizadas (EAC3 y EAC6, respectivamente). Sin embargo, con el sistema con Pluronic<sup>®</sup> P123, se obtuvieron tamaños de poro ligeramente inferiores. Dicha reducción de tamaño pudo ser la causante del incremento de superficie específica, duplicando su valor de 29 a 63 m<sup>2</sup>/g (Tabla 4.4 y Tabla 4.12), al cambiar de sistema tensioactivo.

La obtención de emulsiones de mayor estabilidad, junto con la mayor superficie específica alcanzada por el sistema con el tensioactivo Pluronic<sup>®</sup> P123 indicarían que es un sistema adecuado para la preparación de espumas de quitosano. Además, se debe considerar que algunos de los tensioactivos copoliméricos de bloque, como el Pluronic<sup>®</sup> P123, están aceptados por la FDA (Agencia de Alimentos y Medicamentos de los

Estados Unidos), pudiendo ser aplicados de forma directa o indirecta en la industria farmacéutica o medicina.



*Capítulo 5*

# **Conclusiones**

---



En la presente tesis se han obtenido materiales porosos de quitosano utilizando emulsiones altamente concentradas como medios de reacción al incorporar quitosano en la fase continua de las emulsiones mediante un proceso de entrecruzamiento del quitosano con un entrecruzante de origen natural, la genipina.

El análisis de los resultados obtenidos ha permitido alcanzar las siguientes conclusiones principales:

### **1. Estudio del comportamiento fásico.**

- El estudio del comportamiento fásico de los cuatro sistemas tensioactivos estudiados (Synperonic A7, Tween 20, Pluronic® F127 y Pluronic® P123) indicó que los sistemas adecuados para la obtención de materiales de quitosano eran Synperonic A7 y Pluronic® P123, al formar fases líquidas entre 25 y 60 °C (rango de temperatura adecuado en presencia de quitosano) y poseer un variado comportamiento fásico, formando diferentes estructuras tensioactivas.
- El comportamiento fásico de los sistemas binarios y ternario con el tensioactivo Synperonic A7 indicaron que la presencia de quitosano afecta poco a la autoagregación de este tensioactivo no iónico.
- El análisis del sistema ternario Quitosano 2% / Solución reguladora de fosfatos / Pluronic® P123 / Decano indica que es posible modificar las estructuras tensioactivas presentes en la fase continua de emulsiones altamente concentradas mediante la variación de la concentración de tensioactivo, obteniendo fases de cristal líquido hexagonal y laminar.

### **2. Estudio de la influencia de la composición de la fase continua, la velocidad de agitación y la concentración de tensioactivo en la estabilidad cinética de las emulsiones.**

- Se han preparado emulsiones altamente concentradas de tipo O/W mediante un método de alta energía a 25 °C con los sistemas Solución de ácido acético / Solución reguladora de fosfatos / Synperonic A7 / Decano y Solución de quitosano / Solución reguladora de fosfatos / Synperonic A7 / Decano. Las emulsiones altamente

concentradas obtenidas en este sistema son estables a 25 °C durante un mínimo de 72 h.

- La temperatura influye de forma importante en el proceso de entrecruzamiento del quitosano. El entrecruzamiento del sistema Quitosano 2% / Genipina 1% / Synperonic A7 / Decano se completa en ~12 días a 25 °C, periodo de tiempo poco viable para la obtención de materiales de quitosano. Por lo tanto, la obtención de los materiales se realizó a 40 °C.
- Los resultados obtenidos mediante el comportamiento fásico del sistema Quitosano 2% / Solución reguladora de fosfatos / Pluronic<sup>®</sup> P123 / Decano indican un desplazamiento a concentraciones de tensioactivo inferiores en la formación de las estructuras de cristal líquido presentes en la fase continua de las emulsiones (EAC8). El incremento del área interfacial producido en las emulsiones da lugar a un desplazamiento de las moléculas de tensioactivo de la fase continua a la interfase, para estabilizar la emulsión, dando lugar a una menor concentración de tensioactivo de la que se esperaría.
- El estudio del tamaño de gota mediante difracción de luz láser ha mostrado un proceso de floculación a partir de 48 h de las emulsiones diluidas, que ha impedido una correcta caracterización mediante esta técnica para los dos sistemas estudiados.
- La caracterización mediante microscopía óptica de las emulsiones preparadas, con fase externa micelar, de los sistemas tensioactivos Synperonic A7 (EAC1 y EAC2) y Pluronic<sup>®</sup> P123 (EAC4 y EAC5) podría mostrar un leve proceso de coalescencia y maduración de Ostwald, producidos de forma simultánea.
- La incorporación del quitosano reduce el tamaño de gota en las emulsiones preparadas con los tensioactivos Synperonic A7 (EAC2) y Pluronic<sup>®</sup> P123 (EAC5). Este efecto se ha atribuido a un incremento de la viscosidad de la fase continua de las emulsiones que produce un aumento de la cizalla durante el proceso de emulsificación.
- El aumento de la concentración de tensioactivo del 2 al 9 % de Pluronic<sup>®</sup> P123, EAC4 y EAC7 respectivamente, produce un importante incremento de la viscosidad, de ocho órdenes de magnitud, debido a la formación de una estructura de cristal líquido laminar en la fase externa de las emulsiones. Sin embargo, no se ha

observado una reducción importante del tamaño de gota. Estos resultados podrían indicar la existencia de un valor mínimo del tamaño de gota al incrementar la viscosidad de la fase continua.

- Los ensayos oscilatorios realizados mediante reología para el sistema con el tensioactivo Synperonic A7 muestran claramente cómo la incorporación de quitosano produce un aumento del módulo elástico ( $G'_{LVR}$ ), como resultado de la reducción del tamaño de gota.
- Los resultados obtenidos para el sistema con el tensioactivo Pluronic<sup>®</sup> P123 indican que la incorporación de quitosano presenta una menor influencia en el sistema al incrementar la concentración de tensioactivo al 9%, mostrando valores  $G'_{LVR}$  similares en presencia y ausencia de quitosano.
- El estudio del proceso de entrecruzamiento realizado a 40°C mediante reología ha demostrado que dicho proceso puede considerarse finalizado a tiempos inferiores a 48 h para una concentración de tensioactivo del 2 %, tanto con Synperonic A7, como con Pluronic<sup>®</sup> P123, al obtenerse valores de módulo elástico ( $G'_{LVR}$ ) y capacitancia ( $J$ ) constantes.
- El incremento de la concentración de tensioactivo al 9 % de Pluronic<sup>®</sup> P123 produce una disminución en el grado de entrecruzamiento del quitosano, debido a la presencia de reacciones secundarias.

### **3. Obtención y caracterización de las espumas de quitosano.**

- Se ha detectado un encogimiento de las espumas obtenidas, utilizando ambos sistemas tensioactivos, durante las etapas de lavado y liofilización atribuido a las bajas propiedades mecánicas de estos materiales.
- El proceso de extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico no ha reducido el encogimiento de las espumas observándose un encogimiento similar al obtenido mediante extracción Soxhlet.
- Las espumas de quitosano obtenidas a partir de los dos sistemas tensioactivos estudiados, Synperonic A7 y Pluronic<sup>®</sup> P123, para una concentración de tensioactivo del 2 %, presentan una estructura macroporosa, con poros entre 200 y 500 nm y valores de superficie específica entre 25 y 63 m<sup>2</sup>/g.



- La formación de estructuras fibrosas con porosidad reducida, observadas al utilizar una concentración de tensioactivo del 9 % de Pluronic<sup>®</sup> P123, podría ser debida a la solubilización parcial de la genipina en los agregados tensioactivos debido a la naturaleza anfifílica de la genipina, modificando la reacción de la genipina con el quitosano. La presencia de agregados tensioactivos podría facilitar la nucleación en la formación de fibras.

#### **4. Estudio de las propiedades de nanofilms de quitosano.**

- Se han obtenido nanofilms de quitosano, de ~ 40 nm de grosor, fijados sobre un sustrato.
- La caracterización de los nanofilms de quitosano entrecruzados con genipina ha mostrado su respuesta al pH, produciéndose un proceso de hinchamiento a pH ácido y su encogimiento a pH básico, los cuales se podrían considerar reversibles.

#### **5. Estudio de las espumas de quitosano en la adsorción de colorantes.**

- Las espumas de quitosano obtenidas con el tensioactivo Synperonic A7 presentan capacidades de adsorción de colorante relativamente bajas, de ~ 0,03 gramos de colorante por gramo de material.
- La baja capacidad de adsorción de colorante se ha atribuido al alto grado de entrecruzamiento de los materiales de quitosano obtenidos, que presentan un reducido número de grupos amino disponibles.

*Capítulo 6*

# **Recomendaciones**

---



Se han obtenido espumas macroporosas de quitosano utilizando dos sistemas tensioactivos. El estudio realizado se ha centrado en la estabilidad de las emulsiones altamente concentradas utilizadas como medios de reacción, en la cinética del proceso de entrecruzamiento del quitosano y en las propiedades morfológicas de las espumas. A partir de los resultados obtenidos, se plantean diversas propuestas para una futura investigación:

- Mejora de las propiedades mecánicas de los materiales para obtener aerogeles mecánicamente estables (sin encogimiento) mediante la copolimerización del quitosano con un polímero con elevada temperatura de transición vítrea o mediante la incorporación de nanopartículas. También se propone la congelación y liofilización directa de la emulsión altamente concentrada entrecruzada, evitando los procesos de lavado que provocan el encogimiento del material.
- Aumento de la concentración de grupos amino libres reduciendo el entrecruzamiento mediante la utilización de una menor concentración de genipina.
- Estudio sistemático de la formación de las estructuras fibrosas observadas a concentraciones elevadas del tensioactivo Pluronic<sup>®</sup> P123, estudiando en detalle el mecanismo y los procesos involucrados.
- Selección de otros sistemas tensioactivos biocompatibles, aceptados por la FDA, en la preparación de materiales meso/macroporosos aplicados en procesos de difusión de moléculas de alto peso molecular, como polímeros o biomoléculas.
- Estudio de la influencia de las estructuras mesoporosas (hexagonales, cúbicas o laminares) en las propiedades de materiales duales meso/macroporosos.
- La utilización de derivados del quitosano como el carboximetilquitosano (CMCHT) ampliaría el abanico de posibilidades de este tipo de materiales. El CMCHT es soluble a pH neutro y puede presentar capacidad de hinchamiento tanto a pH ácido como neutro, siendo ampliamente utilizado en sistemas de liberación de principios activos.

- La obtención de aerogeles de quitosano mecánicamente estables y con estructuras porosas duales indicaría que la utilización de emulsiones altamente concentradas como medios de reacción es un método adecuado para la obtención de aerogeles con polímeros de bajas propiedades mecánicas como  $\kappa$ -carragenanos, alginatos o dextrano, que permitiría el control del tamaño de poro siendo un proceso escalable.

*Capítulo 7*  
**Referencias**

---



**-A-**

- Abbasian, Z. & Moghbeli, M. R. (2011)** Preparation of highly open porous styrene/acrylonitrile and styrene/acrylonitrile/organoclay polymerized high internal phase emulsion (polyHIPE) foams via emulsion templating. *Journal of Applied Polymer Science*, **119**, 3728-3738.
- Agulló, E., Mato, R., Peniche, C., et al (2004)** *Fuentes y procesos de obtención (Capítulo 3), en Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones (1ª Ed.)*. Lima (Perú): Pontificia Universidad Católica de Perú.
- Alam, M. M. & Aramaki, K. (2009)** Glycerol effects on the formation and rheology of hexagonal phase and related gel emulsion. *Journal of Colloid and Interface Science*, **336**, 820-826.
- Alam, M. M. & Aramaki, K. (2014)** Liquid crystal-based emulsions: progress and prospects. *Journal of Oleo Science*, **63**, 97-108.
- Alexandridis, P., Athanassiou, V., Fukuda, S., et al (1994)** Surface activity of poly(ethylene oxide)-block-poly(propylene oxide)-block-poly(ethylene oxide) copolymers. *Langmuir*, **10**, 2604-2612.
- Alves, N. M., Picart, C. & Mano, J. F. (2009)** Self assembling and crosslinking of polyelectrolyte multilayer films of chitosan and alginate studied by QCM and IR spectroscopy. *Macromolecular Bioscience*, **9**, 776-785.
- Arai, H. & Shinoda, K. (1967)** The effect of mixing of oils and of nonionic surfactants on the phase inversion temperatures of emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, **25**, 396-400.
- Aranaz, I., Harris, R. & Heras, A. (2010)** Chitosan amphiphilic derivatives. Chemistry and applications. *Current Organic Chemistry*, **14**, 308-330.
- Arditty, S., Whitby, C. P., Binks, B. P., et al (2003)** Some general features of limited coalescence in solid-stabilized emulsions. *The European Physical Journal E*. **11**, 273-281.
- Arditty, S., Schmitt, V., Giermanska-Kahn, J., et al (2004)** Materials based on solid-stabilized emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, **275**, 659-664.
- Arenas-Calderon, E., Sadtler, V., Marchal, P., et al (2014)** Preparation of highly concentrated bitumen emulsions by catastrophic phase inversion: Follow-up of the emulsification process. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **458**, 25-31.



**Atanase, L. I. & Riess, G. (2013)** Block copolymer stabilized nonaqueous biocompatible sub-micron emulsions for topical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, **448**, 339-345.

**Aveyard, R., Binks, B. P. & Clint, J. H. (2003)** Emulsions stabilised solely by colloidal particles. *Advances in Colloid and Interface Science*, **100-102**, 503-546.

**Azlan, K., Wan Saime, W. N. & Lai Ken, L. (2009)** Chitosan and chemically modified chitosan beads for acid dyes sorption. *Journal of Environmental Sciences*, **21**, 296-302.

### **-B-**

**Babak, V. G. & Stébé, M.-J. (2002)** Highly concentrated emulsions: Physicochemical principles of formulation. *Journal of Dispersion Science and Technology*, **23**, 1-22.

**Baker, S. C., Rohman, G., Southgate, J., et al (2009)** The relationship between the mechanical properties and cell behaviour on PLGA and PCL scaffolds for bladder tissue engineering. *Biomaterials*, **30**, 1321-1328.

**Bancroft, W. D. (1913)** The theory of emulsification, V. *Journal of Physical Chemistry*, **17**, 501-519.

**Barbetta, A. & Cameron, N. R. (2004)** Morphology and surface area of emulsion-derived (polyHIPE) solid foams prepared with oil-phase soluble porogenic solvents: Span 80 as surfactant. *Macromolecules*, **37**, 3188-3201.

**Barbetta, A., Dentini, M., De Vecchis, M. S., et al (2005)** Scaffolds based on biopolymeric foams. *Advanced Functional Materials*, **15**, 118-124.

**Barbetta, A., Rizzitelli, G., Bedini, R., et al (2010)** Porous gelatin hydrogels by gas-in-liquid foam templating. *Soft Matter*, **6**, 1785-1792.

**Barby, D. & Haq, Z. (1982)** Low density porous cross-linked polymeric materials and their preparation. *Patente europea 0060138*.

**Barnes, H. A., Hutton, J. F. & Walters, K. (1993)** *An introduction to rheology* (3<sup>a</sup> Ed.). Amsterdam (The Netherlands): Elsevier.

**Barnes, H. A. (1994)** Rheology of emulsions - a review. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **91**, 89-95.

**Barrett, E. P., Joyner, J. G. & Halenda, P. P. (1951)** The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from Nitrogen isotherms. *Journal of American Chemical Society*, **73**, 373-380.

- Bartl, V. H., Prof, H. & Ing, E. (1962)** Uber die polymerisation in umgekehrter emulsion. *Macromolecular Chemistry and Physics*, **57**, 74-95.
- Basappa, G., Kumaran, V., Nott, P. R., et al (1999)** Structure and rheology of the defect-gel states of pure and particle-dispersed lyotropic lamellar phases. *The European Physical Journal B*, **12**, 269-276.
- Baum, C. F. (2006)** *An Introduction to Modern Econometrics Using Stata*. Texas (USA): Stata Press.
- Bécu, L., Manneville, S. & Colin, A. (2006)** Yielding and flow in adhesive and non-adhesive concentrated emulsions. *Physical Review Letters*, **96**, 138302-138307.
- Becher, P. (1965)** *Emulsions: Theory and practice* (2<sup>a</sup> Ed.). New York (USA): Reinhold Publishing Corp. (ACS Monograph).
- Benjamini, Y. & Hochberg, Y. (1995)** Controlling the False Discovery Rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, **57**, 289-300.
- Benjamini, Y. & Yekutieli, D. (2001)** The control of the False Discovery Rate in multiple testing under dependency. *The Annals of Statistics*, **29**, 1165-1188.
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., et al (2004)** Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **57**, 19-34.
- Besnard, L., Marchal, F., Paredes, J. F., et al (2013)** Multiple emulsions controlled by stimuli-responsive polymers. *Advanced Materials*, **25**, 2844-2848.
- Binks, B. P. (1998)** *Emulsions - Recent Advances in Understanding (Capítulo 1)*, en: *Modern Aspects of Emulsion Formation*. Cambridge (UK): The Royal Society of Chemistry.
- Binks, B. P. & Lumsdon, S. O. (2001)** Pickering emulsions stabilized by monodisperse latex particles: Effects of particle size. *Langmuir*, **17**, 4540-4547.
- Binks, B. P. (2002)** Particles as surfactants - similarities and differences. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **7**, 21-41.
- Blin, J. L., Bleta, R., Ghanbaja, J., et al (2006)** Fluorinated emulsions: Templates for the direct preparation of macroporous-mesoporous silica with a highly ordered array of large mesopores. *Microporous and Mesoporous Materials*, **94**, 74-80.
- Blin, J. L., Grignard, J., Zimny, K., et al (2007)** Investigation of the C16(EO)10/decane/water system for the design of porous silica materials. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **308**, 71-78.

- Blokzijl, B. W. & Engberts, J. B. F. N. (1993)** Hydrophobic Effects. Opinions and Facts. *Angewandte Chemie International Edition in English*, **32**, 1545-1579.
- Bonino, C. A., Samorezov, J. E., Jeon, O., et al (2011)** Real-time in situ rheology of alginate hydrogel photocrosslinking. *Soft Matter*, **7**, 11510-11517.
- Boucard, N., Viton, C., Agay, D., et al (2007)** The use of physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third-degree burns. *Biomaterials*, **28**, 3478-3488.
- Brannon-Peppas, L. & Peppas, N. A. (1991)** Equilibrium swelling behavior of pH-sensitive hydrogels. *Chemical Engineering Science*, **46**, 715-722.
- Brunauer, S., Emmett, P. H. & Teller, E. (1938)** Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of American Chemical Society*, **60**, 309-319.
- Butler, R., Davies, C. M. & Cooper, A. I. (2001)** Emulsion templating using high internal phase supercritical fluid emulsions. *Advanced Materials*, **13**, 1459-1463.
- Butler, R., Hopkinson, I. & Cooper, A. I. (2003a)** Synthesis of porous emulsion-templated polymers using high internal phase CO<sub>2</sub> -in-water emulsions. *Journal of American Chemical Society*, **125**, 14473-14481.
- Butler, M. F., Ng, Y.-f. & Pudney, P. D. A. (2003b)** Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **41**, 3941-3953.

**-C-**

- Calderó, G., Llinàs, M., García-Celma, M. J., et al (2010)** Studies on controlled release of hydrophilic drugs from W/O high internal phase ratio emulsions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **99**, 701-711.
- Calero, N., Muñoz, J., Cox, P. W., et al (2013)** Influence of chitosan concentration on the stability, microstructure and rheological properties of O/W emulsions formulated with high-oleic sunflower oil and potato protein. *Food Hydrocolloids*, **30**, 152-162.
- Calvet, D., Wong, J. Y. & Giasson, S. (2004)** Rheological monitoring of polyacrylamide gelation: Importance of cross-link density and temperature. *Macromolecules*, **37**, 7762-7771.
- Cameron, M. R., Sherrington, D. C., Albiston, L., et al (1996)** Study of the formation of the open-cellular morphology of poly(styrene/divinylbenzene) polyHiPE materials by cryo-SEM. *Colloid and Polymer Science*, **274**, 592-595.

- Cameron, A. C. & Trivedi, P. K. (2010)** *Microeconometrics Using Stata, revised edition*: Stata Press.
- Carn, F., Colin, A., Achard, M.-f., et al (2004)** Inorganic monoliths hierarchically textured via concentrated direct emulsion and micellar templates. *Journal of Materials Chemistry*, **14**, 1370-1376.
- Carnachan, R. J., Bokhari, M., Przyborski, S. A., et al (2006)** Tailoring the morphology of emulsion-templated porous polymers. *Soft Matter*, **2**, 608-616.
- Ceglia, G., Merlin, A., Viot, P., et al (2014)** Porous materials with tunable mechanical properties. *Journal of Porous Materials*, **21**, 903-912.
- Claesson, P. M. & Ninham, B. W. (1992)** pH-Dependent interactions between adsorbed chitosan layers. *Langmuir*, **8**, 1406-1412.
- Cockbain, E. G. & McRoberts, T. S. (1953)** The stability of elementary emulsion drops and emulsions. *Journal of Colloid Science*, **8**, 440-451.
- Cooper, A. I. (2000)** Polymer synthesis and processing using supercritical carbon dioxide. *Journal of Materials Chemistry*, **10**, 207-234.
- Crini, G. & Badot, P.-M. (2008a)** Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature. *Progress in Polymer Science*, **33**, 399-447.
- Crini, G., Gimbert, F., Robert, C., et al (2008b)** The removal of Basic Blue 3 from aqueous solutions by chitosan-based adsorbent: batch studies. *Journal of Hazardous Materials*, **153**, 96-106.
- Chang, C., Duan, B. & Zhang, L. (2009)** Fabrication and characterization of novel macroporous cellulose–alginate hydrogels. *Polymer*, **50**, 5467-5473.
- Chao, A.-C., Yu, S.-H. & Chuang, G.-S. (2006)** Using NaCl particles as porogen to prepare a highly adsorbent chitosan membranes. *Journal of Membrane Science*, **280**, 163-174.
- Chatterjee, S., Chatterjee, S., Chatterjee, B. P., et al (2005)** Adsorption of a model anionic dye, eosin Y, from aqueous solution by chitosan hydrobeads. *Journal of Colloid and Interface Science*, **288**, 30-35.
- Chen, S., Liu, M., Jin, S., et al (2005)** Synthesis and swelling properties of pH-sensitive hydrogels based on chitosan and poly(methacrylic acid) semi-interpenetrating polymer network. *Journal of Applied Polymer Science*, **98**, 1720-1726.

**Chiou, M.-S., Ho, P.-Y. & Li, H.-Y. (2004)** Adsorption of anionic dyes in acid solutions using chemically cross-linked chitosan beads. *Dyes and Pigments*, **60**, 69-84.

**-D-**

**Davies, J. T. (1957)** A quantitative kinetic theory of emulsion type. I. Physical chemistry of the emulsifying agent. *Gas/Liquid and Liquid/Liquid Interfaces. Proceeding of 2nd International Congress Surface Activity*, 426-438.

**Davies, M. T. (1959)** A universal buffer solution for use in ultra-violet spectrophotometry. *Analyst*, **84**, 248-251.

**de Boer, G. B. J., de Weerd, C., Thoenes, D., et al (1987)** Laser diffraction spectrometry: Fraunhofer diffraction versus Mie scattering. *Part. Charact.*, **4**, 14-15.

**de Las Heras, C., Pennadam, S. & Alexander, C. (2005)** Stimuli responsive polymers for biomedical applications. *Chemical Society Reviews*, **34**, 276-285.

**Dehghani, F. & Annabi, N. (2011)** Engineering porous scaffolds using gas-based techniques. *Current Opinion in Biotechnology*, **22**, 661-666.

**Delmas, T., Piraux, H., Couffin, A.-C., et al (2011)** How to prepare and stabilize very small nanoemulsions. *Langmuir*, **27**, 1683-1692.

**Deminière, B., Colin, A., Leal-Calderon, F., et al (1998)** *Lifetime and Destruction of Concentrated Emulsions Undergoing Coalescence (Capítulo 8)*, en: *Modern Aspects of Emulsion Formation*. Cambridge (UK): The Royal Society of Chemistry.

**Derjaguin, B. & Landau, L. (1941)** Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solution of electrolytes. *Acta Physicochim.*, **14**, 633-662.

**Derkach, S. R. (2009)** Rheology of emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, **151**, 1-23.

**Destribats, M., Faure, B., Birot, M., et al (2012)** Tailored Silica Macrocellular Foams: Combining Limited Coalescence-Based Pickering Emulsion and Sol-Gel Process. *Advanced Functional Materials*, **22**, 2642-2654.

**Destribats, M., Pinaud, F., Sellier, E., et al (2013)** Pickering emulsions stabilized by soft microgels: Influence of the emulsification process on particle interfacial organization and emulsion properties. *Langmuir*, **29**, 12367-12374.

- Destribats, M., Laurichesse, E., Tanner, H., et al (2014)** Pickering Emulsions: What Are the Main Parameters Determining the Emulsion Type and Interfacial Properties? *Langmuir*, **30**, 9313-9326.
- Dickinson, E. (2009)** Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, **23**, 1473-1482.
- Dimitrova, G. T., Tadros, T. F. & Luckham, P. F. (1995)** Investigations of the phase changes of nonionic surfactants using microscopy, differential scanning calorimetry, and rheology. 1. Synperonic A7, a C13/C15 alcohol with 7 mol of ethylene oxide. *Langmuir*, **11**, 1101-1111.
- Dimitrova, G. T., Tadros, T. F., Luckham, P. F., et al (1996)** Investigations into the phase behavior of nonionic ethoxylated surfactants using  $^2\text{H}$  NMR spectroscopy. *Langmuir*, **12**, 315-318.
- Dos Santos, O. D. H., Miotto, J. V., de Moraes, J. M., et al (2005)** Attainment of emulsions with liquid crystal from marigold oil using the required HLB method. *Journal of Dispersion Science and Technology*, **26**, 243-249.
- Du, N., Stébé, M. J., Bleta, R., et al (2010)** Preparation and characterization of porous silica templated by a nonionic fluorinated systems. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **357**, 116-127.
- Dzul Erosa, M. S., Saucedo Medina, T. I., Navarro Mendoza, R., et al (2001)** Cadmium sorption on chitosan sorbents : kinetic and equilibrium studies. *Hydrometallurgy*, **61**, 157-167.

**-E-**

- Engels, T. & von Rybinski, W. (1998)** Liquid crystalline surfactant phases in chemical applications. *Journal of Materials Chemistry*, **8**, 1313-1320.
- Esquena, J., Sankar, G. S. R. R. & Solans, C. (2003)** Highly concentrated W/O emulsions prepared by the PIT method as templates for solid foams. *Langmuir*, **19**, 2983-2988.
- Esquena, J. & Solans, C. (2006)** *Highly Concentrated Emulsions as Templates for Solid Foams (Capítulo 6)*, en: *Emulsions and Emulsion Stability* (2<sup>a</sup> Ed.). Boca Raton, FL (USA): Taylor & Francis (Surfactant Science Series, Volume 132).

**Esquena, J., Aramaki, K. & Solans, C. (2012)** Preparation of mesoporous/macroporous materials in highly concentrated emulsions based on cubic phases by a single-step method. *Langmuir*, **28**, 12334-12340.

**Everett, D. H. (1971)** Manual of symbols and terminology for physicochemical quantities and units. *International Union of Pure and Applied Chemistry, Appendix I*, 579-638.

### **-F-**

**Fairhurst, C. E., Holmes, M. C. & Leaver, M. S. (1997)** Structure and morphology of the intermediate phase region in the nonionic surfactant C16EO6/water system. *Langmuir*, **13**, 4964-4975.

**Fatimi, A., Tassin, J. F., Quillard, S., et al (2008)** The rheological properties of silated hydroxypropylmethylcellulose tissue engineering matrices. *Biomaterials*, **29**, 533-543.

**Fernandes, S. C. M., Oliveira, L., Freire, C. S. R., et al (2009)** Novel transparent nanocomposite films based on chitosan and bacterial cellulose. *Green Chemistry*, **11**, 2023-2029.

**Forgiarini, A., Esquena, J., Gonza, C., et al (2001)** Formation of nano-emulsions by low-energy emulsification methods at constant temperature. *Langmuir*, **17**, 2076-2083.

**Foudazi, R., Masalova, I. & Malkin, A. Y. (2011)** Flow behaviour of highly concentrated emulsions of supersaturated aqueous solution in oil. *Rheologica Acta*, **50**, 897-907.

**Friberg, S. E. (1971)** Liquid crystalline phases in emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, **37**, 291-295.

**Friberg, S., Jansson, P. O. & Ceberberg, E. (1976)** Surfactant association structure and emulsion stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, **55**, 614-623.

**Fuchs, N. (1934)** Über die stabilität und aufladung der Aerosole. *Zeitschrift für Physik*, **89**, 736-743.

**Furusaki, E., Ueno, Y., Sakairi, N., et al (1996)** Facile preparation and inclusion ability of a chitosan derivative bearing. *Carbohydrate Polymers*, **29**, 29-34.

**-G-**

- Gallarate, M., Carlotti, M. E., Trotta, M., et al (1999)** On the stability of ascorbic acid in emulsified systems for topical and cosmetic use. *International Journal of Pharmaceutics*, **188**, 233-241.
- Gerente, C., Lee, V. K. C., Cloirec, P. L., et al (2007)** Application of chitosan for the removal of metals from wastewaters by adsorption-Mechanisms and models review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **37**, 41-127.
- Gibbs, G., Tobin, J. M. & Guibal, E. (2004)** Influence of chitosan preprotonation on reactive Black 5 sorption isotherms and kinetics. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **43**, 1-11.
- Gil, E. & Hudson, S. (2004)** Stimuli-reponsive polymers and their bioconjugates. *Progress in Polymer Science*, **29**, 1173-1222.
- Giles, C. H., D'Silva, A. P. & Easton, I. A. (1974)** A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm. Part II. Experimental interpretation. *Journal of Colloid and Interface Science*, **47**, 766-778.
- Giles, C. H., Smith, D. & Huitson, A. (1974b)** A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm. I. Theoretical. *Journal of Colloid and Interface Science*, **47**, 755-765.
- Gilsenan, P. M. & Ross-Murphy, S. B. (2001)** Shear creep of gelatin gels from mammalian and piscine collagens. *International Journal of Biological Macromolecules*, **29**, 53-61.
- Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., López-Caballero, M. E., et al (2010)** Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, **27**, 889-896.
- González-Aguilar, G. a., Valenzuela-Soto, E., Lizardi-Mendoza, J., et al (2009)** Effect of chitosan coating in preventing deterioration and preserving the quality of fresh-cut papaya 'Maradol'. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **89**, 15-23.
- Goycoolea, F. M., Argüelles-Monal, W. M., Lizardi, J., et al (2007)** Temperature and pH-sensitive chitosan hydrogels: DSC, rheological and swelling evidence of a volume phase transition. *Polymer Bulletin*, **58**, 225-234.
- Griffin, W. C. (1949)** Classification of surface-active agents by "HLB". *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 311-326.



- Guibal, E. (2004)** Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review. *Separation and Purification Technology*, **38**, 43-74.
- Guo, B.-L. & Gao, Q.-Y. (2007)** Preparation and properties of a pH/temperature-responsive carboxymethyl chitosan/poly(N-isopropylacrylamide)semi-IPN hydrogel for oral delivery of drugs. *Carbohydrate Research*, **342**, 2416-2422.
- Gupta, V. K. & Suhas (2009)** Application of low-cost adsorbents for dye removal-a review. *Journal of Environmental Management*, **90**, 2313-2342.
- Gupta, B. (2010)** Textile-based smart wound dressings. *Indian Journal of Fibre & Textile Research*, **35**, 174-187.
- Gutierrez, X., Silva, F., Chirinos, M., et al (2002)** Bitumen-in-water emulsions: An overview on formation, stability, and rheological properties. *Journal of Dispersion Science and Technology*, **23**, 405-418.

## -H-

- Haibach, K., Menner, A., Powell, R., et al (2006)** Tailoring mechanical properties of highly porous polymer foams: Silica particle reinforced polymer foams via emulsion templating. *Polymer*, **47**, 4513-4519.
- Hainey, P., Huxham, I. M., Rowatt, B., et al (1991)** Synthesis and ultrastructural studies, of styrene-divinylbenzene polyhipe polymers. *Macromolecules*, **24**, 117-121.
- Hamaker, H. C. (1937)** The London—van der Waals attraction between spherical particles. *Physica*, **4**, 1058-1072.
- Harkins, W. D. & Brown, F. E. (1919)** The determination of surface tension (free surface energy), and the weight of falling drops: The surface tension of water and benzene by the capillary height method. *Journal of American Chemical Society*, **41**, 499-524.
- Harris, R., Lecumberri, E. & Heras, A. (2010)** Chitosan-genipin microspheres for the controlled release of drugs: clarithromycin, tramadol and heparin. *Marine drugs*, **8**, 1750-1762.
- Hinz, C. (2001)** Description of sorption data with isotherm equations. *Geoderma*, **99**, 225-243.
- Ho, Y. S. & McKay, G. (1999)** Pseudo-second order model for sorption processes. *Process Biochemistry*, **34**, 451-465.

**Holmqvist, P., Alexandridis, P. & Lindman, B. (1998)** Modification of the microstructure in block copolymer-water-“oil” systems by varying the copolymer composition and the “oil” type : Small-Angle X-ray Scattering and deuterium-NMR investigation. *Journal of Physical Chemistry B*, **102**, 1149-1158.

**Hu, Z. G., Zhang, J., Chan, W. L., et al (2006)** The sorption of acid dye onto chitosan nanoparticles. *Polymer*, **47**, 5838-5842.

**Ikem, V. O., Menner, A. & Bismarck, A. (2008)** High internal phase emulsions stabilized solely by functionalized silica particles. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, **47**, 8277-8279.

-/-

**Ikem, V. O., Menner, A. & Bismarck, A. (2010)** High-porosity macroporous polymers synthesized from titania-particle-stabilized medium and high internal phase emulsions. *Langmuir*, **26**, 8836-8841.

**Imhof, A. & Pine, D. J. (1997)** Ordered macroporous materials by emulsion templating. *Nature*, **389**, 948-951.

**Indest, T., Laine, J., Ribitsch, V., et al (2008)** Adsorption of chitosan on PET films monitored by quartz crystal microbalance. *Biomacromolecules*, **9**, 2207-2214.

**Israelachvili, J., Mitchell, D. J. & Ninham, B. W. (1975)** Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics*, **72**, 1525-1568.

**Israelachvili, J. (1994)** The science and applications of emulsions - an overview. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **91**, 1-8.

**Ivanova, R., Lindman, B. & Alexandridis, P. (2000)** Evolution in structural polymorphism of Pluronic F127 poly(ethylene oxide) - poly(propylene oxide) block copolymer in ternary systems with water and pharmaceutically acceptable organic solvents : From “glycols” to “oils”. *Langmuir*, **16**, 9058-9069.

-J-

**Job, N., Théry, A., Pirard, R., et al (2005)** Carbon aerogels, cryogels and xerogels: Influence of the drying method on the textural properties of porous carbon materials. *Carbon*, **43**, 2481-2494.

**Jocic, D., Vilchez, S., Topalovic, T., et al (2005a)** Effect of low-temperature plasma and chitosan treatment on wool dyeing with Acid Red 27. *Journal of Applied Polymer Science*, **97**, 2204-2214.

**Jocic, D., Vilchez, S., Topalovic, T., et al (2005b)** Chitosan/acid dye interactions in wool dyeing system. *Carbohydrate Polymers*, **60**, 51-59.

**Jönsson, B., Lindman, B., Holmberg, K., et al (1998a)** *Introduction to surfactants (Capítulo 1)*, en: *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution* (2ª Ed.). West Sussex (UK): John Wiley & Sons, Inc.

**Jönsson, B., Lindman, B., Holmberg, K., et al (1998b)** *Phase behaviour of concentrated surfactant systems (Capítulo 3)*, en: *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution* (2ª Ed.). West Sussex (UK): John Wiley & Sons, Inc.

### -K-

**Kabalnov, A. & Shchukin, E. D. (1992)** Ostwald ripening theory: Applications to fluorocarbon emulsion stability. *Advances in Colloid and Interface Science*, **38**, 69-97.

**Kabalnov, A. & Wennerström, H. (1996)** Macroemulsion stability: The oriented wedge theory revisited. *Langmuir*, **12**, 276-292.

**Kavanagh, G. M. & Ross-Murphy, S. B. (1998)** Rheological characterisation of polymer gels. *Progress in Polymer Science*, **23**, 533-562.

**Kawi, S. & Lai, M. W. (1998)** Supercritical fluid extraction of surfactant template from MCM-41. *Chemical Communications*, 1407-1408.

**Kawi, S. & Lai, M. W. (2002)** Supercritical fluid extraction of surfactant from Si-MCM-41. *AIChE Journal*, **48**, 1572-1580.

**Khrstov, K. & Czarnecki, J. (2010)** Emulsion films stabilized by natural and polymeric surfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **15**, 324-329.

**Kleinbaum, D. G., Kupper, L. L. & Muller, K. E. (1988)** *Applied Regression Analysis and Other Multivariable Methods* (2ª Ed.). Belmont (USA): Duxbury Press.

**Klobes, P., Meyer, K. & Munro, R. G. (2006)** *Porosity and specific surface area measurements for solid materials*. Washington: National Institute of Standards and Technology (NIST).

**Koenker, R. (2005)** *Quantile Regression*. New York (USA): Cambridge University Press.

- Kruskal, W. H. (1957)** Historical notes on the Wilcoxon unpaired two-sample test. *Journal of the American Statistical Association*, **52**, 356-360.
- Kujama, P., Moraille, P., Sánchez, et al (2005)** Effect of molecular weight on the exponential growth and morphology of hyaluronan/chitosan multilayers: A surface Plasmon resonance spectroscopy and atomic force microscopy investigation, *Journal of American Chemical Society*, **127**, 9224-9334.
- Kulkarni, A., Tourrette, A., Warmoeskerken, M. M. C. G., et al (2010)** Microgel-based surface modifying system for stimuli-responsive functional finishing of cotton. *Carbohydrate Polymers*, **82**, 1306-1314.
- Kunieda, H. & Shinoda, K. (1985)** Evaluation of the Hydrophile-Lipophile Balance (HLB) of nonionic surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science*, **107**, 107-121.
- Kunieda, H., Solans, C., Shida, N., et al (1987)** The formation of gel-emulsions in a water/nonionic surfactant/oil system. *Colloids and Surfaces*, **24**, 225-237.
- Kunieda, H., Fukui, Y., Uchiyama, H., et al (1996)** Spontaneous formation of highly concentrated water-in-oil emulsions (Gel-Emulsions). *Langmuir*, **12**, 2136-2140.
- Kunieda, H., Ozawa, K. & Huang, K.-I. (1998)** Effect of oil on the surfactant molecular curvatures in liquid crystals. *Journal of Physical Chemistry B*, **102**, 831-838.
- Kunieda, H., Uddin, H., Furukawa, H., et al (2001)** Phase behavior of a mixture of poly(oxyethylene) - poly(dimethylsiloxane) copolymer and nonionic surfactant in water. *Macromolecules*, **34**, 9093-9099.

-L-

- Ladet, S. G., Tahiri, K., Montembault, a. S., et al (2011)** Multi-membrane chitosan hydrogels as chondrocytic cell bioreactors. *Biomaterials*, **32**, 5354-5364.
- Lagergren, S. (1898)** About the theory of so-called adsorption of soluble substances. *Handlingar*, **24**, 1-39.
- Langenfeld, A., Schmitt, V. & Stébé, M. J. (1999)** Rheological behavior of fluorinated highly concentrated reverse emulsions with temperature. *Journal of Colloid and Interface Science*, **218**, 522-528.
- Larsson, K. (1976)** *Crystal and liquid crystal structures of lipids, en Food Emulsions*. New York: Marcel Dekker.
- Laughlin, R. G. (1994)** *The determination of phase diagrams (Apéndice 4), en: The aqueous phase behavior of surfactants*. London (UK): Academic Press, Inc.

- Leal-Calderon, F. & Schmitt, V. (2008)** Solid-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **13**, 217-227.
- Lee, G. W. J. & Tadros, T. F. (1982)** Formation and stability of emulsions produced by dilution of emulsifiable concentrates. Part III. The coalescence of oil droplets at a planar oil-water interface. *Colloids and Surfaces*, **5**, 129-135.
- Lee, Y. M., Kim, S. H. & Cho, C. S. (1996)** Synthesis and swelling characteristics of pH and thermo-responsive interpenetrating polymer network hydrogel composed of poly(vinyl alcohol) and poly(acrylic acid). *Journal of Applied Polymer Science*, **62**, 301-311.
- Lee, J.-Y., Tan, B. & Cooper, A. I. (2007)** CO<sub>2</sub>-in-water emulsion-templated poly(vinyl alcohol) hydrogels using poly(vinyl acetate)-based surfactants. *Macromolecules*, **40**, 1955-1961.
- Lee, E. S., Oh, Y. T., Youn, Y. S., et al (2011)** Binary mixing of micelles using Pluronics for a nano-sized drug delivery system. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, **82**, 190-195.
- Li, P., Ghosh, A., Wagner, R. F., et al (2005)** Effect of combined use of nonionic surfactant on formation of oil-in-water microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, **288**, 27-34.
- Lifshitz, I. M. & Slyozov, V. V. (1961)** The kinetics of precipitation from supersaturated solid solutions. *Journal of Physical Chemistry Solids*, **19**, 35-50.
- Limousin, G., Gaudet, J. P., Charlet, L., et al (2007)** Sorption isotherms: A review on physical bases, modeling and measurement. *Applied Geochemistry*, **22**, 249-275.
- Lindner, P. & Zemb, T. (1991)** *Neutron, X-Ray and Light Scattering: Introduction to an investigative tool for colloidal and polymeric systems*: North-Holland.
- Lissant, K. J. (1966)** The geometry of high-internal-phase-ratio emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, **22**, 462-468.
- Lowell, S., Shields, J. E., Thomas, M. A., et al (2006a)** *Adsorption Mechanism (Capítulo 4)*, en *Characterization of porous solids and powders: Surface area, pore size and density* (1<sup>a</sup> Ed.). Dordrecht (Netherlands): Kluwer Academic Publishers (Springer).
- Lowell, S., Shields, J. E., Thomas, M. A., et al (2006b)** *Pore size and surface characteristics of porous solids by mercury porosimetry (Capítulo 11)*, en *Characterization of porous solids and powders: Surface area, pore size and density* (1<sup>a</sup> Ed.). Dordrecht (Netherlands): Kluwer Academic Publishers (Springer).

**Lucassen-Reynders, E. H. (1994)** Competitive adsorption of emulsifiers. 1. Theory for adsorption of small and large molecules. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **91**, 79-88.

**Luckham, P. F. & Ukeje, M. A. (1999)** Effect of particle size distribution on the rheology of dispersed systems. *Journal of Colloid and Interface Science*, **220**, 347-356.

**Llinàs, M., Calderó, G., García-Celma, M. J., et al (2013)** New insights on the mechanisms of drug release from highly concentrated emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, **394**, 337-345.

### -M-

**Ma, L. & Barbosa-Cánovas, G. V. (1994)** Rheological characterization of mayonnaise . Part II : Flow and viscoelastic properties at different oil and xanthan gum concentrations. *Journal of Food Engineering*, **25**, 409-425.

**Ma, D., Tu, K. & Zhang, L.-m. (2010)** Bioactive supramolecular hydrogel with controlled dual drug release characteristics. *Biomacromolecules*, **11**, 2204-2212.

**Machado, B. A. S., Pereira, C. G., Nunes, S. B., et al (2013)** Supercritical fluid extraction using CO<sub>2</sub>: Main applications and future perspectives. *Separation Science and Technology*, **48**, 2741-2760.

**Maekawa, H., Esquena, J., Bishop, S., et al (2003)** Meso/Macroporous Inorganic Oxide Monoliths from Polymer Foams. *Advanced Materials*, **15**, 591-596.

**Makai, M., Csányi, E., Németh, Z., et al (2003)** Structure and drug release of lamellar liquid crystals containing glycerol. *International Journal of Pharmaceutics*, **256**, 95-107.

**Malkin, A. Y., Masalova, I., Slatter, P., et al (2004)** Effect of droplet size on the rheological properties of highly-concentrated W/O emulsions. *Rheologica Acta*, **43**, 584-591.

**Mano, J. F. (2008)** Stimuli-Responsive Polymeric Systems for Biomedical Applications. *Advanced Engineering Materials*, **10**, 515-527.

**Marcotte, M., Taherian Hoshahili, A. R. & Ramaswamy, H. S. (2001)** Rheological properties of selected hydrocolloids as a function of concentration and temperature. *Food Research International*, **34**, 695-703.

**Marcus, Y., SenGupta, A. K. & Marinsky, J. A. (2005)** *Applications of supercritical fluid solvents in the pharmaceutical industry, en Ion Exchange and Solvent Extraction*. New York: Marcel Dekker, Inc.

- Marsich, E., Borgogna, M., Donati, I., et al (2007)** Alginate/lactose-modified chitosan hydrogels: A bioactive biomaterial for chondrocyte encapsulation. *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, **84**, 364-376.
- Martínez-Rodríguez, M. (2014)** Tesis doctoral (Universidad de Barcelona): *Formación y caracterización de emulsiones altamente concentradas de betún en agua*.
- Martins, G. V., Mano, J. F. & Alves, N. M. (2010)** Nanostructured self-assembled films containing chitosan fabricated at neutral pH. *Carbohydrate Polymers*, **80**, 570-573.
- Marx, K. A. (2003)** Quartz crystal microbalance: a useful tool for studying thin polymer films and complex biomolecular systems at the solution-surface interface. *Biomacromolecules*, **4**, 1099-1120.
- Masalova, I., Foudazi, R. & Malkin, A. Y. (2011)** The rheology of highly concentrated emulsions stabilized with different surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **375**, 76-86.
- Masmoudi, H., Piccerelle, P., Le Dréau, Y., et al (2006)** A rheological method to evaluate the physical stability of highly viscous pharmaceutical oil-in-water emulsions. *Pharmaceutical Research*, **23**, 1937-1947.
- Mason, T. G., Bibette, J. & Weitz, D. A. (1996)** Yielding and flow of monodisperse emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, **179**, 439-448.
- Matricardi, P., Pontoriero, M., Coviello, T., et al (2008)** In situ cross-linkable novel alginate-dextran methacrylate IPN hydrogels for biomedical applications: mechanical characterization and drug delivery properties. *Biomacromolecules*, **9**, 2014-2020.
- May-Masnou, A., Pasc, A., Stébé, M. J., et al (2013)** Solubilization of decane into gemini surfactant with a modified Jeffamine backbone: Design of hierarchical porous silica. *Microporous and Mesoporous Materials*, **169**, 235-241.
- Mehling, T., Smirnova, I., Guenther, U., et al (2009)** Polysaccharide-based aerogels as drug carriers. *Journal of Non-Crystalline Solids*, **355**, 2472-2479.
- Menner, A., Ikem, V., Salgueiro, M., et al (2007)** High internal phase emulsion templates solely stabilised by functionalised titania nanoparticles. *Chemical Communications*, **41**, 4274-4276.
- Mi, F.-L., Sung, H.-w. & Shyu, S.-S. (2000)** Synthesis and characterization of a novel chitosan-based network prepared using naturally occurring crosslinker. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **38**, 2804-2814.

- Mi, F. L., Shyu, S. S., Wu, Y. B., et al (2001)** Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. *Biomaterials*, **22**, 165-173.
- Mi, F.-L., Shyu, S.-S. & Peng, C.-K. (2005)** Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **43**, 1985-2000.
- Mie, G. (1908)** Beitrage zur Optik trüber Medie, speziell kolloidaler Metallösungen (Contributions on the optics of turbid media, particularly colloidal metal solutions). *Annalen der Physik*, **25**, 377-445.
- Mima, S., Miya, M., Iwamoto, R., et al (1983)** Highly deacetylated chitosan and its properties. *Journal of Applied Polymer Science*, **28**, 1909-1917.
- Miras, J. (2011)** Máster Oficial de Química Avanzada (Universidad de Barcelona): *Emulsiones altamente concentradas como medios de reacción para la obtención de materiales porosos de quitosano*.
- Miras, J., Vilchez, S., Solans, C., et al (2013a)** Chitosan macroporous foams obtained in highly concentrated emulsions as templates. *Journal of Colloid and Interface Science*, **410**, 33-42.
- Miras, J., Vilchez, S., Solans, C., et al (2013b)** Kinetics of chitosan hydrogel formation in high internal phase oil-in-water emulsions (HIPEs) using viscoelastic measurements. *Soft Matter*, **9**, 8678-8686.
- Mitchell, M. N. (2012)** *Interpreting and Visualizing Regression Models Using Stata*. Texas (USA): Stata Press.
- Molina, R., Vilchez, A., Canal, C., et al (2009)** Wetting properties of polystyrene/divinylbenzene crosslinked porous polymers obtained using W/O highly concentrated emulsions as templates. *Surface and Interface Analysis*, **41**, 371-377.
- Moura, M. J., Figueiredo, M. M. & Gil, M. H. (2007)** Rheological study of genipin cross-linked chitosan hydrogels. *Biomacromolecules*, **8**, 3823-3829.
- Mun, S., Decker, E. a. & McClements, D. J. (2005)** Influence of droplet characteristics on the formation of oil-in-water emulsions stabilized by surfactant-chitosan layers. *Langmuir*, **21**, 6228-6234.
- Muzzarelli, R. A. A., Morganti, P., Morganti, G., et al (2007)** Chitin nanofibrils/chitosan glycolate composites as wound medicaments. *Carbohydrate Polymers*, **70**, 274-284.



**Muzzarelli, R. a. a., Greco, F., Busilacchi, A., et al (2012)** Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: A review. *Carbohydrate Polymers*, **89**, 723-739.

### -N-

**Nasr, H. E., Sayyah, S. M., Essa, D. M., et al (2009)** Utilization of acrylates emulsion terpolymer with chitosan as a finishing agent for cotton fabrics. *Carbohydrate Polymers*, **76**, 36-45.

**Nestor, J., Vílchez, A., Solans, C., et al (2013)** Facile synthesis of meso/macroporous dual materials with ordered mesopores using highly concentrated emulsions based on a cubic liquid crystal. *Langmuir*, **29**, 432-440.

**Nishi, C., Nakajima, N. & Ikada, Y. (1995)** In vitro evaluation of cytotoxicity of diepoxy compounds used for biomaterial modification. *Journal of biomedical materials research*, **29**, 829-834.

### -O-

**Oh, S. H., Kang, S. G., Kim, E. S., et al (2003)** Fabrication and characterization of hydrophilic poly(lactic-co-glycolic acid)/poly(vinyl alcohol) blend cell scaffolds by melt-molding particulate-leaching method. *Biomaterials*, **24**, 4011-4021.

**Oh, B. H. L., Bismarck, A. & Chan-Park, M. B. (2014)** High internal phase emulsion templating with self-emulsifying and thermoresponsive chitosan-graft-PNIPAM-graft-Oligoproline. *Biomacromolecules*, **15**, 1777-1787.

**Ozawa, K., Solans, C. & Kunieda, H. (1997)** Spontaneous formation of highly concentrated oil-in-water emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, **188**, 275-281.

### -P-

**Pääkkö, M., Vapaavuori, J., Silvennoinen, R., et al (2008)** Long and entangled native cellulose I nanofibers allow flexible aerogels and hierarchically porous templates for functionalities. *Soft Matter*, **4**, 2492-2499.

**Pal, R. (1996)** Effect of droplet size on the rheology of emulsions. *AIChE Journal*, **42**, 3181-3190.

- Pal, R. (1997)** Dynamics of flocculated emulsions. *Chemical Engineering Science*, **52**, 1177-1187.
- Pal, R. (1999)** Yield stress and viscoelastic properties of high internal phase ratio emulsions. *Colloid & Polymer Science*, **277**, 583-588.
- Pal, R. (2006)** Rheology of high internal phase ratio emulsions. *Food Hydrocolloids*, **20**, 997-1005.
- Palocci, C., Barbetta, A., Grotta, A. L., et al (2007)** Porous biomaterials obtained using supercritical CO<sub>2</sub>-water emulsions. *Langmuir*, **23**, 8243-8251.
- Partap, S., Rehman, I., Jones, J. R., et al (2006)** Supercritical carbon dioxide in water emulsion-templated synthesis of porous calcium alginate hydrogels. *Advanced Materials*, **18**, 501-504.
- Pastor, E., Matveeva, E., Valle-Gallego, A., et al (2011)** Protein delivery based on uncoated and chitosan-coated mesoporous silicon microparticles. *Colloids and Surfaces. B: Biointerfaces*, **88**, 601-609.
- Peña, D. (2002)** *Regresión y diseño de experimentos*. Madrid (España): Alianza Editorial.
- Pepić, I., Filipović-Grčić, J. & Jalšenjak, I. (2008)** Interactions in a nonionic surfactant and chitosan mixtures. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **327**, 95-102.
- Peppas, N. A., Keys, K. B., Torres-Lugo, M., et al (1999)** Poly(ethylene glycol)-containing hydrogels in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, **62**, 81-87.
- Pickering, S. U. (1907)** CXCVI.-Emulsions. *Journal of Chemical Society*, **91**, 2001-2021.
- Pinotti, A., Bevilacqua, A. & Zaritzky, N. (2001)** Comparison of the performance of chitosan and a cationic polyacrylamide as flocculants of emulsion systems. *Journal of Surfactants and Detergents*, **4**, 57-63.
- Pirard, R., Blacher, S., Brouers, F., et al (1995)** Interpretation of mercury porosimetry applied to aerogels. *Journal of Materials Research*, **10**, 2114-2119.
- Pons, R., Carrera, I., Erra, P., et al (1994)** Novel preparation methods for highly concentrated water-in-oil emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **91**, 259-266.
- Pons, R., Solans, C. & Tadros, T. F. (1995)** Rheological behavior of highly concentrated oil-in-water (O/W) emulsions. *Langmuir*, **11**, 1966-1971.

**Pratt, D. Y., Wilson, L. D. & Kozinski, J. a. (2013)** Preparation and sorption studies of glutaraldehyde cross-linked chitosan copolymers. *Journal of Colloid and Interface Science*, **395**, 205-211.

**Princen, H. M. (1979)** Highly concentrated emulsions. I. Cylindrical emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, **71**, 55-66.

**Princen, H. M. (1983)** Rheology of foams and highly concentrated emulsions I. Elastic properties and yield stress of a cylindrical model system. *Journal of Colloid and Interface Science*, **91**, 160-175.

**Princen, H. M. (1985)** Rheology of foams and highly concentrated emulsions. II. Experimental study of the yield stress and wall effects for concentrated oil-in-water emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, **105**, 150-171.

**Princen, H. M. & Kiss, A. D. (1986)** Rheology of foams and highly concentrated emulsions. III. Static shear modulus. *Journal of Colloid and Interface Science*, **112**, 427-437.

### -Q-

**Qian, L., Ahmed, A., Foster, A., et al (2009)** Systematic tuning of pore morphologies and pore volumes in macroporous materials by freezing. *Journal of Materials Chemistry*, **19**, 5212-5219.

**Qian, L. & Zhang, H. (2013)** One-step synthesis of protein-encapsulated microspheres in a porous scaffold by freeze-drying double emulsions and tuneable protein release. *Chemical communications*, **49**, 8833-8835.

**Quignard, F., Valentin, R. & Di Renzo, F. (2008)** Aerogel materials from marine polysaccharides. *New Journal of Chemistry*, **32**, 1300-1310.

### -R-

**Ramsden, W. (1903)** Separation of solids in the surface-layers of solutions and "suspensions" (Observations on surface-membranes, bubbles, emulsions, and mechanical coagulation).-Preliminary account. *Proceedings of the Royal Society of London*, **72**, 156-164.

**Ravi Kumar, M. N. V., Muzzarelli, R. A. A., Muzzarelli, C., et al (2004)** Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. *Chemical reviews*, **104**, 6017-6084.

- Remuñan-López, C. & Bodmeier, R. (1997)** Mechanical , water uptake and permeability properties of crosslinked chitosan glutamate and alginate films. *Journal of Controlled Release*, **44**, 215-225.
- Rinaudo, M., Pavlov, G. & Desbrières, J. (1999)** Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polymer*, **40**, 7029-7032.
- Rinaudo, M. (2006)** Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, **31**, 603-632.
- Rinaudo, M. (2008)** Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International*, **57**, 397-430.
- Robitzer, M., Tourrette, A., Horga, R., et al (2011)** Nitrogen sorption as a tool for the characterisation of polysaccharide aerogels. *Carbohydrate Polymers*, **85**, 44-53.
- Rodríguez-Abreu, C., García-Roman, M. & Kunieda, H. (2004)** Rheology and dynamics of micellar cubic phases and related emulsions. *Langmuir*, **20**, 5235-5240.
- Rodríguez-Abreu, C. & Lazzari, M. (2008)** Emulsions with structured continuous phases. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **13**, 198-205.
- Rosen, M. J. (1978)** *Characteristic Features of Surfactants (Capítulo 1)*, en: *Surfactants and Interfacial Phenomena*. USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Rosen, M. J. (2004)** *Reduction of surface and interfacial tension by surfactants (Capítulo 5) en Surfactants and Interfacial Phenomena (3ª Ed.)*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Ruckenstein, E. & Park, J. S. (1988)** Hydrophilic-hydrophobic polymer composites. *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Letters*, **26**, 529-536.
- Ruckenstein, E., Ebert, G. & Platz, G. (1989)** Phase behavior and stability of concentrated emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, **133**, 432-441.
- Ruckenstein, E. & Park, J. S. (1992)** Stable concentrated emulsions as precursors for hydrophilic-hydrophobic polymer composites. *Polymer*, **33**, 405-417.

-S-

- Santamaría, E., Cortés, M., Maestro, A., et al (2012)** Micro-, Meso-, and Macroporous Materials Obtained from a Highly Concentrated Emulsion of Decane/Brij 35/Water and Decane/Brij 700/Water. *Chemistry Letters*, **41**, 1041-1043.

- Santamaría, E., Maestro, A., Porras, M., et al (2014)** Preparation of structured meso-macroporous silica materials: influence of composition variables on material characteristics. *Journal of Porous Materials*, **21**, 263-274.
- Santos, O. D. H., Morais, J. M., Andrade, F. F., et al (2011)** Development of vegetable oil emulsions with lamellar liquid-crystalline structures. *Journal of Dispersion Science and Technology*, **32**, 433-438.
- Sarazin, P., Roy, X. & Favis, B. D. (2004)** Controlled preparation and properties of porous poly(L-lactide) obtained from a co-continuous blend of two biodegradable polymers. *Biomaterials*, **25**, 5965-5978.
- Sarkar, B., Lakshmi, J. & Alexandridis, P. (2012)** Self-assembly of amphiphilic block copolymers in ternary solvent mixtures: Lyotropic liquid crystalline phase behavior and structure. *Macromolecular Chemistry and Physics*, **213**, 2514-2528.
- Sauerbrey, G. (1959)** Verwendung von schwingquarzen zur Wägung dünner schichten und zur mikrowägung. *Zeitschrift für Physik*, **155**, 206-222.
- Saulnier, P., Anton, N., Heurtault, B., et al (2008)** Liquid crystals and emulsions in the formulation of drug carriers. *Comptes Rendus Chimie*, **11**, 221-228.
- Savic, S., Lukic, M., Jaksic, I., et al (2011)** An alkyl polyglucoside-mixed emulsifier as stabilizer of emulsion systems: the influence of colloidal structure on emulsions skin hydration potential. *Journal of Colloid and Interface Science*, **358**, 182-191.
- Scherer, G. W., Smith, D. M. & Stein, D. (1995)** Deformation of aerogels during characterization. *Journal of Non-Crystalline Solids*, **186**, 309-315.
- Schulz, P. C., Rodríguez, M. S., Del Blanco, L. F., et al (1998)** Emulsification properties of chitosan. *Colloid and Polymer Science*, **276**, 1159-1165.
- Shahidi, F., Arachchi, J. K. V. & Jeon, Y.-J. (1999)** Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science & Technology*, **10**, 37-51.
- Sharma, S. C., Kunieda, H., Esquena, J., et al (2006)** Phase behavior and preparation of mesoporous silica in aqueous mixtures of fluorinated surfactant and hydrophobic fluorinated polymer. *Journal of Colloid and Interface Science*, **299**, 297-304.
- Shashidhara, Y. M. & Jayaram, S. R. (2010)** Vegetable oils as a potential cutting fluid—An evolution. *Tribology International*, **43**, 1073-1081.
- Shinoda, K. & Arai, H. (1964)** The correlation between phase inversion temperature in emulsion and cloud point in solution of nonionic emulsifier. *The Journal of Physical Chemistry*, **68**, 3485-3490.

- Shinoda, K. & Arai, H. (1967)** The effect of phase volume on the phase inversion temperature of emulsions stabilized with nonionic surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science*, **25**, 429-431.
- Shinoda, K. & Saito, H. (1969)** The Stability of O/W type emulsions as functions of temperature and the HLB of emulsifiers: The emulsification by PIT-method. *Journal of Colloid and Interface Science*, **30**, 258-263.
- Siddig, M. A., Radiman, S., Jan, L. S., et al (2006)** Rheological behaviours of the hexagonal and lamellar phases of glucopone (APG) surfactant. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **276**, 15-21.
- Simes, R. J. (1986)** An improved Bonferroni procedure for multiple tests of significance. *Biometrika*, **73**, 751-754.
- Sing, K. S. W., Everett, D. H., Haul, R. A. W., et al (1985)** Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity. *Pure & Applied Chemistry*, **57**, 603-619.
- Sjöblom, J., Aske, N., Harald, I., et al (2003)** Our current understanding of water-in-crude oil Recent characterization techniques and high pressure performance. *Advances in Colloid and Interface Science*, **100-102**, 399-473.
- Sohm, R. & Tadros, T. F. (1989)** Viscoelastic properties of sodium montmorillonite (Gelwhite H) suspensions. *Journal of Colloid and Interface Science*, **132**, 62-71.
- Solans, C., Esquena, J. & Azemar, N. (2003)** Highly concentrated (gel) emulsions, versatile reaction media. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **8**, 156-163.
- Solans, C., Esquena, J., Azemar, N., et al (2004)** *Highly concentrated (gel) emulsions: Formation and properties (Capítulo 13)*, en: *Emulsions: Structure, Stability and Interactions*. USA: Academic Press, Inc.
- Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., et al (2005)** Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **10**, 102-110.
- Solans, C. & Solé, I. (2012)** Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **17**, 246-254.
- Solè, I., Maestro, A., González, C., et al (2006)** Optimization of nano-emulsion preparation by low-energy methods in an ionic surfactant system. *Langmuir*, **22**, 8326-8332.
- Srinivasan, A. & Viraraghavan, T. (2010)** Decolorization of dye wastewaters by biosorbents: a review. *Journal of environmental management*, **91**, 1915-1929.
- STATA: Release 12.** Statistical Software. College Station, TX: StataCorp (2011).

**Stokes, G. G. (1851)** On the effects of the internal friction of fluids on the motion of pendulums. *Transactions of the Cambridge Philosophical Society*, **9**, 1-86.

**Stulzer, H. K., Tagliari, M. P., Parize, A. L., et al (2009)** Evaluation of cross-linked chitosan microparticles containing acyclovir obtained by spray-drying. *Materials Science and Engineering: C*, **29**, 387-392.

**Sun, C., Gunasekaran, S. & Richards, M. P. (2007)** Effect of xanthan gum on physicochemical properties of whey protein isolate stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, **21**, 555-564.

### -T-

**Tadros, T. F. & Vincent, B. (1983)** *Emulsion stability (Capítulo 3) en Encyclopedia of Emulsion Technology. Volume 1. Basic theory* (1ª Ed. edn). New York: Marcel Dekker, Inc.

**Tadros, T. F. (1990)** Use of viscoelastic measurements in studying interactions in concentrated dispersions. *Langmuir*, **6**, 28-35.

**Tadros, T. F. (1994)** Fundamental principles of emulsion rheology and their applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **91**, 39-55.

**Tadros, T. (2004a)** Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, **108-109**, 227-258.

**Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., et al (2004b)** Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, **108-109**, 303-318.

**Tadros, T. F., Vandamme, A., Leveck, B., et al (2004c)** Stabilization of emulsions using polymeric surfactants based on inulin. *Advances in Colloid and Interface Science*, **108-109**, 207-226.

**Tadros, T. (2009a)** Polymeric surfactants in disperse systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, **147-148**, 281-299.

**Tadros, T. F. (2009b)** *Emulsion Science and Technology: A General Introduction (Capítulo 1)*, en: *Emulsion Science and Technology*. Weinheim (Alemania): Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

**Tadros, T. F. (2010a)** *Rheology of emulsions (Capítulo 6), en: Rheology of Dispersions. Principles and applications.* Weinheim (Alemania): Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

**Tadros, T. F. (2010b)** *Use of rheological measurements for assesment and prediction of the long-term physical stability of formulations (Capítulo 8), en: Rheology of dispersions: Principles and applications.* Weinheim (Alemania): Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

**Tamilvanan, S. (2004)** Oil-in-water lipid emulsions: implications for parenteral and ocular delivering systems. *Progress in Lipid Research*, **43**, 489-533.

**Tamon, H., Ishizaka, H., Yamamoto, T., et al (2000)** Influence of freeze-drying conditions on the mesoporosity of organic gels as carbon precursors. *Carbon*, **38**, 1099-1105.

**Testouri, A., Honorez, C., Barillec, A., et al (2010)** Highly structured foams from chitosan gels. *Macromolecules*, **43**, 6166-6173.

**Thompson, W. T. (1871)** On the equilibrium of vapour at a curved surface of liquid. *Philisophical Magazine*, **42**, 448-452.

**Topuz, F. & Okay, O. (2009)** Formation of hydrogels by simultaneous denaturation and cross-linking of DNA. *Biomacromolecules*, **10**, 2652-2661.

## -U-

**Ungureanu, S., Birot, M., Laurent, G., et al (2007)** One-pot syntheses of the first series of emulsion based hierarchical hybrid organic-inorganic open-cell monoliths possessing tunable functionality (Organo - Si(HIPE) series). *Chemistry of Materials*, **19**, 5786-5796.

## -V-

**Van den Tempel (1960)** The function of stabilizers during emulsification. *Proceedings of Third International Congress of Surface Activity*, **2**, 573-573.

**Van Grieken, R., Calleja, G., Stucky, G. D., et al (2003)** Supercritical fluid extraction of a nonionic surfactant template from SBA-15 materials and consequences on the porous structure. *Langmuir*, **19**, 3966-3973.



- Vilasau, J., Solans, C., Gómez, M. J., et al (2011)** Influence of a mixed ionic/nonionic surfactant system and the emulsification process on the properties of paraffin emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **392**, 38-44.
- Vílchez, A., Rodríguez-Abreu, C., Esquena, J., et al (2011)** Macroporous polymers obtained in highly concentrated emulsions stabilized solely with magnetic nanoparticles. *Langmuir*, **27**, 13342-13352.
- Vílchez, A., Rodríguez-Abreu, C., Menner, A., et al (2014)** Antagonistic effects between magnetite nanoparticles and a hydrophobic surfactant in highly concentrated pickering emulsions. *Langmuir*, **30**, 5064-5074.
- Vílchez, S., Manich, A., Jovancic, P., et al (2008)** Chitosan contribution on wool treatments with enzyme. *Carbohydrate Polymers*, **71**, 515-523.
- Vílchez, S., Simitier, V., Porras, M., et al (2009)** Chitosan hydrogels covalently crosslinked with a natural reagent. *Tenside, Surfactants, Detergents*, **46**, 13-17.
- Von Smouchowski, M. (1906)** Zur kinetischen theorie der brownschen molekularbewegung und der suspensionen. *Annalen der Physik*, **14**, 756-780.

### -W-

- Wagner, C. (1961)** Theorie der Alterung von Niederschlägen durch Umlösen: Ostwald-Reifung (Theory of the aging of precipitates by dissolution-reprecipitation: Ostwald ripening). *Zeitschrift für Elektrochemie*, **65**, 581-591.
- Walstra, P. (1983)** *Formation of emulsions (Capítulo 2), en Encyclopedia of Emulsion Technology. Volume 1. Basic theory (1ª Ed.)*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Walstra, P. & Smulders, P. E. A. (1998)** *Emulsion formation (Capítulo 2), en: Modern Aspects of Emulsion Formation*. Cambridge (UK): The Royal Society of Chemistry.
- Wanka, G., Hoffmann, H. & Ulbricht, W. (1994)** Phase diagrams and aggregation behavior of poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene)-poly(oxyethylene) triblock copolymers in aqueous solutions. *Macromolecules*, **27**, 4145-4159.
- Weers, J. G. (1998)** *Molecular diffusion in emulsion and emulsion mixtures (Capítulo 9), en Modern Aspects of Emulsion Science (1ª Ed.)*. New York: The Royal Society of Chemistry.

- Weng, L., Chen, X. & Chen, W. (2007)** Rheological characterization of in situ crosslinkable hydrogels formulated from oxidized dextran and N-carboxyethyl chitosan. *Biomacromolecules*, **8**, 1109-1115.
- Whitesides, T. H. & Ross, D. S. (1995)** Experimental and theoretical analysis of the limited coalescence process: Stepwise limited coalescence. *Journal of Colloid and Interface Science*, **169**, 48-59.
- Wilcoxon, F. (1945)** Individual comparisons by ranking method. *Biometrics Bulletin*, **1**, 80-83.
- Wilde, P., Mackie, A., Husband, F., et al (2004)** Proteins and emulsifiers at liquid interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, **108-109**, 63-71.
- Williams, J. M. & Wroblewski, D. A. (1988)** Spatial distribution of the phases in water-in-oil emulsions. Open and closed microcellular foams from cross-linked polystyrene. *Langmuir*, **4**, 656-662.
- Woignier, T., Duffours, L., Beurroies, I., et al (1997)** Plasticity in aerogels. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, **8**, 789-794.
- Wong, Y. C., Szeto, Y. S., Cheung, W. H., et al (2003)** Equilibrium studies for acid dye adsorption onto chitosan. *Langmuir*, **19**, 7888-7894.
- Wong, L. L. C., Ikem, V. O., Menner, A., et al (2011)** Macroporous polymers with hierarchical pore structure from emulsion templates stabilised by both particles and surfactants. *Macromolecular rapid communications*, 1563-1568.
- Wong, L. L. C., Villafranca, P. M. B., Menner, A., et al (2013)** Hierarchical polymerized high internal phase emulsions synthesized from surfactant-stabilized emulsion templates. *Langmuir*, **29**, 5952-5961.
- Wong, L. L. C., Barg, S., Menner, A., et al (2014)** Macroporous polymer nanocomposites synthesised from high internal phase emulsion templates stabilised by reduced graphene oxide. *Polymer*, **55**, 395-402.

-Y-

- Yi, H., Wu, L.-Q., Bentley, W. E., et al (2005)** Biofabrication with chitosan. *Biomacromolecules*, **6**, 2881-2894.
- Yin, L., Fei, L., Cui, F., et al (2007)** Superporous hydrogels containing poly(acrylic acid-co-acrylamide)/O-carboxymethyl chitosan interpenetrating polymer networks. *Biomaterials*, **28**, 1258-1266.

**-Z-**

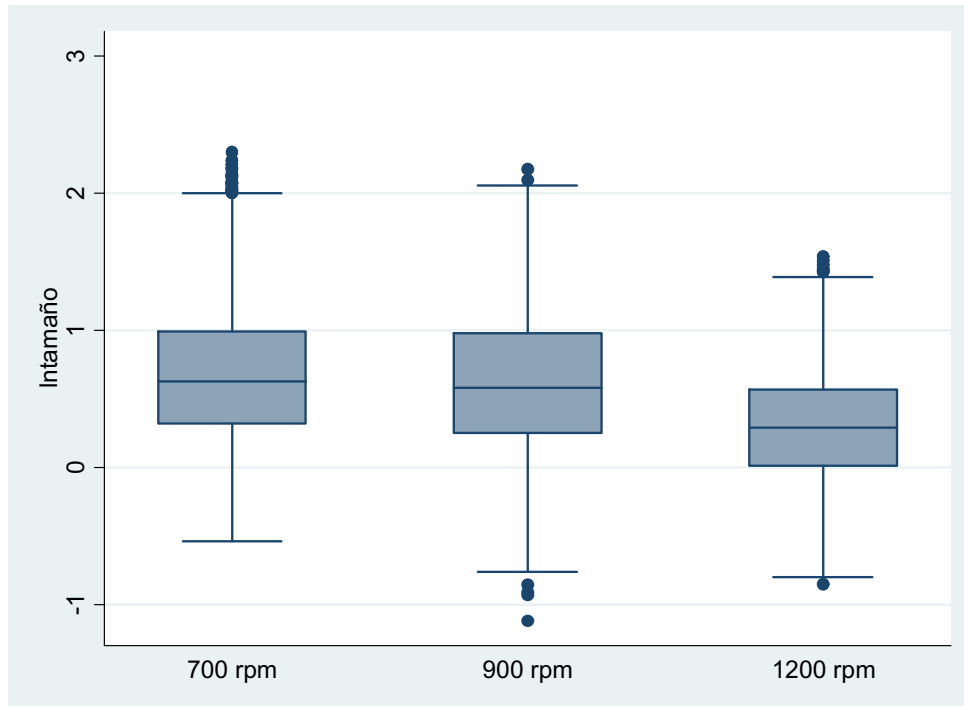
- Zhang, H., Hardy, G. C., Khimyak, Y. Z., et al (2004)** Synthesis of hierarchically porous silica and metal oxide beads using emulsion-templated polymer scaffolds. *Chemistry of Materials*, **16**, 4245-4256.
- Zhang, S. & Chen, J. (2007)** Synthesis of open porous emulsion-templated monoliths using cetyltrimethylammonium bromide. *Polymer*, **48**, 3021-3025.
- Zhou, H. Y., Zhang, Y. P., Zhang, W. F., et al (2011)** Biocompatibility and characteristics of injectable chitosan-based thermosensitive hydrogel for drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, **83**, 1643-1651.
- Zhou, S., Bismarck, A. & Steinke, J. H. G. (2012a)** Interconnected macroporous glycidyl methacrylate-grafted dextran hydrogels synthesised from hydroxyapatite nanoparticle stabilised high internal phase emulsion templates. *Journal of Materials Chemistry*, **22**, 18824-18824.
- Zhou, S., Bismarck, A. & Steinke, J. H. G. (2012b)** Thermoresponsive macroporous scaffolds prepared by emulsion templating. *Macromolecular rapid communications*, **33**, 1833-1839.
- Zhou, S., Bismarck, A. & Steinke, J. H. G. (2013)** Ion-responsive alginate based macroporous injectable hydrogel scaffolds prepared by emulsion templating. *Journal of Materials Chemistry B*, **1**, 4736-4736.

*Capítulo 8*  
**Anexos**

---



## 8.1 TEST DE WILCOXON Y KRUSKAL-WALLIS (Diámetro de gota: Análisis estadístico para los sistemas Solución ácido acético / Solución reguladora de fosfatos / Synperonic A7 / Decano y Quitosano / Solución reguladora de fosfatos / Synperonic A7 / Decano)



**Figura 8.1** Distribución del logaritmo neperiano del diámetro de gota para EAC1 y EAC2 en función de la velocidad de agitación: 700, 900 y 1200 rpm.

**Kruskal-Wallis** equality-of-populations rank test

```

+-----+
| rpm | Obs | Rank Sum |
+-----+-----+
| 700 rpm | 5503 | 6.49e+07 |
| 900 rpm | 7200 | 7.93e+07 |
| 1200 rpm | 7200 | 5.38e+07 |
+-----+
chi-squared = 2149.343 with 2 d.f.
probability = 0.0001
chi-squared with ties = 2149.344 with 2 d.f.
probability = 0.0001

```

**Se comparan 2 a 2 las velocidades con el contraste de la Suma de Rangos de Wilcoxon**

**\* Comparación 700 rpm con 900 rpm**

```

rpm |      obs   rank sum   expected
-----+-----
700 rpm |      5503   36412306   34955056
900 rpm |      7200   44277150   45734400
-----+-----
combined |     12703   80689456   80689456
unadjusted variance   4.195e+10
adjustment for ties   -22629.986
-----
adjusted variance     4.195e+10
Ho: lntamaño(rpm==700 rpm) = lntamaño(rpm==900 rpm)
      z = 7.115
      Prob > |z| = 0.0000
    
```

**. \* Comparación 700 rpm con 1200 rpm**

```

rpm |      obs   rank sum   expected
-----+-----
700 rpm |      5503   43658155   34955056
1200 rpm |      7200   37031301   45734400
-----+-----
combined |     12703   80689456   80689456
unadjusted variance   4.195e+10
adjustment for ties   -43643.711
-----
adjusted variance     4.195e+10
Ho: lntamaño(rpm==700 rpm) = lntamaño(rpm==1200 rpm)
      z = 42.494
      Prob > |z| = 0.0000
    
```

**. \* Comparación 900 rpm con 1200 rpm**

```

rpm |      obs   rank sum   expected
-----+-----
900 rpm |      7200   60952384   51843600
1200 rpm |      7200   42734817   51843600
-----+-----
combined |     14400   1.037e+08   1.037e+08
unadjusted variance   6.221e+10
adjustment for ties   -71721.231
-----
adjusted variance     6.221e+10
Ho: lntamaño(rpm==900 rpm) = lntamaño(rpm==1200 rpm)
      z = 36.519
      Prob > |z| = 0.0000
    
```

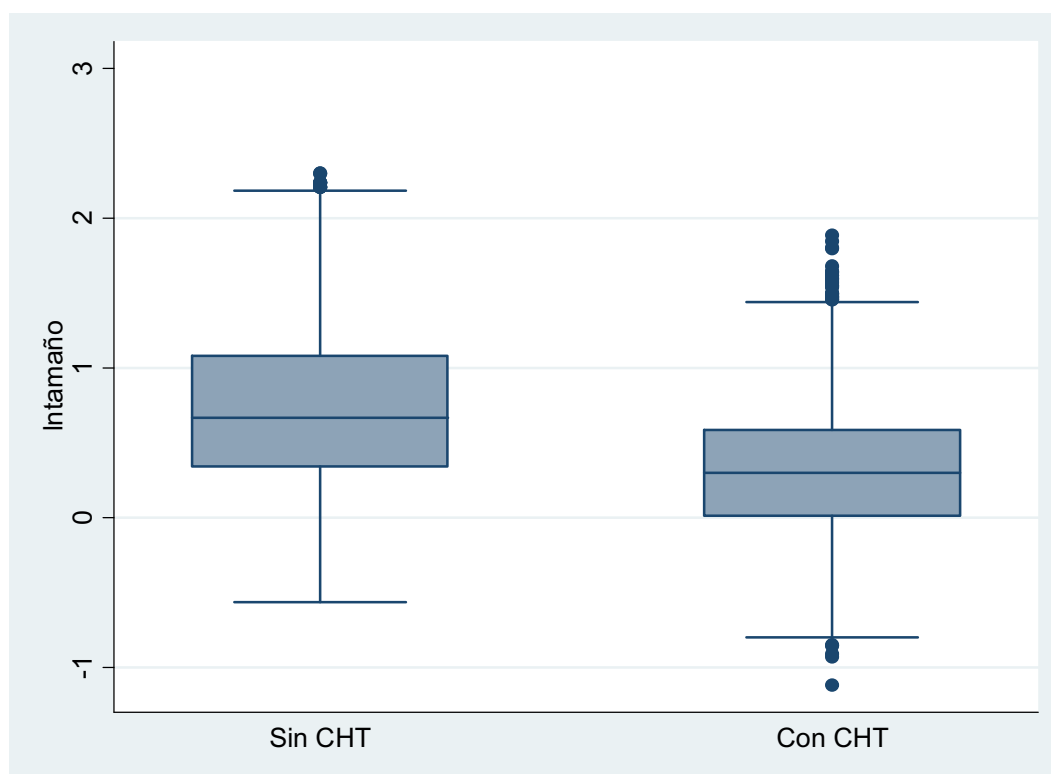
**Comparaciones Múltiples: False Discovery Rate (FDR)**

Method: simes  
 Uncorrected overall critical P-value: .05  
 Number of P-values: 3  
 Corrected overall critical P-value: .05  
 Number of rejected P-values: 3

```

+-----+
| compar~n      pvalor   posicion   alfa_cr~l   pvalor~o   rechaz~0 |
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1. | 700_900      1.12e-12      3          .05          .05          1 |
2. | 700_1200      0                1          .01666667    .05          1 |
3. | 900_1200      0                2          .03333333    .05          1 |
+-----+-----+-----+-----+-----+
    
```

. \* Comparación del ln(tamaño) para CHT(sin/con)

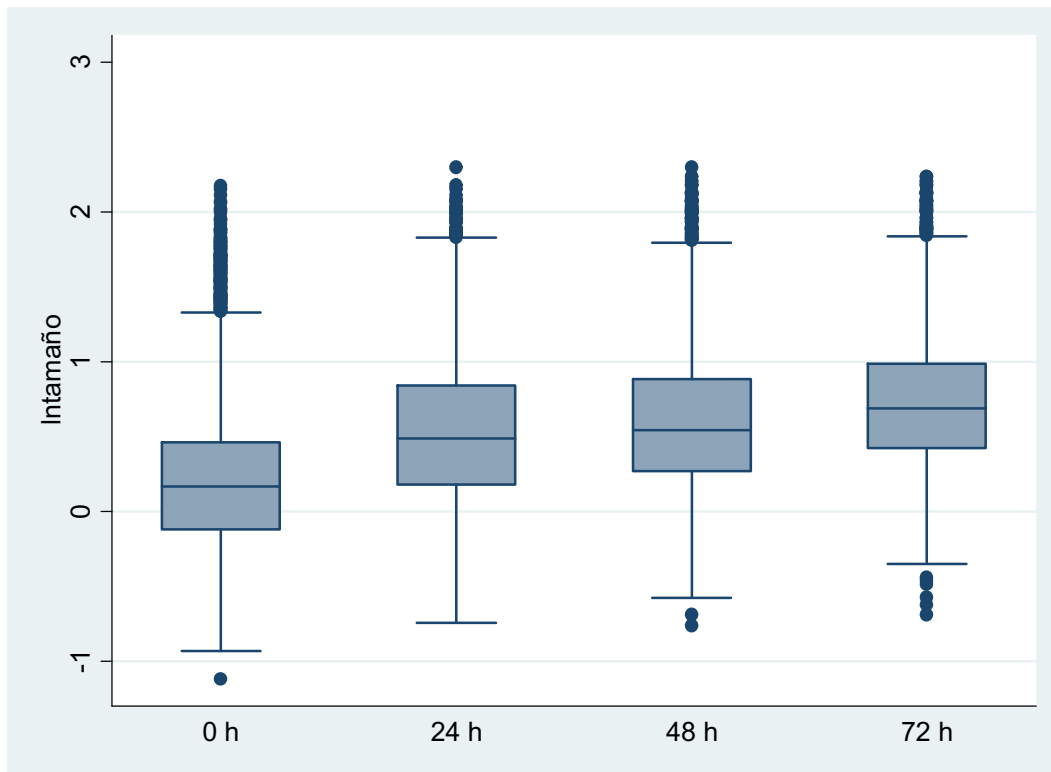


**Figura 8.2** Distribución del logaritmo neperiano del diámetro de gota en ausencia (EAC1) y presencia (EAC2) de quitosano.

```
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
-----+-----+-----+-----
      CHT |      obs   rank sum   expected
-----+-----+-----+-----
    Sin CHT |    10453   1.269e+08   1.040e+08
    Con CHT |     9450   71214337   94046400
-----+-----+-----+-----
    combined |    19903   1.981e+08   1.981e+08
unadjusted variance  1.638e+11
adjustment for ties  -119510.74
-----+-----+-----+-----
adjusted variance    1.638e+11
Ho: lntamaño(CHT==Sin CHT) = lntamaño(CHT==Con CHT)
      z = 56.407
    Prob > |z| = 0.0000
```



. \* Comparación del ln(tamaño) para Tiempo (0/24/48/72 horas)



**Figura 8.3** Distribución del logaritmo neperiano del diámetro de gota para EAC1 y EAC2 en función del tiempo: 0, 24, 48 y 72 h.

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test

Tiempo	Obs	Rank Sum
0 h	5092	3.25e+07
24 h	4940	4.99e+07
48 h	4951	5.39e+07
72 h	4920	6.17e+07

chi-squared = 3095.028 with 3 d.f.  
 probability = 0.0001  
 chi-squared with ties = 3095.031 with 3 d.f.  
 probability = 0.0001

Se comparan 2 a 2 los Tiempos con el contraste de la Suma de Rangos de Wilcoxon (6 comparaciones)

. \* Comparación 0h con 24 horas

Tiempo	obs	rank sum	expected
0 h	5092	20737878	25544018
24 h	4940	29587650	24781510
combined	10032	50325528	50325528

unadjusted variance 2.103e+10  
 adjustment for ties -21860.785  
 -----  
 adjusted variance 2.103e+10  
 Ho: ln(tamaño(Tiempo==0 h)) = ln(tamaño(Tiempo==24 h))  
 z = -33.141  
 Prob > |z| = 0.0000

. \* Comparación 0h con 48 horas

Tiempo	obs	rank sum	expected
0 h	5092	19801596	25572024
48 h	4951	30634350	24863922
combined	10043	50435946	50435946
unadjusted variance	2.110e+10		
adjustment for ties	-19640.709		
adjusted variance	2.110e+10		

Ho:  $\text{Intamaño}(\text{Tiempo}=0 \text{ h}) = \text{Intamaño}(\text{Tiempo}=48 \text{ h})$   
 $z = -39.724$   
 Prob >  $|z| = 0.0000$

. \* Comparación 0h con 72 horas

Tiempo	obs	rank sum	expected
0 h	5092	17924682	25493098
72 h	4920	32200397	24631980
combined	10012	50125078	50125078
unadjusted variance	2.090e+10		
adjustment for ties	-16495.028		
adjusted variance	2.090e+10		

Ho:  $\text{Intamaño}(\text{Tiempo}=0 \text{ h}) = \text{Intamaño}(\text{Tiempo}=72 \text{ h})$   
 $z = -52.346$   
 Prob >  $|z| = 0.0000$

. \* Comparación 24h con 48 horas

Tiempo	obs	rank sum	expected
24 h	4940	23453167	24433240
48 h	4951	25467719	24487646
combined	9891	48920886	48920886
unadjusted variance	2.016e+10		
adjustment for ties	-20683.191		
adjusted variance	2.016e+10		

Ho:  $\text{Intamaño}(\text{Tiempo}=24 \text{ h}) = \text{Intamaño}(\text{Tiempo}=48 \text{ h})$   
 $z = -6.902$   
 Prob >  $|z| = 0.0000$

. \* Comparación 24h con 72 horas

Tiempo	obs	rank sum	expected
24 h	4940	21306265	24356670
72 h	4920	27308466	24258060
combined	9860	48614730	48614730
unadjusted variance	1.997e+10		
adjustment for ties	-19941.19		
adjusted variance	1.997e+10		

Ho:  $\text{Intamaño}(\text{Tiempo}=24 \text{ h}) = \text{Intamaño}(\text{Tiempo}=72 \text{ h})$   
 $z = -21.584$   
 Prob >  $|z| = 0.0000$

```

. * Comparación 48h con 72 horas
-----+-----
      Tiempo |      obs      rank sum      expected
-----+-----
      48 h |      4951      22293948      24438136
      72 h |      4920      26429309      24285120
-----+-----
      combined |      9871      48723256      48723256
unadjusted variance      2.004e+10
adjustment for ties      -19714.553
-----+-----
adjusted variance      2.004e+10
Ho: lntamaño(Tiempo==48 h) = lntamaño(Tiempo==72 h)
      z = -15.147
      Prob > |z| =      0.0000

```

**Comparaciones Múltiples: False Discovery Rate (FDR)**

```

Method: simes
Uncorrected overall critical P-value: .05
Number of P-values: 6
Corrected overall critical P-value: .05
Number of rejected P-values: 6

```

	compar~n	pvalor	posicion	alfa_cr~l	pvalor~o	rechaz~0
1.	T0_24	0	1	.00833333	.05	1
2.	T0_48	0	2	.01666667	.05	1
3.	T0_72	0	3	.025	.05	1
4.	T24_48	5.12e-12	6	.05	.05	1
5.	T24_72	0	4	.03333333	.05	1
6.	T48_72	0	5	.04166667	.05	1

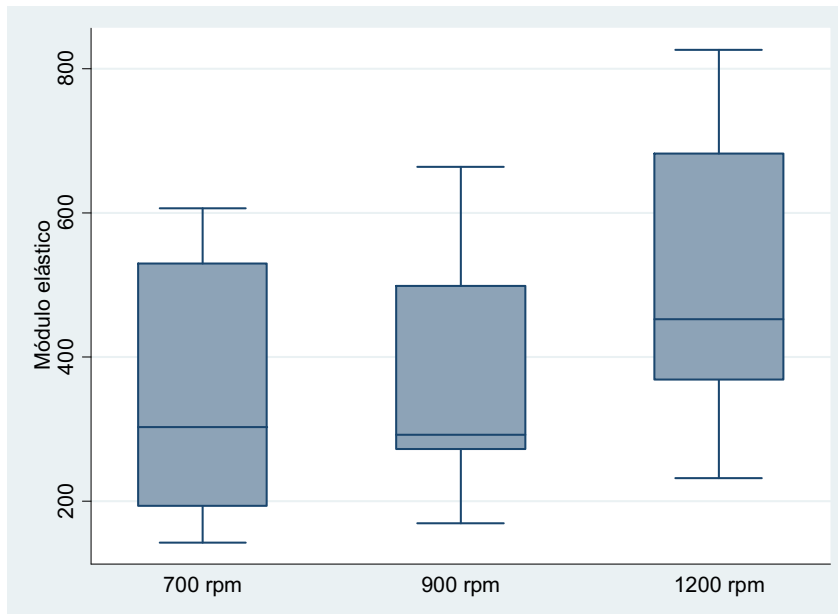
## 8.2 MODELO DE REGRESIÓN LINEAL MÚLTIPLE (Diámetro de gota: Análisis estadístico para los sistemas Solución ácido acético / Solución reguladora de fosfatos / Synperonic A7 / Decano y Quitosano / Solución reguladora de fosfatos / Synperonic A7 / Decano)

**Tabla 8.1** Coeficientes del modelo de regresión lineal múltiple con los tres factores (presencia de quitosano, velocidad de agitación y tiempo) y todas sus interacciones de segundo y tercer orden.

ln(tamaño)	Coefficiente	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval.]	
<b>900 rpm</b>	-0,4649	0,0179	-25,9	0,000	-0,5000	-0,4297
<b>1200 rpm</b>	-0,6616	0,0179	-36,9	0,000	-0,6968	-0,6265
<b>siCHT</b>	-0,6503	0,0188	-34,6	0,000	-0,6872	-0,6134
<b>24h</b>	0,1290	0,0203	6,4	0,000	0,0892	0,1689
<b>48h</b>	0,2587	0,0202	12,8	0,000	0,2190	0,2983
<b>72h</b>	0,1920	0,0205	9,4	0,000	0,1518	0,2322
<b>900 rpm*siCHT</b>	0,2721	0,0255	10,7	0,000	0,2221	0,3221
<b>1200 rpm*siCHT</b>	0,1809	0,0255	7,1	0,000	0,1309	0,2309
<b>900 rpm*24h</b>	0,4726	0,0260	18,2	0,000	0,4216	0,5235
<b>900 rpm*48h</b>	0,3171	0,0259	12,2	0,000	0,2663	0,3679
<b>900 rpm*72h</b>	0,3807	0,0261	14,6	0,000	0,3294	0,4319
<b>1200 rpm*24h</b>	0,1466	0,0260	5,6	0,000	0,0957	0,1976
<b>1200 rpm*48h</b>	0,0931	0,0259	3,6	0,000	0,0423	0,1439
<b>1200 rpm*72h</b>	0,1867	0,0261	7,1	0,000	0,1355	0,2380
<b>siCHT*24h</b>	0,1502	0,0274	5,5	0,000	0,0965	0,2040
<b>siCHT*48h</b>	0,0042	0,0274	0,2	0,879	-0,0495	0,0578
<b>siCHT*72h</b>	0,3190	0,0276	11,6	0,000	0,2650	0,3731
<b>900 rpm*siCHT*24h</b>	-0,4703	0,0367	-12,8	0,000	-0,5422	-0,3985
<b>900 rpm*siCHT*48h</b>	-0,2403	0,0366	-6,6	0,000	-0,3120	-0,1685
<b>900 rpm*siCHT*72h</b>	-0,2457	0,0368	-6,7	0,000	-0,3178	-0,1736
<b>1200 rpm*siCHT*24h</b>	-0,1236	0,0367	-3,4	0,001	-0,1955	-0,0517
<b>1200 rpm*siCHT*48h</b>	0,1365	0,0366	3,7	0,000	0,0647	0,2082
<b>1200 rpm*siCHT*72h</b>	0,0682	0,0368	1,9	0,064	-0,0039	0,1403
<b>_cons</b>	0,8588	0,0138	62,3	0,000	0,8318	0,8858

### 8.3 TEST DE WILCOXON Y KRUSKAL-WALLIS (Módulo elástico, $G'_{LVR}$ : Análisis estadístico para los sistemas Solución ácido acético / Solución reguladora de fosfatos / Synperonic A7 / Decano y Quitosano / Solución reguladora de fosfatos / Synperonic A7 / Decano)

Comparación de GPa para las distintas velocidades (rpm)



**Figura 8.4** Distribución del módulo elástico para EAC1 y EAC2 en función de la velocidad de agitación: 700, 900 y 1200 rpm.

```
. kwallis GPa, by(rpm)
Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test
+-----+
|      rpm | Obs | Rank Sum |
+-----+
| 700 rpm | 28 | 943.00 |
| 900 rpm | 28 | 1063.00 |
| 1200 rpm | 28 | 1564.00 |
+-----+
chi-squared = 13.026 with 2 d.f.
probability = 0.0015
chi-squared with ties = 13.026 with 2 d.f.
probability = 0.0015
```

**Comparación 700 rpm con 900 rpm**

```
. ranksum GPa if (rpm==0 | rpm==1), by(rpm)
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
      rpm |      obs      rank sum      expected
-----+-----
      700 rpm |      28      741      798
      900 rpm |      28      855      798
-----+-----
      combined |      56      1596      1596
unadjusted variance      3724.00
adjustment for ties      -0.13
-----
adjusted variance      3723.87
Ho: GPa(rpm==700 rpm) = GPa(rpm==900 rpm)
      z = -0.934
      Prob > |z| = 0.3503
```

**Comparación 700 rpm con 1200 rpm**

```
. ranksum GPa if (rpm==0 | rpm==2), by(rpm)
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
      rpm |      obs      rank sum      expected
-----+-----
      700 rpm |      28      608      798
     1200 rpm |      28      988      798
-----+-----
      combined |      56      1596      1596
unadjusted variance      3724.00
adjustment for ties      0.00
-----
adjusted variance      3724.00
Ho: GPa(rpm==700 rpm) = GPa(rpm==1200 rpm)
      z = -3.113
      Prob > |z| = 0.0018
```

**Comparación 900 rpm con 1200 rpm**

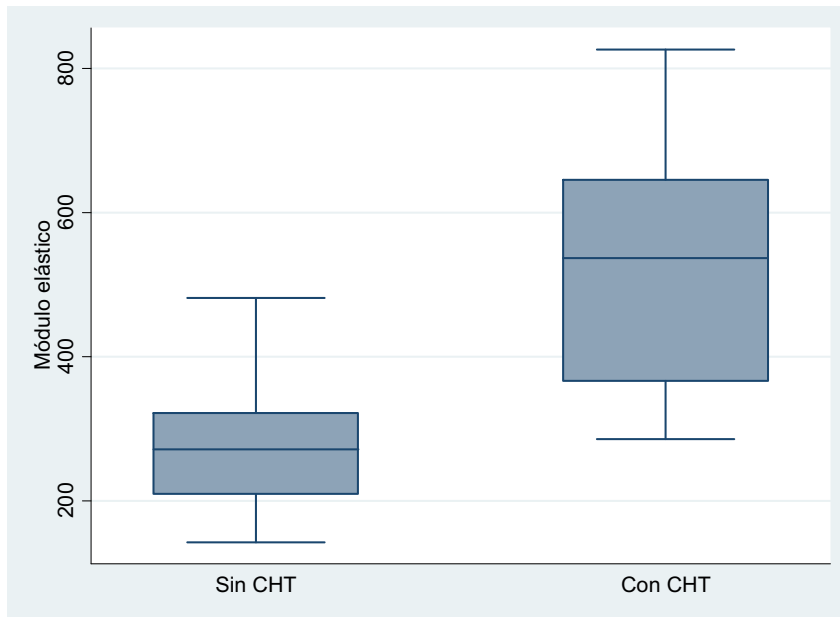
```
. ranksum GPa if (rpm==1 | rpm==2), by(rpm)
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
      rpm |      obs      rank sum      expected
-----+-----
      900 rpm |      28      614      798
     1200 rpm |      28      982      798
-----+-----
      combined |      56      1596      1596
unadjusted variance      3724.00
adjustment for ties      -0.13
-----
adjusted variance      3723.87
Ho: GPa(rpm==900 rpm) = GPa(rpm==1200 rpm)
      z = -3.015
      Prob > |z| = 0.0026
```

**Comparaciones Múltiples: False Discovery Rate (FDR)**

```
Method: simes
Uncorrected overall critical P-value: .05
Number of P-values: 3
Corrected overall critical P-value: .03333333
Number of rejected P-values: 2
```

```
+-----+
| compar~n      pvalor      posicion      alfa_cr~1      pvalor_~o      rechaz~0 |
+-----+
1. | 700_900      .35027      3      .05      .03333333      0 |
2. | 700_1200     .0018488     1      .01666667     .03333333      1 |
3. | 900_1200     .0025679     2      .03333333     .03333333      1 |
+-----+
```

## Comparación del GPa para CHT(sin/con)

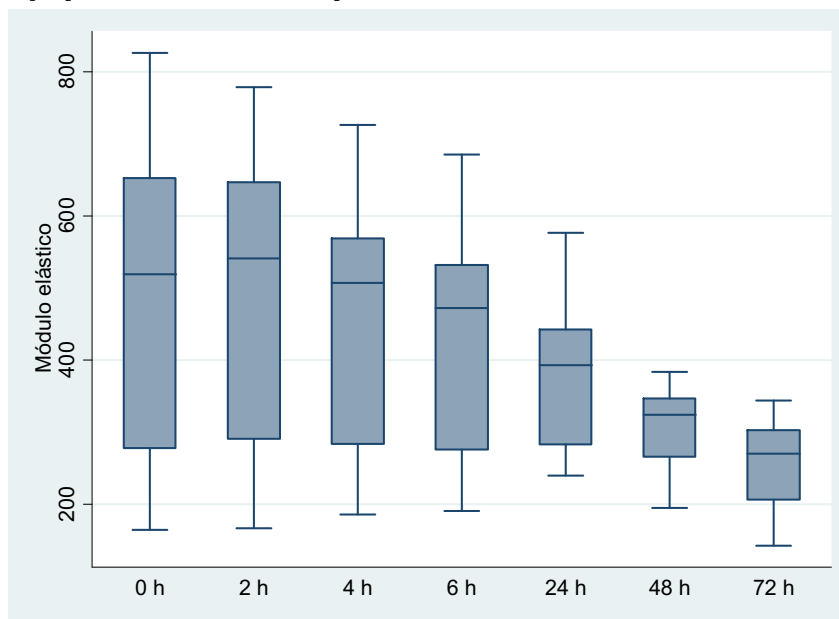


**Figura 8.5** Distribución del módulo elástico en función de la presencia de quitosano: EAC1 (sin quitosano) y EAC2 (con quitosano).

```
. ranksum GPa, by(CHT)
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
      CHT |      obs   rank sum   expected
-----+-----
      Sin CHT |      42     1072     1785
      Con CHT |      42     2498     1785
-----+-----
      combined |      84     3570     3570
unadjusted variance      12495.00
adjustment for ties      -0.13
-----+-----
adjusted variance      12494.87
Ho: GPa(CHT==Sin CHT) = GPa(CHT==Con CHT)
      z =  -6.379
      Prob > |z| =  0.0000
```

**Comparación del GPa para Tiempos (0/2/4/6/24/48/72 horas)**

```
. graph box GPa, over(Tiempo)
```



**Figura 8.6** Distribución del módulo elástico para EAC1 y EAC2 en función del tiempo: 0, 2, 4, 6, 24, 48 y 72 h.

```
. kwallis GPa, by(Tiempo)
Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test
```

Tiempo	Obs	Rank Sum
0 h	12	615.00
2 h	12	633.00
4 h	12	604.00
6 h	12	571.50
24 h	12	497.50
48 h	12	386.00
72 h	12	263.00

```
chi-squared = 16.150 with 6 d.f.
probability = 0.0130
chi-squared with ties = 16.151 with 6 d.f.
probability = 0.0130
```

**1) Comparación 0 h con 2 h**

```
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
```

Tiempo	obs	rank sum	expected
0 h	12	148	150
2 h	12	152	150
combined	24	300	300

```
unadjusted variance 300.00
adjustment for ties 0.00
```

```
adjusted variance 300.00
Ho: GPa(Tiempo==0 h) = GPa(Tiempo==2 h)
z = -0.115
Prob > |z| = 0.9081
```



**2) Comparación 0 h con 4 h**

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

Tiempo	obs	rank sum	expected
0 h	12	156	150
4 h	12	144	150
combined	24	300	300

unadjusted variance      300.00  
 adjustment for ties      0.00

adjusted variance      300.00

Ho: GPa(Tiempo==0 h) = GPa(Tiempo==4 h)  
 z = 0.346  
 Prob > |z| = 0.7290

**3) Comparación 0 h con 6 h**

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

Tiempo	obs	rank sum	expected
0 h	12	158	150
6 h	12	142	150
combined	24	300	300

unadjusted variance      300.00  
 adjustment for ties      0.00

adjusted variance      300.00

Ho: GPa(Tiempo==0 h) = GPa(Tiempo==6 h)  
 z = 0.462  
 Prob > |z| = 0.6442

**4) Comparación 0 h con 24 h**

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

Tiempo	obs	rank sum	expected
0 h	12	174	150
24 h	12	126	150
combined	24	300	300

unadjusted variance      300.00  
 adjustment for ties      0.00

adjusted variance      300.00

Ho: GPa(Tiempo==0 h) = GPa(Tiempo==24 h)  
 z = 1.386  
 Prob > |z| = 0.1659

**5) Comparación 0 h con 48 h**

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

Tiempo	obs	rank sum	expected
0 h	12	180	150
48 h	12	120	150
combined	24	300	300

unadjusted variance      300.00  
 adjustment for ties      0.00

adjusted variance      300.00

Ho: GPa(Tiempo==0 h) = GPa(Tiempo==48 h)  
 z = 1.732  
 Prob > |z| = 0.0833

**6) Comparación 0 h con 72 h**

```
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
Tiempo |      obs      rank sum      expected
-----+-----
      0 h |      12       189       150
      72 h |      12       111       150
-----+-----
 combined |      24       300       300
unadjusted variance      300.00
adjustment for ties      0.00
-----
adjusted variance      300.00
Ho: GPa(Tiempo==0 h) = GPa(Tiempo==72 h)
      z = 2.252
Prob > |z| = 0.0243
```

**7) Comparación 2 h con 4 h**

```
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
Tiempo |      obs      rank sum      expected
-----+-----
      2 h |      12       159       150
      4 h |      12       141       150
-----+-----
 combined |      24       300       300
unadjusted variance      300.00
adjustment for ties      0.00
-----
adjusted variance      300.00
Ho: GPa(Tiempo==2 h) = GPa(Tiempo==4 h)
      z = 0.520
Prob > |z| = 0.6033
```

**8) Comparación 2 h con 6 h**

```
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
Tiempo |      obs      rank sum      expected
-----+-----
      2 h |      12       161       150
      6 h |      12       139       150
-----+-----
 combined |      24       300       300
unadjusted variance      300.00
adjustment for ties      0.00
-----
adjusted variance      300.00
Ho: GPa(Tiempo==2 h) = GPa(Tiempo==6 h)
      z = 0.635
Prob > |z| = 0.5254
```

**9) Comparación 2 h con 24 h**

```
Tiempo |      obs      rank sum      expected
-----+-----
      2 h |      12       178       150
      24 h |      12       122       150
-----+-----
 combined |      24       300       300
unadjusted variance      300.00
adjustment for ties      0.00
-----
adjusted variance      300.00
Ho: GPa(Tiempo==2 h) = GPa(Tiempo==24 h)
      z = 1.617
Prob > |z| = 0.1060
```

**10) Comparación 2 h con 48 h**

```
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
Tiempo |      obs      rank sum      expected
-----+-----
      2 h |        12        181        150
      48 h |        12        119        150
-----+-----
combined |        24        300        300
unadjusted variance      300.00
adjustment for ties      0.00
-----
adjusted variance      300.00
Ho: GPa(Tiempo==2 h) = GPa(Tiempo==48 h)
      z = 1.790
```

**11) Comparación 2 h con 72 h**

```
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
Tiempo |      obs      rank sum      expected
-----+-----
      2 h |        12        192        150
      72 h |        12        108        150
-----+-----
combined |        24        300        300
unadjusted variance      300.00
adjustment for ties      0.00
-----
adjusted variance      300.00
Ho: GPa(Tiempo==2 h) = GPa(Tiempo==72 h)
      z = 2.425
Prob > |z| = 0.0153
```

**12) Comparación 4 h con 6 h**

```
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
Tiempo |      obs      rank sum      expected
-----+-----
      4 h |        12        161        150
      6 h |        12        139        150
-----+-----
combined |        24        300        300
unadjusted variance      300.00
adjustment for ties      0.00
-----
adjusted variance      300.00
Ho: GPa(Tiempo==4 h) = GPa(Tiempo==6 h)
      z = 0.635
Prob > |z| = 0.5254
```

**13) Comparación 4 h con 24 h**

```
. ranksum GPa if (Tiempo==2 | Tiempo==4), by(Tiempo)
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
Tiempo |      obs      rank sum      expected
-----+-----
      4 h |        12        173        150
      24 h |        12        127        150
-----+-----
combined |        24        300        300
unadjusted variance      300.00
adjustment for ties      0.00
-----
adjusted variance      300.00
Ho: GPa(Tiempo==4 h) = GPa(Tiempo==24 h)
      z = 1.328
Prob > |z| = 0.1842
```

**14) Comparación 4 h con 48 h**

```

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
Tiempo |      obs      rank sum      expected
-----+-----
      4 h |      12       181       150
      48 h |      12       119       150
-----+-----
      combined |      24       300       300
unadjusted variance      300.00
adjustment for ties      0.00
-----
adjusted variance      300.00
Ho: GPa(Tiempo==4 h) = GPa(Tiempo==48 h)
      z =      1.790
      Prob > |z| =      0.0735

```

**15) Comparación 4 h con 72 h**

```

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
Tiempo |      obs      rank sum      expected
-----+-----
      4 h |      12       194       150
      72 h |      12       106       150
-----+-----
      combined |      24       300       300
unadjusted variance      300.00
adjustment for ties      0.00
-----
adjusted variance      300.00
Ho: GPa(Tiempo==4 h) = GPa(Tiempo==72 h)
      z =      2.540
      Prob > |z| =      0.0111

```

**16) Comparación 6 h con 24 h**

```

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
Tiempo |      obs      rank sum      expected
-----+-----
      6 h |      12      169.5       150
      24 h |      12      130.5       150
-----+-----
      combined |      24       300       300
unadjusted variance      300.00
adjustment for ties      -0.13
-----
adjusted variance      299.87
Ho: GPa(Tiempo==6 h) = GPa(Tiempo==24 h)
      z =      1.126
      Prob > |z| =      0.2601
. display r(z)

```

**17) Comparación 6 h con 48 h**

```

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
Tiempo |      obs      rank sum      expected
-----+-----
      6 h |      12       181       150
      48 h |      12       119       150
-----+-----
      combined |      24       300       300
unadjusted variance      300.00
adjustment for ties      0.00
-----
adjusted variance      300.00
Ho: GPa(Tiempo==6 h) = GPa(Tiempo==48 h)
      z =      1.790
      Prob > |z| =      0.0735

```

**18) Comparación 6 h con 72 h**

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

Tiempo	obs	rank sum	expected
6 h	12	191	150
72 h	12	109	150
combined	24	300	300

unadjusted variance 300.00  
 adjustment for ties 0.00

adjusted variance 300.00

Ho: GPa(Tiempo==6 h) = GPa(Tiempo==72 h)

z = 2.367

Prob &gt; |z| = 0.0179

**19) Comparación 24 h con 48 h**

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

Tiempo	obs	rank sum	expected
24 h	12	184	150
48 h	12	116	150
combined	24	300	300

unadjusted variance 300.00  
 adjustment for ties 0.00

adjusted variance 300.00

Ho: GPa(Tiempo==24 h) = GPa(Tiempo==48 h)

z = 1.963

Prob &gt; |z| = 0.0496

**20) Comparación 24 h con 72 h**

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

Tiempo	obs	rank sum	expected
24 h	12	198	150
72 h	12	102	150
combined	24	300	300

unadjusted variance 300.00  
 adjustment for ties 0.00

adjusted variance 300.00

Ho: GPa(Tiempo==24 h) = GPa(Tiempo==72 h)

z = 2.771

Prob &gt; |z| = 0.0056

**21) Comparación 48 h con 72 h**

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

Tiempo	obs	rank sum	expected
48 h	12	183	150
72 h	12	117	150
combined	24	300	300

unadjusted variance 300.00  
 adjustment for ties 0.00

adjusted variance 300.00

Ho: GPa(Tiempo==48 h) = GPa(Tiempo==72 h)

z = 1.905

Prob &gt; |z| = 0.0567

.

**Comparaciones Múltiples: False Discovery Rate (FDR)**

Method: simes

Uncorrected overall critical P-value: .05

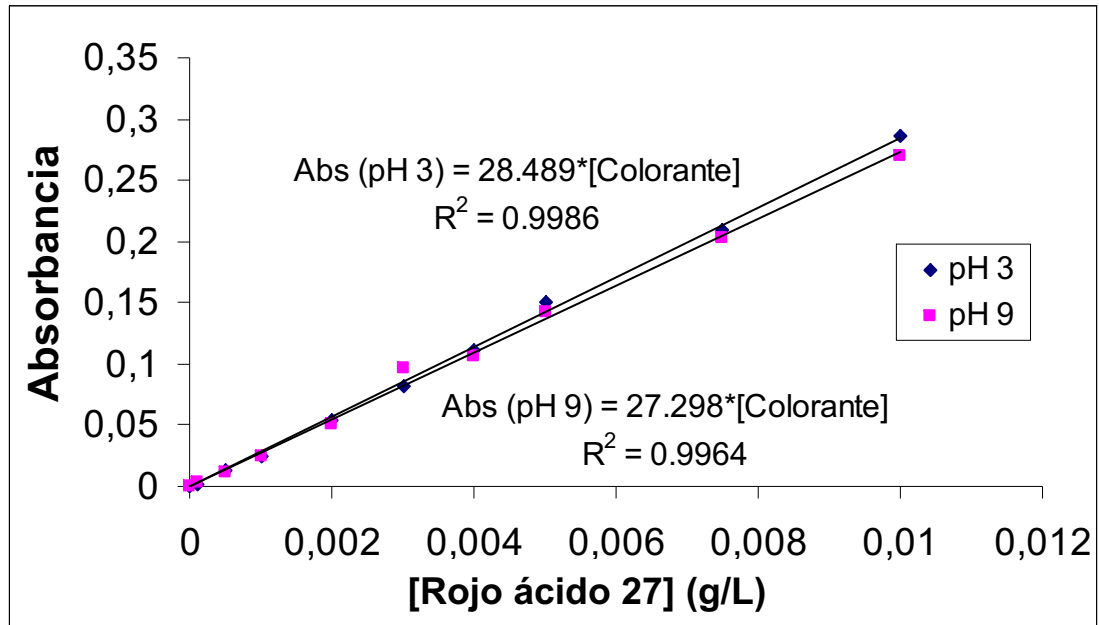
Number of P-values: 21

Corrected overall critical P-value: .00238095

Number of rejected P-values: 0

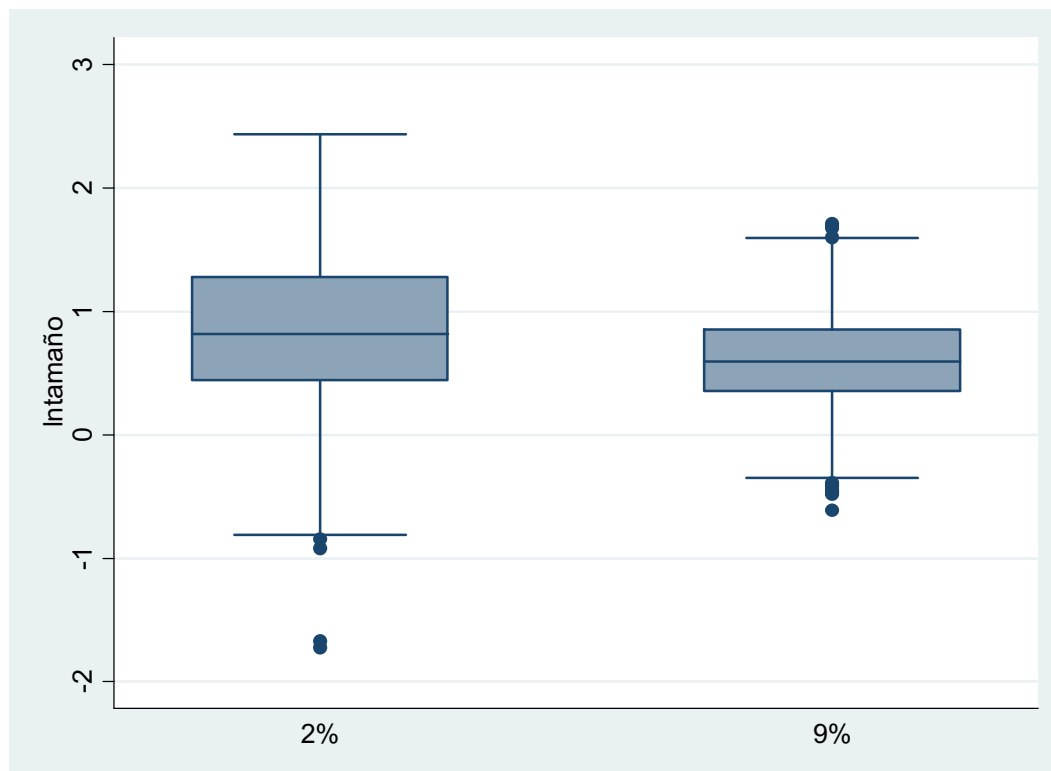
	compar~n	pvalor	posicion	alfa_cr~l	pvalor_~o	rechaz~0
1.	0_2	.9080725	21	.05	.00238095	0
2.	0_4	.7290345	20	.04761905	.00238095	0
3.	0_6	.6441672	19	.0452381	.00238095	0
4.	0_24	.1658567	13	.03095238	.00238095	0
5.	0_48	.0832645	11	.02619048	.00238095	0
6.	0_72	.0243434	5	.01190476	.00238095	0
7.	2_4	.6033317	18	.04285714	.00238095	0
8.	2_6	.5253728	16	.03809524	.00238095	0
9.	2_24	.1059688	12	.02857143	.00238095	0
10.	2_48	.0734883	8	.01904762	.00238095	0
11.	2_72	.0153138	3	.00714286	.00238095	0
12.	4_6	.5253728	17	.04047619	.00238095	0
13.	4_24	.1842093	14	.03333333	.00238095	0
14.	4_48	.0734883	9	.02142857	.00238095	0
15.	4_72	.0110744	2	.0047619	.00238095	0
16.	6_24	.2601326	15	.03571429	.00238095	0
17.	6_48	.0734883	10	.02380952	.00238095	0
18.	6_72	.0179263	4	.00952381	.00238095	0
19.	24_48	.0496472	6	.01428571	.00238095	0
20.	24_72	.0055836	1	.00238095	.00238095	0
21.	48_72	.0567468	7	.01666667	.00238095	0

#### 8.4 CURVAS DE CALIBRADO MEDIANTE ESPECTROMETRÍA UV-VIS PARA LOS PROCESOS DE ADSORCIÓN/DESORCIÓN DE COLORANTE



## 8.5 TEST DE WILCOXON Y KRUSKAL-WALLIS (Diámetro de gota: Análisis estadístico para los sistemas Solución ácido acético / Solución reguladora de fosfatos / Pluronic® P123 / Decano y Quitosano / Solución reguladora de fosfatos / Pluronic® P123 / Decano)

. \* Comparación del ln(tamaño) para las distintas concentraciones (P123)



**Figura 8.7** Distribución del logaritmo neperiano del diámetro de gota en función de la concentración de tensioactivo: 2 y 9 % de Pluronic® P123.

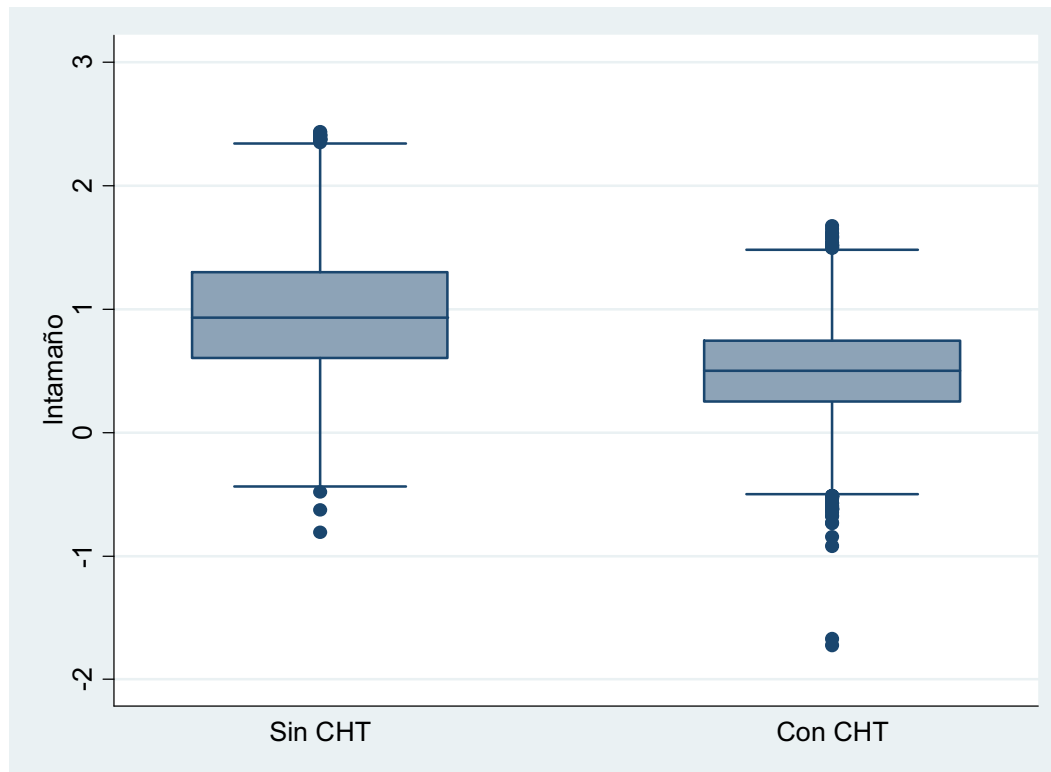
```

ranksum lntamaño, by(P123)
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
-----+-----
      P123 |      obs   rank sum   expected
-----+-----
      2% |      7999   72475387   63992000
      9% |      8000   55516613   64000000
-----+-----
    combined |    15999   1.280e+08   1.280e+08
unadjusted variance  8.532e+10
adjustment for ties  -122923.31
-----+-----
adjusted variance    8.532e+10
Ho: lntamaño(P123==2%) = lntamaño(P123==9%)
      z = 29.043
Prob > |z| =  0.0000

```



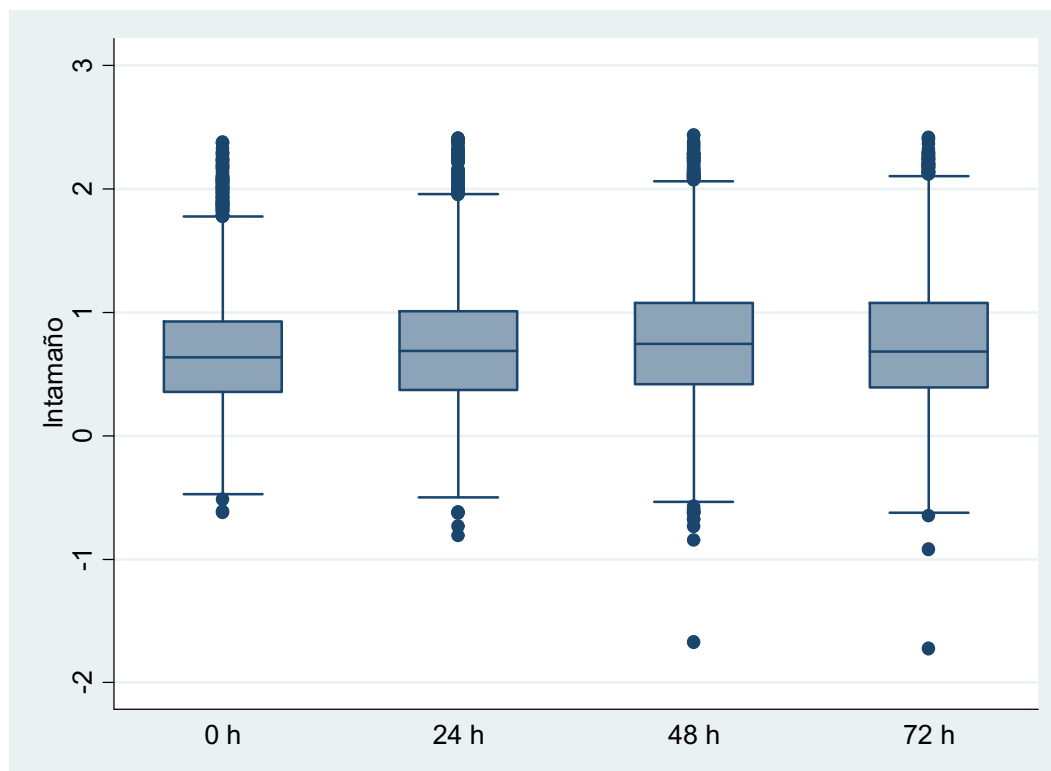
.. \* Comparación del ln(tamaño) para CHT(sin/con)



**Figura 8.8** Distribución del logaritmo neperiano del diámetro para EAC4 y EAC7 (sin quitosano, CHT) y para EAC5 y EAC8 (con quitosano, CHT).

```
. ranksum Intamaño, by(CHT)
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
      CHT |      obs   rank sum   expected
-----+-----
      Sin CHT |      7999   81308012   63992000
      Con CHT |      8000   46683989   64000000
-----+-----
      combined |     15999   1.280e+08   1.280e+08
unadjusted variance   8.532e+10
adjustment for ties  -122923.31
-----+-----
adjusted variance     8.532e+10
Ho: Intamaño(CHT==Sin CHT) = Intamaño(CHT==Con CHT)
      z = 59.281
      Prob > |z| = 0.0000
.
```

. \* Comparación del ln(tamaño) para Tiempo (0/24/48/72 horas)



**Figura 8.9** Distribución del logaritmo neperiano del diámetro de gota para EAC4, EAC5, EAC7 y EAC8 en función del tiempo: 0, 24, 48 y 72 h.

```
. kwallis lntamaño, by(Tiempo)
Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test
+-----+
| Tiempo | Obs | Rank Sum |
+-----+
| 0 h | 3999 | 2.98e+07 |
| 24 h | 4000 | 3.17e+07 |
| 48 h | 4000 | 3.37e+07 |
| 72 h | 4000 | 3.28e+07 |
+-----+
chi-squared = 99.744 with 3 d.f.
probability = 0.0001
chi-squared with ties = 99.744 with 3 d.f.
probability = 0.0001
```

**Se comparan 2 a 2 los Tiempos con el contraste de la Suma de Rangos de Wilcoxon (6 comparaciones)**

```
. * Comparación 0h con 24 horas
. ranksum lntamaño if (Tiempo==0 | Tiempo==1), by(Tiempo)
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
Tiempo | obs rank sum expected
+-----+
0 h | 3999 15520101 15996000
24 h | 4000 16475899 16000000
+-----+
combined | 7999 31996000 31996000
unadjusted variance 1.066e+10
adjustment for ties -17122.515
+-----+
adjusted variance 1.066e+10
Ho: lntamaño(Tiempo==0 h) = lntamaño(Tiempo==24 h)
z = -4.608
Prob > |z| = 0.0000
```

```
. * Comparación 0h con 48 horas
. ranksum lntamaño if (Tiempo==0 | Tiempo==2), by(Tiempo)
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
      Tiempo |      obs      rank sum      expected
-----+-----
      0 h |      3999      14998673      15996000
      48 h |      4000      16997328      16000000
-----+-----
      combined |      7999      31996000      31996000
unadjusted variance      1.066e+10
adjustment for ties      -14712.839
-----+-----
adjusted variance      1.066e+10
Ho: lntamaño(Tiempo==0 h) = lntamaño(Tiempo==48 h)
      z =      -9.658
      Prob > |z| =      0.0000
```

```
. * Comparación 0h con 72 horas
. ranksum lntamaño if (Tiempo==0 | Tiempo==3), by(Tiempo)
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
      Tiempo |      obs      rank sum      expected
-----+-----
      0 h |      3999      15277798      15996000
      72 h |      4000      16718202      16000000
-----+-----
      combined |      7999      31996000      31996000
unadjusted variance      1.066e+10
adjustment for ties      -23080.01
-----+-----
adjusted variance      1.066e+10
Ho: lntamaño(Tiempo==0 h) = lntamaño(Tiempo==72 h)
      z =      -6.955
      Prob > |z| =      0.0000
```

```
. * Comparación 24h con 48 horas
. ranksum lntamaño if (Tiempo==1 | Tiempo==2), by(Tiempo)
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
      Tiempo |      obs      rank sum      expected
-----+-----
      24 h |      4000      15487093      16002000
      48 h |      4000      16516907      16002000
-----+-----
      combined |      8000      32004000      32004000
unadjusted variance      1.067e+10
adjustment for ties      -17231.529
-----+-----
adjusted variance      1.067e+10
Ho: lntamaño(Tiempo==24 h) = lntamaño(Tiempo==48 h)
      z =      -4.985
      Prob > |z| =      0.0000
```

```
. * Comparación 24h con 72 horas
. ranksum lntamaño if (Tiempo==1 | Tiempo==3), by(Tiempo)
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
      Tiempo |      obs      rank sum      expected
-----+-----
      24 h |      4000      15730486      16002000
      72 h |      4000      16273515      16002000
-----+-----
      combined |      8000      32004000      32004000
unadjusted variance      1.067e+10
adjustment for ties      -23172.147
-----+-----
adjusted variance      1.067e+10
Ho: lntamaño(Tiempo==24 h) = lntamaño(Tiempo==72 h)
      z =      -2.629
      Prob > |z| =      0.0086
```

```

. * Comparación 48h con 72 horas
. ranksum lntamaño if (Tiempo==2 | Tiempo==3), by(Tiempo)
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
      Tiempo |      obs      rank sum      expected
-----+-----
      48 h |      4000      16231133      16002000
      72 h |      4000      15772868      16002000
-----+-----
      combined |      8000      32004000      32004000
unadjusted variance      1.067e+10
adjustment for ties      -18609.951
-----
adjusted variance      1.067e+10
Ho: lntamaño(Tiempo==48 h) = lntamaño(Tiempo==72 h)
      z =      2.218
      Prob > |z| =      0.0265

```

**Comparaciones Múltiples: False Discovery Rate (FDR)**

```

Method: simes
Uncorrected overall critical P-value: .05
Number of P-values: 6
Corrected overall critical P-value: .05
Number of rejected P-values: 6

```

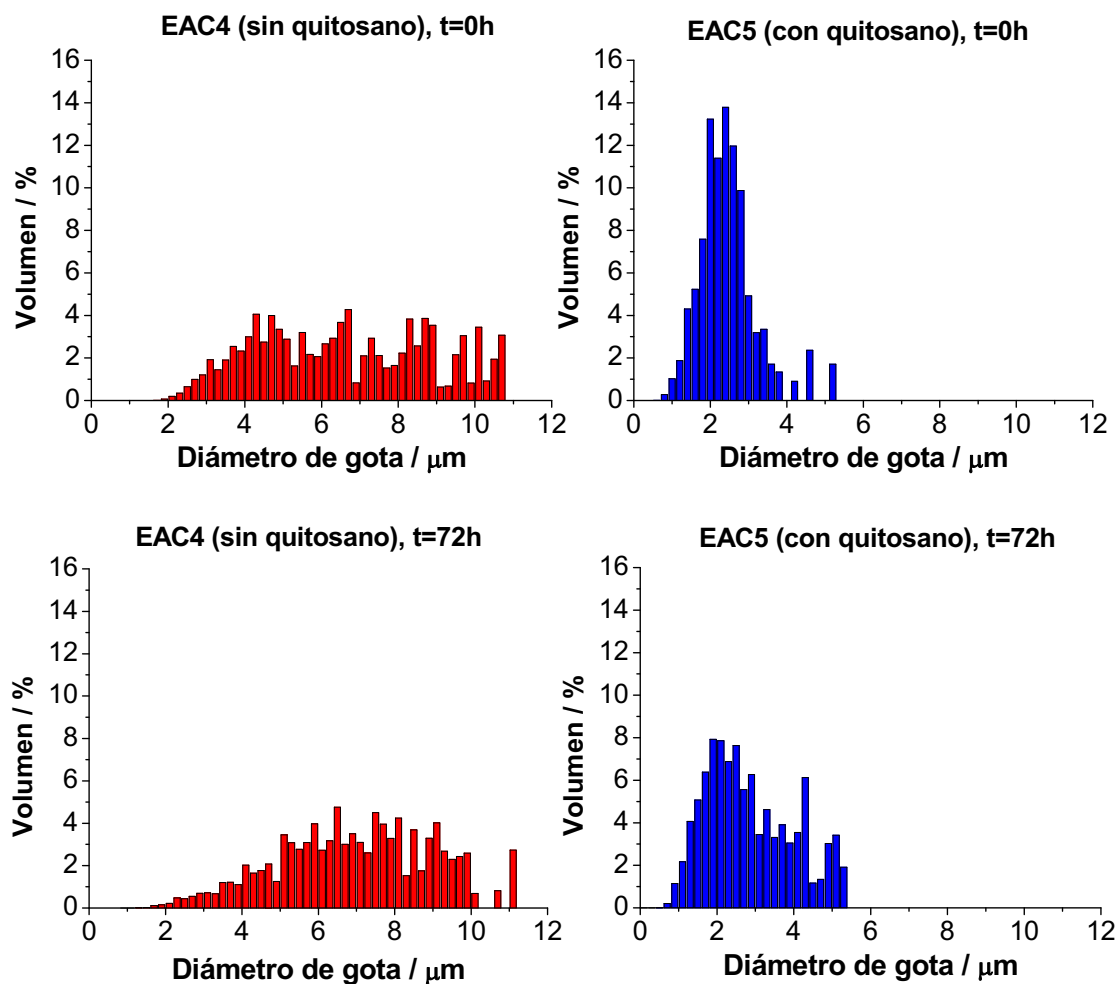
	compar~n	pvalor	posicion	alfa_cr~l	pvalor~o	rechaz~0
1.	T0_24	2.46e-06	4	.03333333	.05	1
2.	T0_48	1.54e-22	1	.00833333	.05	1
3.	T0_72	1.65e-12	2	.01666667	.05	1
4.	T24_48	6.19e-07	3	.025	.05	1
5.	T24_72	.0085695	5	.04166667	.05	1
6.	T48_72	.0265256	6	.05	.05	1

## 8.6 MODELO DE REGRESIÓN LINEAL MÚLTIPLE (Diámetro de gota: Análisis estadístico para los sistemas Solución ácido acético / Solución reguladora de fosfatos / Pluronic® P123 / Decano Quitosano / Solución reguladora de fosfatos / Pluronic® P123 / Decano)

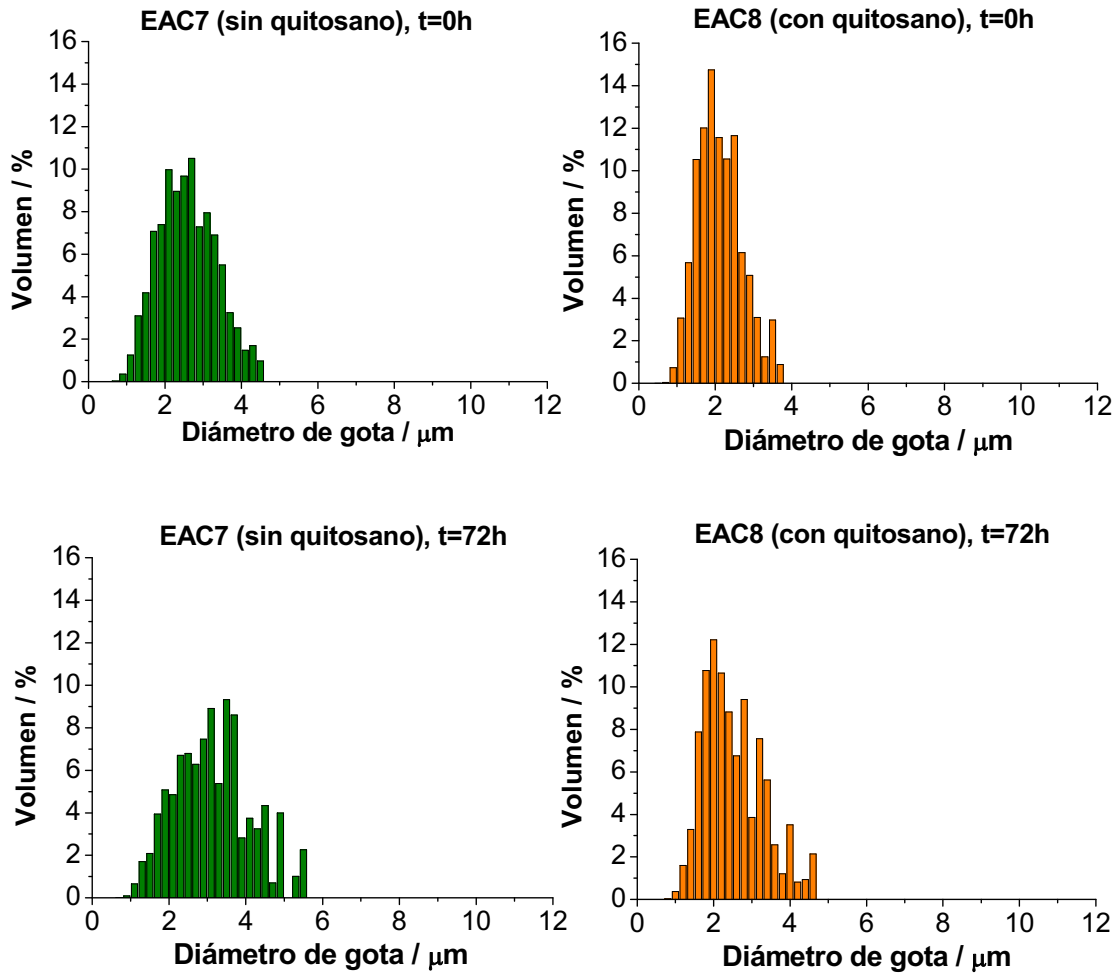
**Tabla 8.2** Coeficientes del modelo de regresión lineal múltiple con los tres factores (presencia de quitosano, concentración de tensioactivo y tiempo) y todas sus interacciones de segundo y tercer orden.

In(tamaño)	Coefficiente	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval.]	
<b>9% Pluronic® P123</b>	-0,577	0,019	-30,8	0,000	-0,613	-0,540
<b>siCHT</b>	-0,609	0,018	-32,4	0,000	-0,646	-0,572
<b>24h</b>	0,083	0,021	4,0	0,000	0,043	0,123
<b>48h</b>	0,179	0,021	8,6	0,000	0,138	0,219
<b>72h</b>	0,234	0,022	10,8	0,000	0,191	0,276
<b>9% Pluronic® P123*siCHT</b>	0,496	0,024	20,9	0,000	0,449	0,542
<b>9% Pluronic® P123*24h</b>	0,078	0,026	3,0	0,003	0,027	0,129
<b>9% Pluronic® P123*48h</b>	-0,018	0,026	-0,7	0,480	-0,069	0,032
<b>9% Pluronic® P123*72h</b>	-0,115	0,027	-4,3	0,000	-0,168	-0,062
<b>siCHT*24h</b>	-0,168	0,026	-6,5	0,000	-0,220	-0,117
<b>siCHT*48h</b>	-0,266	0,027	-9,7	0,000	-0,320	-0,213
<b>siCHT*72h</b>	-0,364	0,028	-13,1	0,000	-0,419	-0,310
<b>9% Pluronic® *siCHT*24h</b>	0,027	0,033	0,8	0,422	-0,039	0,092
<b>9% Pluronic® *siCHT*48h</b>	0,245	0,034	7,1	0,000	0,177	0,313
<b>9% Pluronic® *siCHT*72h</b>	0,392	0,035	11,3	0,000	0,324	0,460
<b>_cons</b>	1,143	0,015	75,6	0,000	1,114	1,17

## 8.7 DISTRIBUCIONES DE DIÁMETRO DE GOTA, EN VOLUMEN (%), PARA LAS COMPOSICIONES EAC4, EAC5, EAC7 Y EAC8



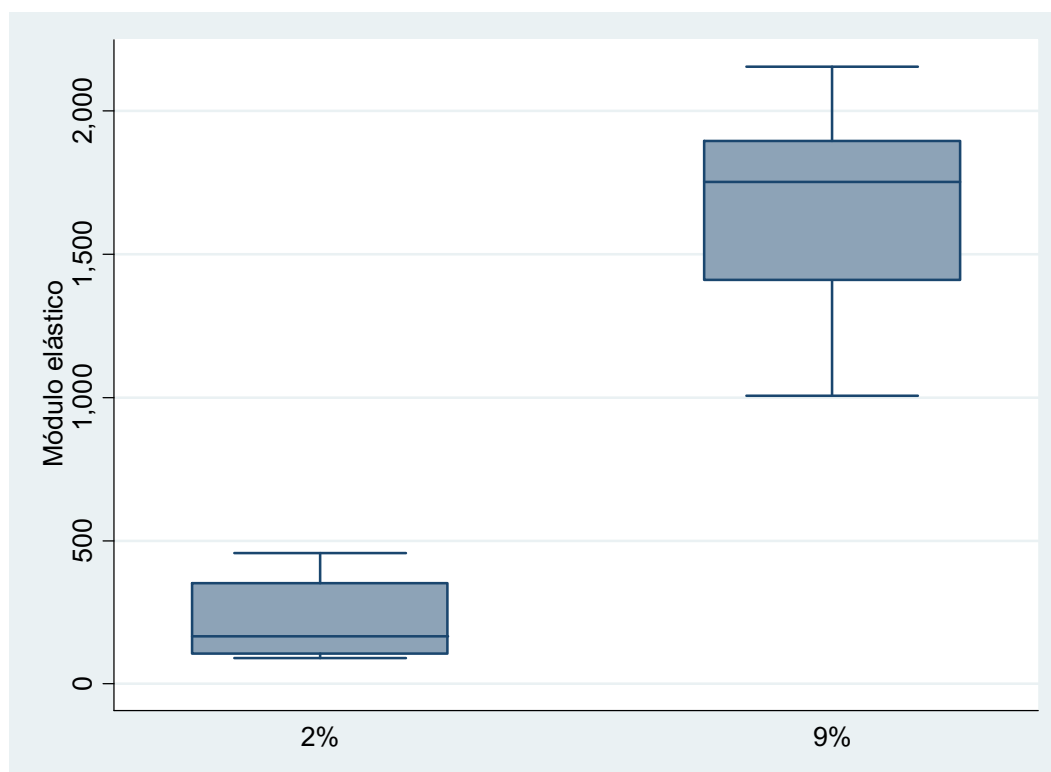
**Figura 8.10** Distribuciones de tamaño de gota, en volumen (%), de las emulsiones EAC4 (sin quitosano) y EAC5 (con quitosano) a tiempos t=0h y t=72h, a 40°C, para una concentración de tensioactivo de 2%, obtenidas a partir de las imágenes de microscopía óptica.



**Figura 8.11** Distribuciones de tamaño de gota, en volumen (%), de las emulsiones EAC7 (sin quitosano) y EAC8 (con quitosano) a tiempos t=0h y t=72h, a 40°C, para una concentración de tensioactivo de 9%, obtenidas a partir de las imágenes de microscopía óptica.

## 8.8 TEST DE WILCOXON Y KRUSKAL-WALLIS (Módulo elástico, $G'_{LVR}$ : Análisis estadístico para los sistemas Solución ácido acético / Solución reguladora de fosfatos / Pluronic® P123 / Decano y Quitosano / Solución reguladora de fosfatos / Pluronic® P123 / Decano)

### Comparación del GPa para las distintas concentraciones (P123)

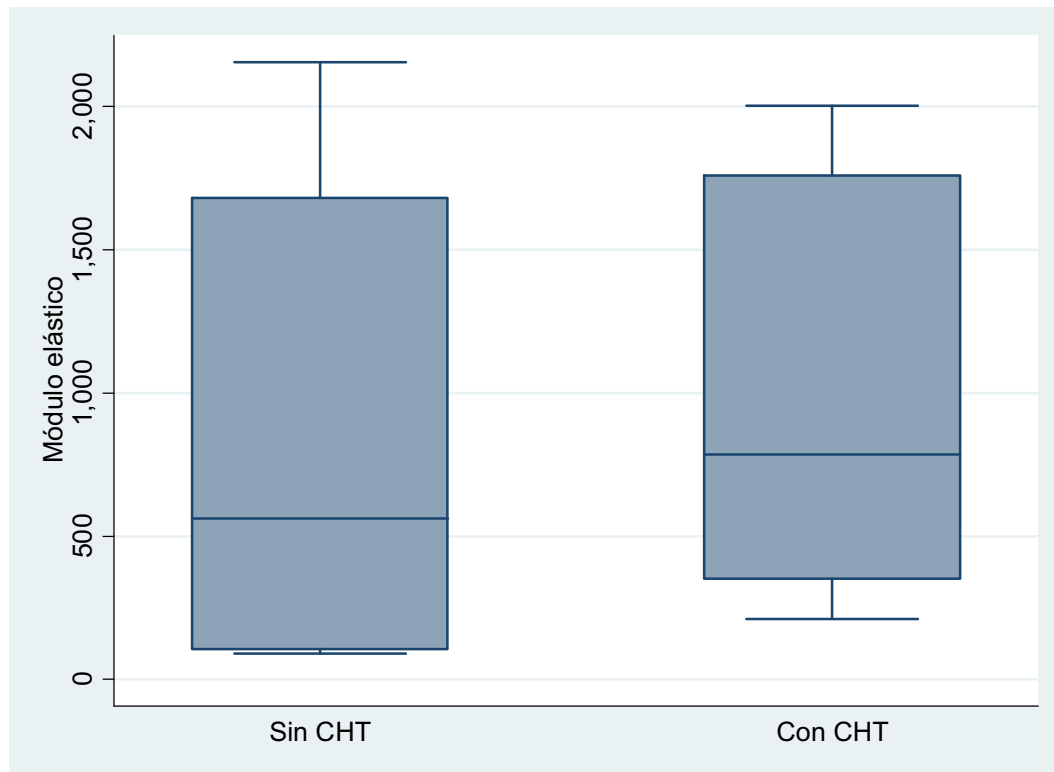


**Figura 8.12** Distribución del módulo elástico para EAC4 y EAC5 (2 % Pluronic® P123) y para EAC7 y EAC8 (9 % Pluronic® P123).

```
. ranksum GPa, by(P123)
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
-----+-----
      P123 |      obs      rank sum      expected
-----+-----
          2% |         28         406         798
          9% |         28        1190         798
-----+-----
 combined |         56        1596        1596
unadjusted variance      3724.00
adjustment for ties      0.00
-----+-----
adjusted variance      3724.00
Ho: GPa(P123==2%) = GPa(P123==9%)
      z = -6.424
      Prob > |z| = 0.0000
```



## Comparación del GPa para CHT(sin/con)

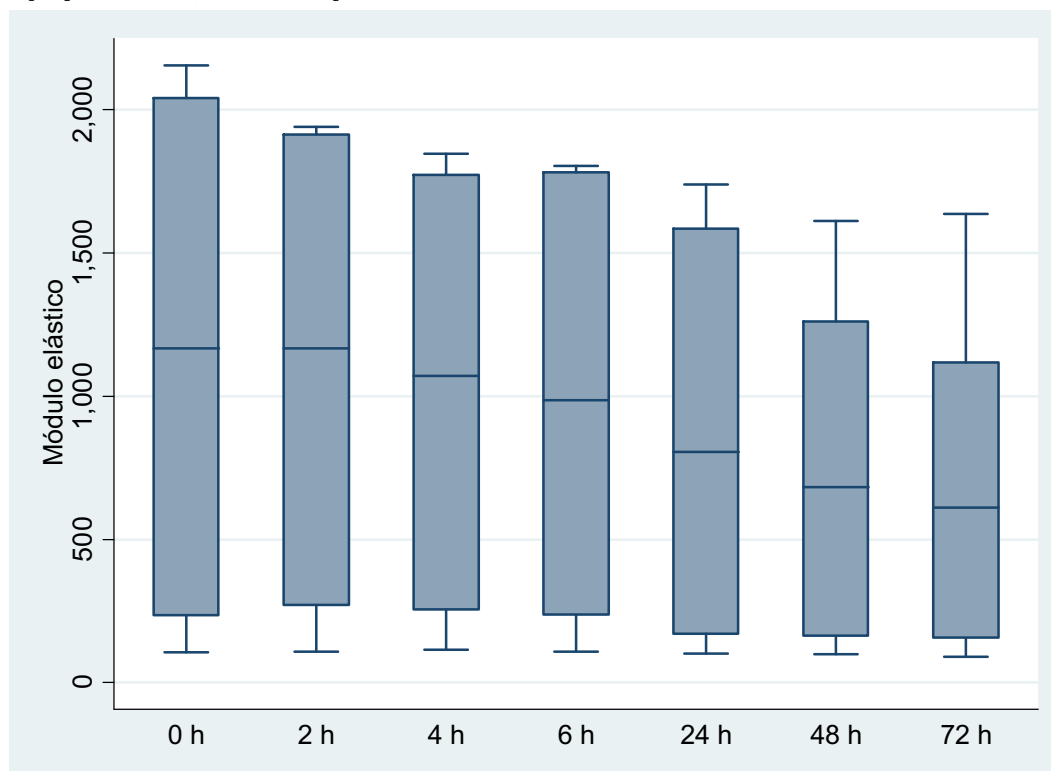


**Figura 8.13** Distribución del módulo elástico para EAC4 y EAC7 (sin quitosano, CHT) y para EAC5 y EAC8 (con quitosano, CHT).

```
. ranksum GPa, by(CHT)
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
      CHT |      obs   rank sum   expected
-----+-----
      Sin CHT |      28       685       798
      Con CHT |      28       911       798
-----+-----
      combined |      56      1596      1596
unadjusted variance      3724.00
adjustment for ties      0.00
-----+-----
adjusted variance      3724.00
Ho: GPa(CHT==Sin CHT) = GPa(CHT==Con CHT)
      z = -1.852
      Prob > |z| = 0.0641
```

**Comparación del GPa para Tiempo (0/24/48/72 horas)**

. graph box GPa, over(Tiempo)



**Figura 8.14** Distribución del módulo elástico para EAC4, EAC5, EAC7 y EAC8 en función del tiempo: 0, 2, 4, 6, 24, 48 y 72 h.

. kwallis GPa, by(Tiempo)

**Kruskal-Wallis** equality-of-populations rank test

Tiempo	Obs	Rank Sum
0 h	8	282.00
2 h	8	275.00
4 h	8	253.00
6 h	8	240.00
24 h	8	200.00
48 h	8	183.00
72 h	8	163.00

chi-squared = 6.075 with 6 d.f.

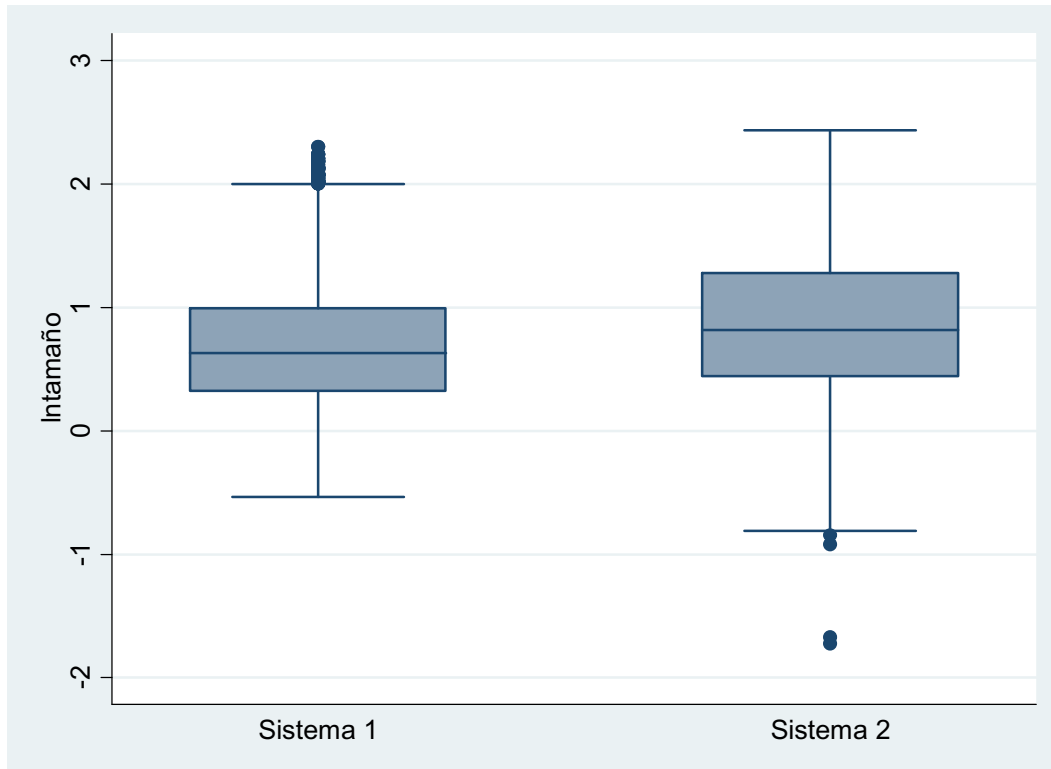
probability = 0.4148

chi-squared with ties = 6.075 with 6 d.f.

probability = 0.4148

## 8.9 TEST DE WILCOXON Y KRUSKAL-WALLIS (Diámetro de gota: Análisis estadístico para los sistemas formados por los tensioactivos Synperonic A7 y Pluronic® P123, en ausencia y presencia de quitosano)

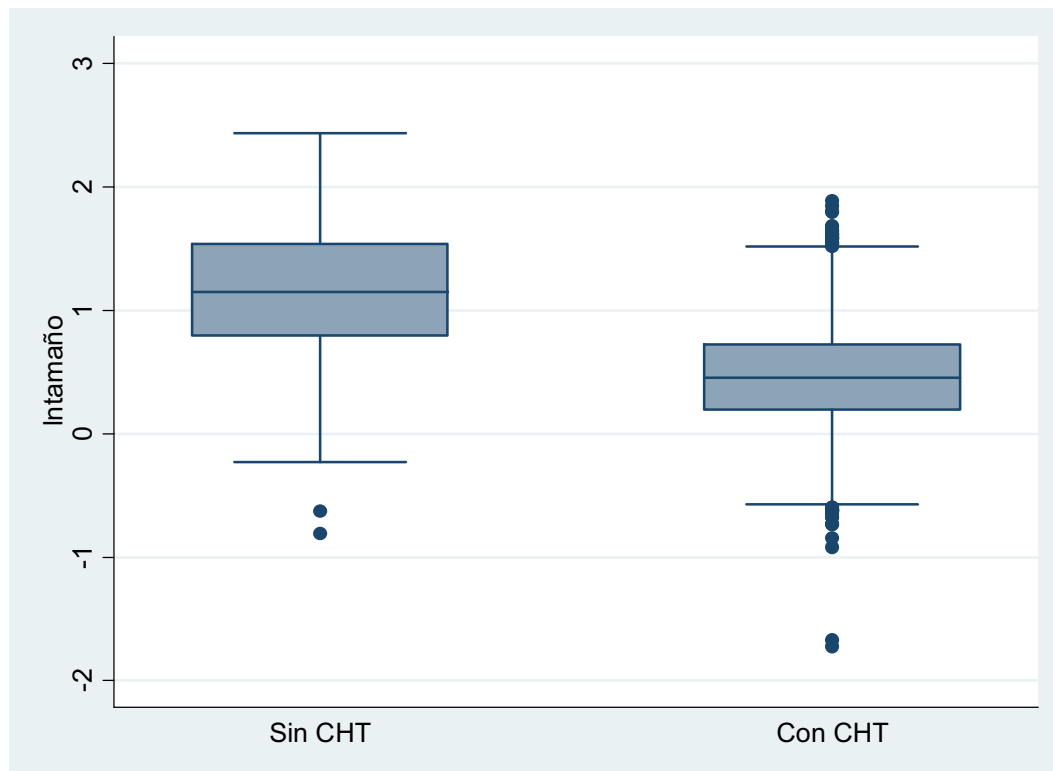
. \* Comparación del ln(tamaño) para los dos sistemas



**Figura 8.15** Distribución del logaritmo neperiano del diámetro de gota para el sistema tensioactivo con Synperonic A7 o Sistema 1 (EAC1 y EAC2 a 700 rpm) y para el sistema tensioactivo con Pluronic® P123 o Sistema 2 (EAC4 y EAC5, al 2 % Pluronic® P123).

```
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
sistema |      obs   rank sum   expected
-----+-----
Sistema 1 |    5503   33378323   37153505
Sistema 2 |    7999   57780430   54005249
-----+-----
combined |   13502   91158753   91158753
unadjusted variance  4.953e+10
adjustment for ties  -44465.586
-----+-----
adjusted variance   4.953e+10
Ho: Intamaño(sistema==Sistema 1) = Intamaño(sistema==Sistema 2)
      z = -16.963
      Prob > |z| =  0.0000
```

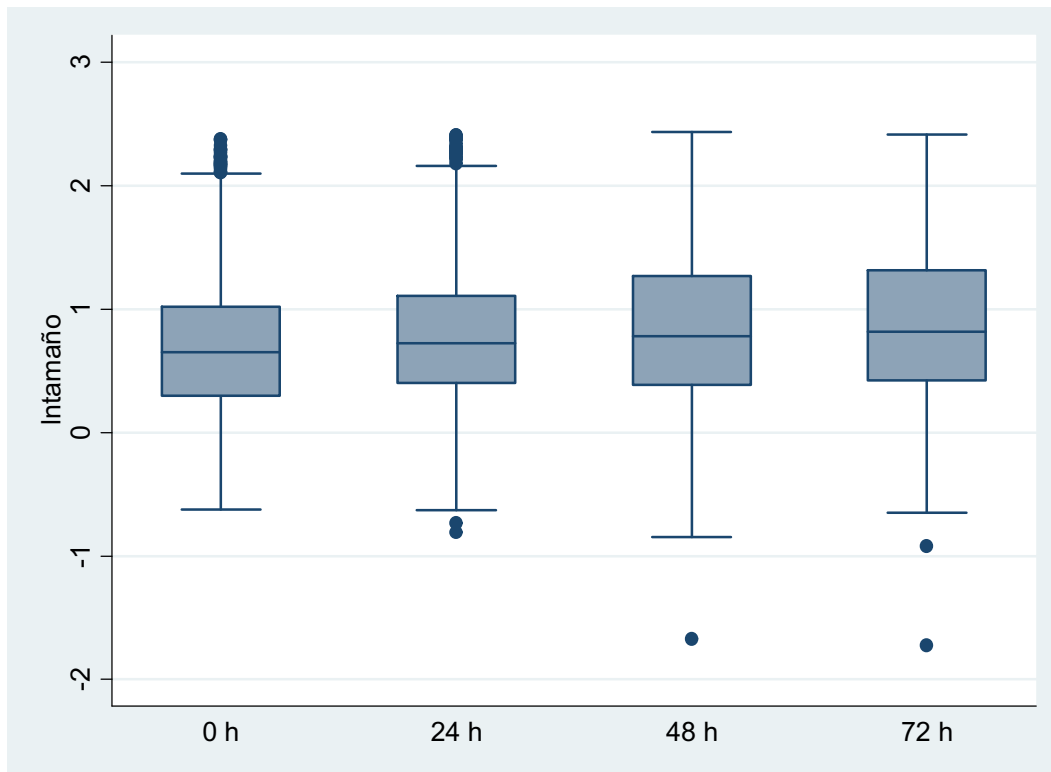
. \* Comparación del ln(tamaño) para CHT(sin/con)



**Figura 8.16** Distribución del logaritmo neperiano del diámetro de gota para los sistemas tensioactivos con Synperonic A7 y con Pluronic® P123 en función de la ausencia (EAC1 y EAC4) y presencia (EAC2 y EAC5) de quitosano.

```
. ranksum Intamaño, by(CHT)
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CHT |      obs   rank sum   expected
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Sin CHT |      6452  59935427  43560678
Con CHT |      7050  31223326  47598075
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
combined |     13502  91158753  91158753
unadjusted variance   5.118e+10
adjustment for ties   -45948.601
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
adjusted variance     5.118e+10
Ho: Intamaño(CHT==Sin CHT) = Intamaño(CHT==Con CHT)
      z = 72.378
Prob > |z| = 0.0000
```

. \* Comparación del ln(tamaño) para Tiempo (0/24/48/72 horas)



**Figura 8.17** Distribución del logaritmo neperiano del diámetro de gota para los sistemas tensioactivos con Synperonic A7 y con Pluronic® P123 en función del tiempo: 0, 24, 48 y 72 h.

```

kwallis lntamaño, by(Tiempo)
Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test
+-----+
| Tiempo | Obs | Rank Sum |
+-----+-----+
| 0 h | 3491 | 2.12e+07 |
| 24 h | 3340 | 2.24e+07 |
| 48 h | 3351 | 2.34e+07 |
| 72 h | 3320 | 2.42e+07 |
+-----+-----+
chi-squared = 184.858 with 3 d.f.
probability = 0.0001
chi-squared with ties = 184.858 with 3 d.f.
probability = 0.0001
    
```

Se Comparan 2 a 2 los Tiempos con el contraste de la Suma de Rangos de Wilcoxon (6 comparaciones)

```

. * Comparación 0h con 24 horas
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

      Tiempo |      obs      rank sum      expected
-----+-----+-----+-----+
      0 h |      3491      11335525      11925256
      24 h |      3340      11999171      11409440
-----+-----+-----+-----+
      combined |      6831      23334696      23334696
unadjusted variance 6.638e+09
adjustment for ties -8166.4537
-----+-----+-----+
adjusted variance 6.638e+09
Ho: lntamaño(Tiempo==0 h) = lntamaño(Tiempo==24 h)
      z = -7.238
      Prob > |z| = 0.0000
    
```

**. \* Comparación 0h con 48 horas**

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

Tiempo	obs	rank sum	expected
0 h	3491	11145886	11944457
48 h	3351	12264018	11465447
combined	6842	23409903	23409903

unadjusted variance 6.671e+09  
 adjustment for ties -6873.1261  
 -----  
 adjusted variance 6.671e+09  
 Ho: lntamaño(Tiempo==0 h) = lntamaño(Tiempo==48 h)  
 z = -9.777  
 Prob > |z| = 0.0000

**. \* Comparación 0h con 72 horas**

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

Tiempo	obs	rank sum	expected
0 h	3491	10860121	11890346
72 h	3320	12338145	11307920
combined	6811	23198266	23198266

unadjusted variance 6.579e+09  
 adjustment for ties -7630.0584  
 -----  
 adjusted variance 6.579e+09  
 Ho: lntamaño(Tiempo==0 h) = lntamaño(Tiempo==72 h)  
 z = -12.701  
 Prob > |z| = 0.0000

**. \* Comparación 24h con 48 horas**

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

Tiempo	obs	rank sum	expected
24 h	3340	10922615	11175640
48 h	3351	11465472	11212446
combined	6691	22388086	22388086

unadjusted variance 6.242e+09  
 adjustment for ties -7445.9677  
 -----  
 adjusted variance 6.242e+09  
 Ho: lntamaño(Tiempo==24 h) = lntamaño(Tiempo==48 h)  
 z = -3.203  
 Prob > |z| = 0.0014

**. \* Comparación 24h con 72 horas**

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

Tiempo	obs	rank sum	expected
24 h	3340	10631724	11123870
72 h	3320	11549406	11057260
combined	6660	22181130	22181130

unadjusted variance 6.155e+09  
 adjustment for ties -8720.4808  
 -----  
 adjusted variance 6.155e+09  
 Ho: lntamaño(Tiempo==24 h) = lntamaño(Tiempo==72 h)  
 z = -6.273  
 Prob > |z| = 0.0000

```

. * Comparación 48h con 72 horas
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

      Tiempo |      obs      rank sum      expected
-----+-----
      48 h |      3351     10950026     11178936
      72 h |      3320     11304431     11075520
-----+-----
      combined |      6671     22254456     22254456
unadjusted variance      6.186e+09
adjustment for ties      -7178.7961
-----
adjusted variance      6.186e+09
Ho: lntamaño(Tiempo==48 h) = lntamaño(Tiempo==72 h)
      z =      -2.911
      Prob > |z| =      0.0036
    
```

**Comparaciones Múltiples: False Discovery Rate (FDR)**

```

Method: simes
Uncorrected overall critical P-value: .05
Number of P-values: 6
Corrected overall critical P-value: .05
Number of rejected P-values: 6
    
```

	compar~n	pvalor	posicion	alfa_cr~l	pvalor~o	rechaz~0
1.	T0_24	4.55e-13	3	.025	.05	1
2.	T0_48	1.41e-22	2	.01666667	.05	1
3.	T0_72	5.83e-37	1	.00833333	.05	1
4.	T24_48	.0013614	5	.04166667	.05	1
5.	T24_72	3.54e-10	4	.03333333	.05	1
6.	T48_72	.0036081	6	.05	.05	1

## 8.10 MODELO DE REGRESIÓN LINEAL MÚLTIPLE (Análisis estadístico para los sistemas formados por los tensioactivos Synperonic A7 y Pluronic® P123, en ausencia y presencia de quitosano)

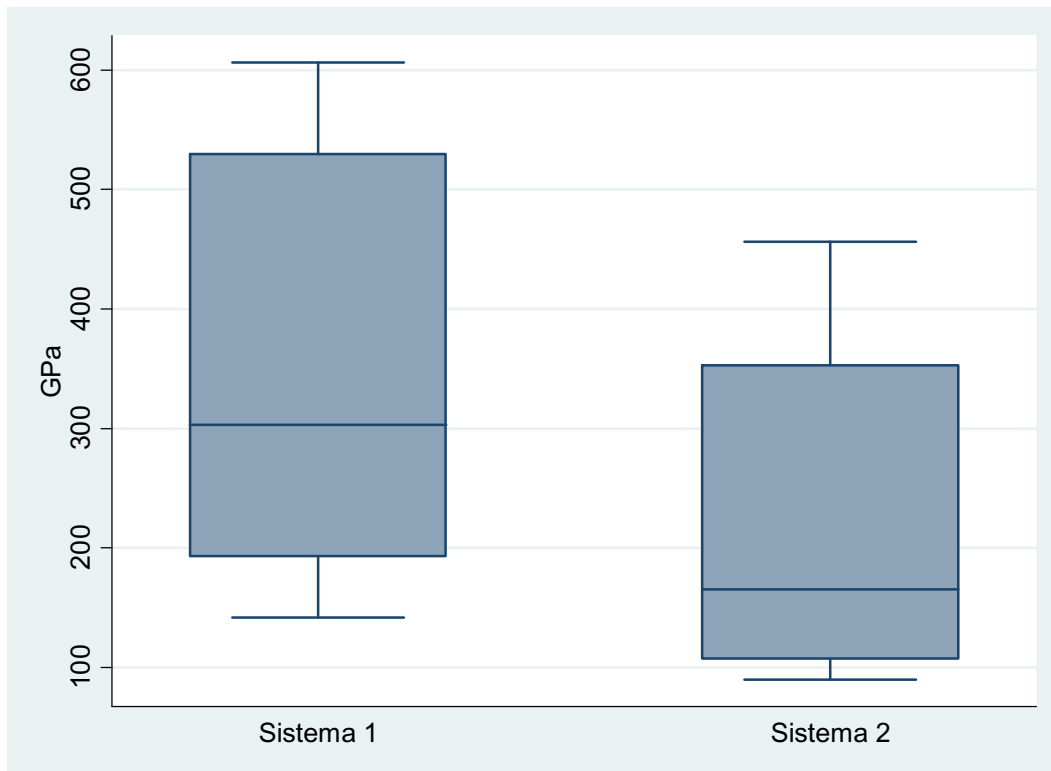
**Tabla 8.3** Coeficientes del modelo de regresión lineal múltiple con los tres factores (presencia de quitosano, concentración de tensioactivo y tiempo) y todas sus interacciones de segundo y tercer orden.

<b>ln(tamaño)</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>Std. Err.</b>	<b>t</b>	<b>P&gt; t </b>	<b>[95% Conf. Interval.]</b>	
<b>Pluronic® P123</b>	0,285	0,024	11,7	0,000	0,237	0,332
<b>siCHT</b>	-0,650	0,021	-31,0	0,000	-0,691	-0,609
<b>24h</b>	0,129	0,027	4,7	0,000	0,076	0,182
<b>48h</b>	0,259	0,030	8,7	0,000	0,200	0,317
<b>72h</b>	0,192	0,030	6,3	0,000	0,132	0,252
<b>Pluronic® P123*siCHT</b>	0,041	0,028	1,5	0,145	-0,014	0,096
<b>Pluronic® P123*24h</b>	-0,046	0,034	-1,4	0,175	-0,113	0,020
<b>Pluronic® P123*48h</b>	-0,080	0,036	-2,2	0,027	-0,151	-0,009
<b>Pluronic® P123*72h</b>	0,042	0,037	1,1	0,263	-0,031	0,115
<b>siCHT*24h</b>	0,150	0,030	5,0	0,000	0,091	0,209
<b>siCHT*48h</b>	0,004	0,033	0,1	0,900	-0,060	0,069
<b>siCHT*72h</b>	0,319	0,034	9,3	0,000	0,251	0,386
<b>Pluronic® *siCHT*24h</b>	-0,319	0,040	-8,0	0,000	-0,397	-0,240
<b>Pluronic® *siCHT*48h</b>	-0,271	0,043	-6,3	0,000	-0,355	-0,186
<b>Pluronic®* siCHT*72h</b>	-0,683	0,044	-15,4	0,000	-0,770	-0,597
<b>_cons</b>	0,859	0,019	45,3	0,000	0,822	0,896



## 8.11 TEST DE WILCOXON Y KRUSKAL-WALLIS (Módulo elástico, $G'_{LVR}$ : Análisis estadístico para los sistemas formados por los tensioactivos Synperonic A7 y Pluronic® P123, en ausencia y presencia de quitosano)

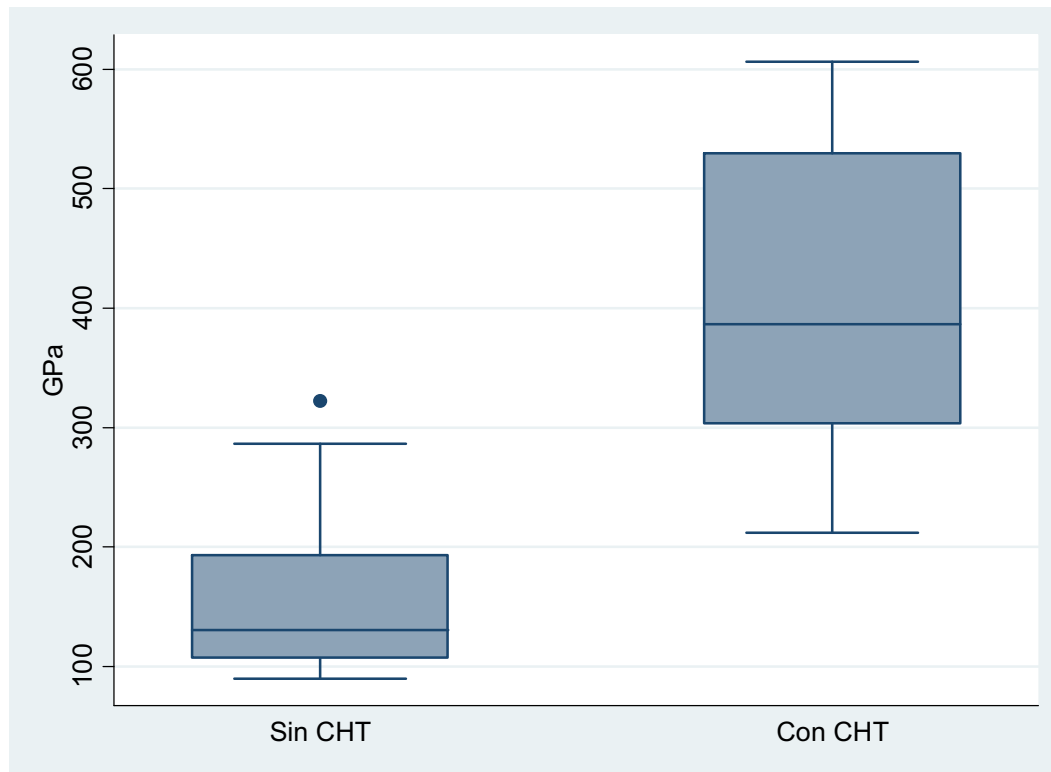
### Comparación del GPa para los dos sistemas



**Figura 8.18** Distribución del módulo elástico para el sistema tensioactivo con Synperonic A7 o Sistema 1 (EAC1 y EAC2 a 700 rpm) y para el sistema tensioactivo con Pluronic® P123 o Sistema 2 (EAC4 y EAC5, al 2 % Pluronic® P123).

```
. ranksum GPa, by(sistema)
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
-----+-----
sistema |      obs   rank sum   expected
-----+-----
Sistema 1 |      28     982     798
Sistema 2 |      28     614     798
-----+-----
combined |      56    1596    1596
unadjusted variance      3724.00
adjustment for ties      0.00
-----+-----
adjusted variance      3724.00
Ho: GPa(sistema==Sistema 1) = GPa(sistema==Sistema 2)
      z = 3.015
      Prob > |z| = 0.0026
```

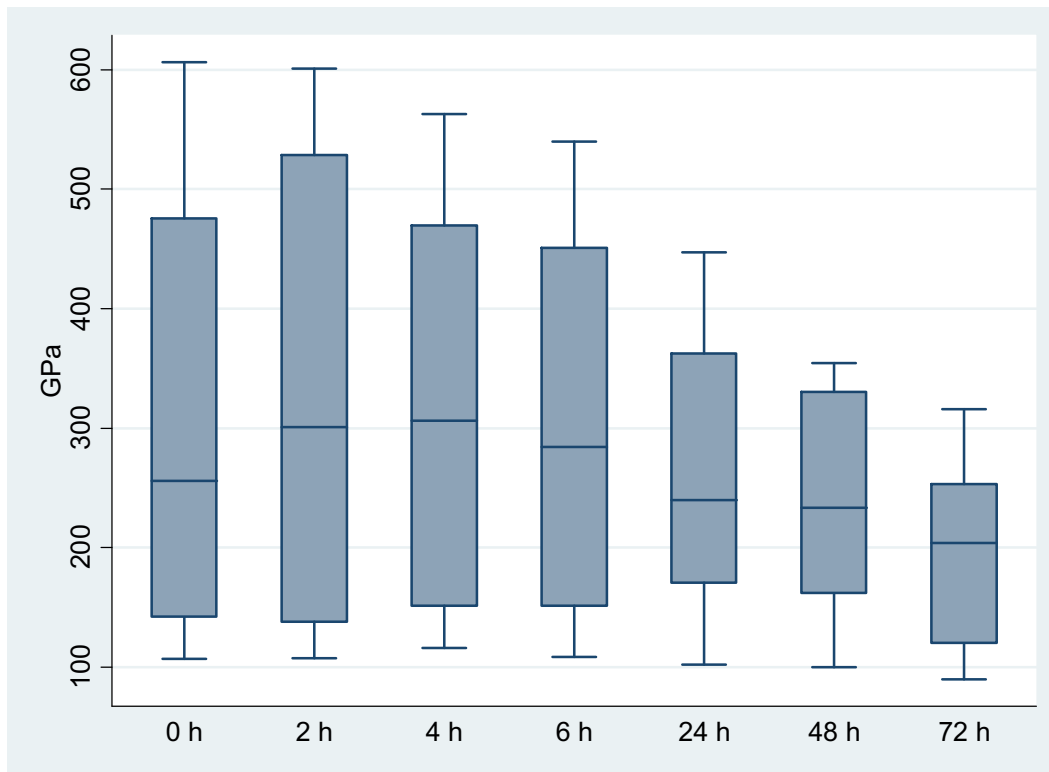
Comparación del GPa para CHT(sin/con)



**Figura 8.19** Distribución del módulo elástico para los sistemas tensioactivos con Synperonic A7 y con Pluronic® P123 en función de la ausencia (EAC1 y EAC4) y presencia (EAC2 y EAC5) de quitosano.

```
. ranksum GPa, by(CHT)
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
      CHT |      obs      rank sum      expected
-----+-----
      Sin CHT |      28          429          798
      Con CHT |      28          1167          798
-----+-----
      combined |      56          1596          1596
unadjusted variance      3724.00
adjustment for ties      0.00
-----+-----
adjusted variance      3724.00
Ho: GPa(CHT==Sin CHT) = GPa(CHT==Con CHT)
      z = -6.047
      Prob > |z| = 0.0000
```

## Comparación del GPa para Tiempo (0/24/48/72 horas)



**Figura 8.20** Distribución del módulo elástico para los sistemas tensioactivos con Synperonic A7 y con Pluronic® P123 en función del tiempo: 0, 2, 4, 6, 24, 48 y 72 h.

```
. kwallis GPa, by(Tiempo)
Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test
+-----+
| Tiempo | Obs | Rank Sum |
+-----+-----+
| 0 h | 8 | 241.00 |
| 2 h | 8 | 257.00 |
| 4 h | 8 | 261.00 |
| 6 h | 8 | 246.00 |
| 24 h | 8 | 226.00 |
+-----+-----+
| 48 h | 8 | 207.00 |
| 72 h | 8 | 158.00 |
+-----+-----+
chi-squared = 3.650 with 6 d.f.
probability = 0.7239
chi-squared with ties = 3.650 with 6 d.f.
probability = 0.7239
```

## 8.12 PUBLICACIONES

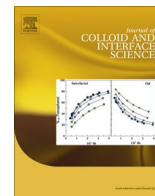
Parte del trabajo presentado en esta tesis ha dado como resultado la publicación de dos artículos, en los cuales J. Miras aparece como primer autor, y una patente:

1. J. Miras, S. Vílchez, C. Solans, J. Esquena, Chitosan macroporous foams obtained in highly concentrated emulsions as templates, *Journal of Colloid and Interface Science*, 410, 33-42, **2013**.
2. J. Miras, S. Vílchez, C. Solans, Th. Tadros, J. Esquena, Kinetics of chitosan hydrogel formation in high internal phase oil-in-water emulsiones (HIPEs) using viscoelastic measurements, *Soft Matter*, 9, 8678-8686, **2013**.
3. J. Esquena, C. Solans, S. Vílchez, P. Erra, J. Miras, Materiales poliméricos macroporosos y meso/macroporosos obtenidos en emulsiones concentradas y altamente concentradas, *Patente P200930038*, **2009**.

Otras publicaciones relacionadas con sistemas basados en emulsiones altamente concentradas, en las que J. Miras aparece como coautor contribuyendo en las mediciones experimentales:

4. M.M. Alam, J. Miras, L.A. Pérez-Carrillo, S. Vílchez, C. Solans, T. Imae, M. Ujihara, J. Esquena, Facile synthesis of dual micro/macroporous carbonaceous foams by templating in highly concentrated water-in-oil emulsions, *Microporous and Mesoporous Materials*, 182, 102-108, **2013**.
5. S. Vílchez, L.A. Pérez-Carrillo, J. Miras, C. Solans, J. Esquena, Oil-in-alcohol highly concentrated emulsions as templates for the preparation of macroporous materials, *Langmuir*, 28, 7614-7621, **2012**.

A continuación, se incluyen los dos artículos que incluyen resultados de la presente tesis.



# Chitosan macroporous foams obtained in highly concentrated emulsions as templates



Jonathan Miras, Susana Vílchez, Conxita Solans, Jordi Esquena\*

Institute for Advanced Chemistry of Catalonia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IQAC-CSIC) and CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Jordi Girona, 18-26, 08034 Barcelona, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 19 April 2013

Accepted 30 July 2013

Available online 12 August 2013

### Keywords:

Highly concentrated emulsion

Chitosan

Genipin

Solid foam

Template

## ABSTRACT

Emulsion templating is an effective route for the preparation of macroporous polymer foams, with well-defined pore structures. This kind of material is usually obtained by polymerization or crosslinking in the external phase of highly concentrated emulsions. The present article describes the synthesis of macroporous foams based on a cationic polymer, chitosan, crosslinked with genipin, a natural crosslinker. The phase behavior was used to study the influence of chitosan on surfactant self-aggregation. Hexagonal and lamellar liquid crystalline structures could be obtained in the presence of chitosan, and polymer did not greatly influence the geometric lattice parameters of these self-aggregates. O/W highly concentrated emulsions were obtained in the presence of chitosan in the continuous phase, which allowed reducing both droplet size and polydispersity. The emulsions were stable during the time required for crosslinking, obtaining macroporous foams with high pore volume and degree of crosslinking.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Highly porous polymeric foams, known as polyHIPEs [1], are usually defined as macroporous polymers foams obtained by polymerization or crosslinking in the external phase of highly concentrated emulsions, which are also designated internal phase emulsions (HIPEs). Since the internal phase volume fraction of highly concentrated emulsions is higher than 0.74, they consist of polyhedral droplets, typically in the range of a few microns, separated by a thin film of continuous phase [2–4].

A wide variety of organic highly porous materials have been obtained via concentrated emulsion polymerization, using monomers such as styrene [1,5,6], styrene/divinylbenzene [7–14], divinylbenzene/ethylvinylbenzene, polyacrylamide, and alkyl methacrylates [8–11,15]. These solid foams, based on organic polymers, are very attractive because of their low density and unique interconnected pore structure. For these reasons, they have found successful applications as supports for catalysts, immobilization of enzymes, selective membranes, and templates for the preparation of other materials, etc. Biodegradable and biocompatible foams would be of interest for biomedical applications such as drug delivery and tissue engineering. To this end, foams containing biocompatible polymers have already been synthesized [16].

In the present work, chitosan foams have been obtained using oil-in-water highly concentrated emulsions as templates. Chitosan is a cationic biopolymer obtained by alkaline deacetylation of chitin. Chitin and chitosan are formed by units of *N*-acetyl-*D*-glucosamine and *D*-glucosamine joined by  $\beta$ -[1 → 4] links. The *D*-glucosamine ratio for chitosan is higher than 60% [17]. Chitosan has been extensively used in the last decades as pH-response polymer in different forms, such as membranes, films, hydrogels, fibers, or sponges, to cover a wide range of applications in agriculture, water and waste treatments, food and beverages, cosmetics, and biopharmaceutics [17]. Nowadays, recent literature has been focused on the use of chitosan in the form of beads, micro/microparticles or hydrogels for water and waste treatments [18–21] and for biomedical or pharmaceutical applications [22–26]. However, in the case of hydrogels, procedures to synthesize porous materials with large pore volumes, controlling porosity and pore size distributions, have not been deeply described in the literature. In this context, the use of highly concentrated emulsions, as templates, could be a very versatile approach for the preparation of porous biopolymer materials with controlled pore size. Materials obtained with this technique may combine the advantages of hydrogels (for instance, pH- or thermoresponsive properties) with the ability of soft-templating to tune pore size distribution. This could also allow tailoring and/or enhancing the adsorption abilities or drug delivery kinetics in such materials.

Soft-templating in highly concentrated emulsions has already been applied for the synthesis of porous biopolymers, by using supercritical CO<sub>2</sub>-in-water emulsions [27–30]. This strategy allows

\* Corresponding author. Tel: +34 93 400 61 78, Fax: +34 93 204 59 04.

E-mail addresses: [jonathan.miras@iqac.csic.es](mailto:jonathan.miras@iqac.csic.es) (J. Miras), [susana.vilchez@iqac.csic.es](mailto:susana.vilchez@iqac.csic.es) (S. Vílchez), [conxita.solans@iqac.csic.es](mailto:conxita.solans@iqac.csic.es) (C. Solans), [jordi.esquena@iqac.csic.es](mailto:jordi.esquena@iqac.csic.es) (J. Esquena).

obtaining materials with narrow pore size distributions. However, in gas–liquid dispersions, it is difficult to obtain pore sizes smaller than 2  $\mu\text{m}$ . The use of oil-in-water (O/W) highly concentrated emulsions is a suitable method to obtain different pore size distributions, from macroporous to mesoporous materials. For this reason, the present work is focused in these systems for the preparation of biocompatible porous materials.

In the specific case shown in this paper, chitosan has been incorporated into the continuous phase of O/W highly concentrated emulsions, and porous materials have been obtained after crosslinking and removal of the dispersed phase. The resulting materials may have many potential applications in food, cosmetics, and pharmaceutical industries because of its unique physicochemical properties: biocompatibility, biodegradability, non-toxicity, antibacterial properties, low cost, biologically inert and safe for human use [17,31–35].

Different compounds such as glutaraldehyde, formaldehyde, and epoxy compounds can be used to crosslink chitosan. However, they present toxicity problems that may prevent their use in the biomedical field. For this reason, a natural crosslinking reagent, genipin, has been used to covalently crosslink chitosan. It is about 5000–10,000 times less cytotoxic than glutaraldehyde [36]. In recent years, biocompatible crosslinking agents have received much interest in the field of biomedical applications, and genipin has been used to crosslink amino-group-containing biomaterials [35,37–45].

Chitosan-based highly porous monolithic materials, with controlled macroscopic shape, can be obtained in highly concentrated emulsions, as described recently for the preparation of chitosan/polycaprolactone hydrogel composite foams [46]. In this work, the emulsions were prepared by ultrasonication-induced phase inversion, and non-crosslinked porous foams were obtained by freeze-drying. This emulsification method resulted in very large macropores (between 60 and 140  $\mu\text{m}$ ), and the control of the final porous texture is difficult. In another work, chitosan porous monolithic materials were obtained by emulsion templating using  $\text{CO}_2$ -in-water concentrated emulsions [28]. The above works demonstrate that chitosan foams, with controlled pore volume and macropore size, can be prepared by tuning appropriately the emulsion volume fraction and the droplet size, respectively. However, a simple novel method for the preparation of macroporous chitosan foams, with large pore volume and small macropores, has been described by our group [16]. It consists in the incorporation of chitosan polymer in the external phase of highly concentrated emulsions. This strategy would allow obtaining monolithic chitosan materials with controlled porous texture. Moreover, the addition of a crosslinker can greatly reduce the foam solubility in acidic solutions, and thus, preserving the morphology of the monoliths. For this reason, the aim of the present work is to obtain highly porous chitosan foams by a simple single-step method, by crosslinking with a much less toxic reagent, in the external phase of highly concentrated emulsions. For this purpose, genipin has been used for the preparation of porous chitosan foams.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Nonionic surfactant Synperonic A7 ( $\text{C}_{13-15}\text{OE}_7$ ), with HLB of 12.2, was obtained from Uniqema. Decane with 98% purity was from Fluka. Chitosan medium molecular weight with 85% deacetylation degree was from Sigma–Aldrich. The crosslinker genipin with an average molecular weight of 226 g/mol was from Challenge Bioproducts Co. (Taiwan), and acetic acid ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) was purchased from Panreac. Deionized and filtered water (Ultra-pure

Millipore water system, Milli-Q<sub>plus</sub> 185 filter, pH = 6.55 at 25 °C) and phosphate buffer solution pH = 7.4 were used for the preparation of the solutions.

### 2.2. Phase diagrams

Equilibrium phase diagrams of the binary systems water/Synperonic A7, chitosan solution/Synperonic A7, phosphate buffer solution/Synperonic A7, and the ternary system chitosan solution/Synperonic A7/decane/phosphate buffer solution were studied. The aqueous chitosan solution was prepared by dissolving 2% w/v chitosan in 1 vol% acetic acid. This solution was shaken overnight to ensure formation of an homogeneous solution. Appropriate amounts of the different components were weighed in tubes, which were flame-sealed. Narrow constriction glass tubes were used for viscous samples, which were mixed by repeated centrifugation. These samples were kept at constant temperature into thermostated baths until equilibrium was reached. The different phases were first identified by visual inspection of samples through crossed polarizers. When temperature was changed, samples were agitated again until completely homogenized. Phases at a particular temperature were further analyzed by small-angle X-ray scattering (SAXS). These spectra were obtained in a HECUS S3-Micro Instrument, from a  $\text{Cu K}\alpha$  radiation (wavelength 1.542 Å) source, and scattering was recorded in a PSD detector. The generator was operated at 50 kV and 1 mA. The samples were placed in glass capillaries 1 mm thick. SAXS spectra allowed to obtain the repeat distance ( $d$ ) and the area per molecule ( $a_s$ ) of the liquid crystalline phases. For hexagonal and lamellar liquid crystalline structures, the repeat distance and area per molecule were calculated (Eqs. (1)–(3) for lamellar and Eqs (2) and (4) for hexagonal) [47].

$$d_{\text{Lamellar}} = 2\pi/q \quad (1)$$

$$d_{\text{Hexagonal}} = 4\pi/\sqrt{3} \cdot q \quad (2)$$

where  $q$  is the scattering vector corresponding to the first order peak.

$$a_{s,\text{Lamellar}} = \frac{v_L}{d_L} \quad (3)$$

$$a_{s,\text{Hexagonal}} = \frac{2v_L}{r_H} \quad (4)$$

where  $v_L$  is the volume of the hydrophobic part in the surfactant molecule,  $d_L$  Eq. (5) is the half-thickness of the hydrophobic part for lamellar liquid crystals, and  $r_H$  Eq. (6) is the radius of the hydrophobic core for hexagonal liquid crystals.

$$d_L = \frac{d_{\text{Bragg}}}{2} \phi_L \quad (5)$$

$$r_H = \left\{ \frac{2}{\sqrt{3}} \phi_L \right\}^{1/2} \cdot d_{\text{Bragg}} \quad (6)$$

$$d_{\text{Bragg}} = 2\pi/q \quad (7)$$

where  $\phi_L$  is the volume fraction of the hydrophobic part of surfactant and  $d_{\text{Bragg}}$  Eq. (7) is the Bragg distance ( $d$ -spacing) for liquid crystal structures.

### 2.3. Preparation of highly concentrated emulsions

In a typical experiment, oil-in-water highly concentrated emulsions were prepared by dropwise addition of 120 g decane to 16.5 g of a mixture composed of 3 g Synperonic A7 surfactant

and 13.5 g of 2 wt% chitosan solution, at 25 °C with mechanical stirring. Finally, 13.5 g of genipin aqueous solution (1 wt%) was added just after decane. The genipin solutions were freshly prepared before use, in phosphate buffer at pH = 7.4.

#### 2.4. Characterization of highly concentrated emulsions

Droplet size distributions from highly concentrated emulsions were determined by two techniques, optical microscopy, and laser diffraction. The size and the polydispersity of emulsions were studied as a function of time during 72 h, in order to evaluate the stability at two different temperatures, 25 and 40 °C.

##### 2.4.1. Optical microscopy

Emulsions were observed with a Reichert Polyvar 2 microscope, supplied by Leica (Germany), equipped with a video camera (Sony CCD-Iris), and polarization filters. Images were processed using the IM500 software supplied by Leica. The droplet size distributions were obtained by sizing 750 randomly selected droplets from several micrographs, acquired using an oil-immersion objective ( $\times 100$  magnification). An image analysis software (Image J) was used for statistic analysis, to calculate the droplet size distributions (expressed in number of droplets (%)), the average droplet size in number distribution,  $\mu$ , Eq. (8) and the polydispersity,  $\sigma^2/\mu$ , expressed as the variance,  $\sigma^2$ , relative to the average in number distribution Eq. (9).

$$\mu = \frac{1}{N} \sum x_i \quad (8)$$

where  $N$  is the number of droplets and  $x_i$  is its diameter ( $\mu\text{m}$ ).

$$\sigma^2/\mu = \frac{\sum (x_i - \mu)^2}{\sum x_i} \quad (9)$$

Moreover, the droplet size distributions as a function of droplet volume (%) were obtained, and the de Brouckere mean diameter,  $D[4,3]$ , Eq. (10), and the polydispersity expressed as *Span*, Eq. (11), were calculated from the size distribution.

$$D[4,3] = \sum d^4 / \sum d^3 \quad (10)$$

where  $d$  is the droplet diameter ( $\mu\text{m}$ )

$$\text{Span} = \frac{d(0.9) - d(0.1)}{d(0.5)} \quad (11)$$

where  $d(0.1)$ ,  $d(0.5)$ , and  $d(0.9)$  are the cumulative volume distributions at 10%, 50%, and 90%, respectively.

##### 2.4.2. Laser diffraction

Emulsions were diluted with Synperonic A7 solution at the critical micelle concentration (CMC), 0.026 g/L, in order to prevent multiple scattering and emulsion destabilization. The particle size distributions of the highly concentrated emulsions (expressed in vol%) were obtained by laser diffraction using a Mastersizer 2000 equipped with a Hydro 2000G dispersion unit. The average droplet size,  $D[4,3]$ , Eq. (10), and the polydispersity, Eq. (11), were calculated from the values of the particle size distribution. This characterization has been performed by the Nanostructured Liquid Characterization Unit of the Spanish National Research Council (CSIC) and the Biomedical Networking Center (CIBER-BBN), located at IQAC-CSIC.

##### 2.4.3. Rheological measurements

Emulsions were characterized using an AR-G2 controlled stress rheometer (TA Instruments). Their viscosity was measured immediately after preparation of emulsions ( $t = 0$  h) at 25 °C using a steady state flow procedure. Parallel plate geometry with diameter

of 20 mm with solvent trap was used to avoid evaporation. Measurements were carried out with a gap of 1000  $\mu\text{m}$ . This characterization has been also performed by the Nanostructured Liquid Characterization Unit of the Spanish National Research Council (CSIC) and the Biomedical Networking Center (CIBER-BBN).

#### 2.5. Preparation of chitosan foams

Emulsions, prepared with chitosan polymer and genipin crosslinker, were kept in a water bath for 3 days at 40 °C. Then, resulting chitosan foams were purified by soxhlet solvent extraction with ethanol and water for 12 h in each solvent. Finally, residual water was removed from chitosan foams by freeze-drying. The crosslinking percentage of chitosan foams, Eq. (12), was calculated by an additional soxhlet extraction for 48 h using a 5 wt% acetic acid solution as extracting solvent [48].

$$\text{Crosslinking percentage(\%)} = \left(1 - \frac{w}{w_0}\right) \times 100 \quad (12)$$

where  $w_0$  and  $w$  are the weight before and after soxhlet extraction, respectively.

#### 2.6. Characterization of chitosan porous materials

After freeze-drying, the final chitosan foams were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM), Helium pycnometry, and Nitrogen sorption isotherms.

##### 2.6.1. Scanning electron microscopy (SEM)

Samples were coated by sputtering with gold. Scanning electron micrographs were obtained using a Hitachi 4100 microscope, operated at 15 kV.

##### 2.6.2. Helium pycnometry

Matrix or skeletal density of macroporous foams was determined using a Helium Micromeritics AccuPyc 1330 pycnometer. The average density was calculated by means of the measurement of four replicas. The total pore volume,  $V_p$ , which includes all volume of meso- and macropores, was calculated from the weight and the volume of chitosan monoliths, Eq. (13).

$$V_p = \frac{\left(V_T - \frac{M}{\rho}\right)}{M} \quad (13)$$

where  $V_T$  is the total volume,  $M$  is the weight, and  $\rho$  is the skeletal density of chitosan monoliths, measured by helium pycnometry.

##### 2.6.3. Nitrogen sorption isotherms

Samples were outgassed at 55 °C for 12 h and weighed prior sorption experiments. Adsorption and desorption isotherms were obtained using a Quantachrome Autosorb-iQ porosimeter. The Brunauer–Emmett–Teller method (BET) [49] was applied to calculate the specific surface area, from the adsorption curve. Nitrogen sorption isotherms were performed by duplicate, and the average surface area was calculated.

### 3. Results and discussion

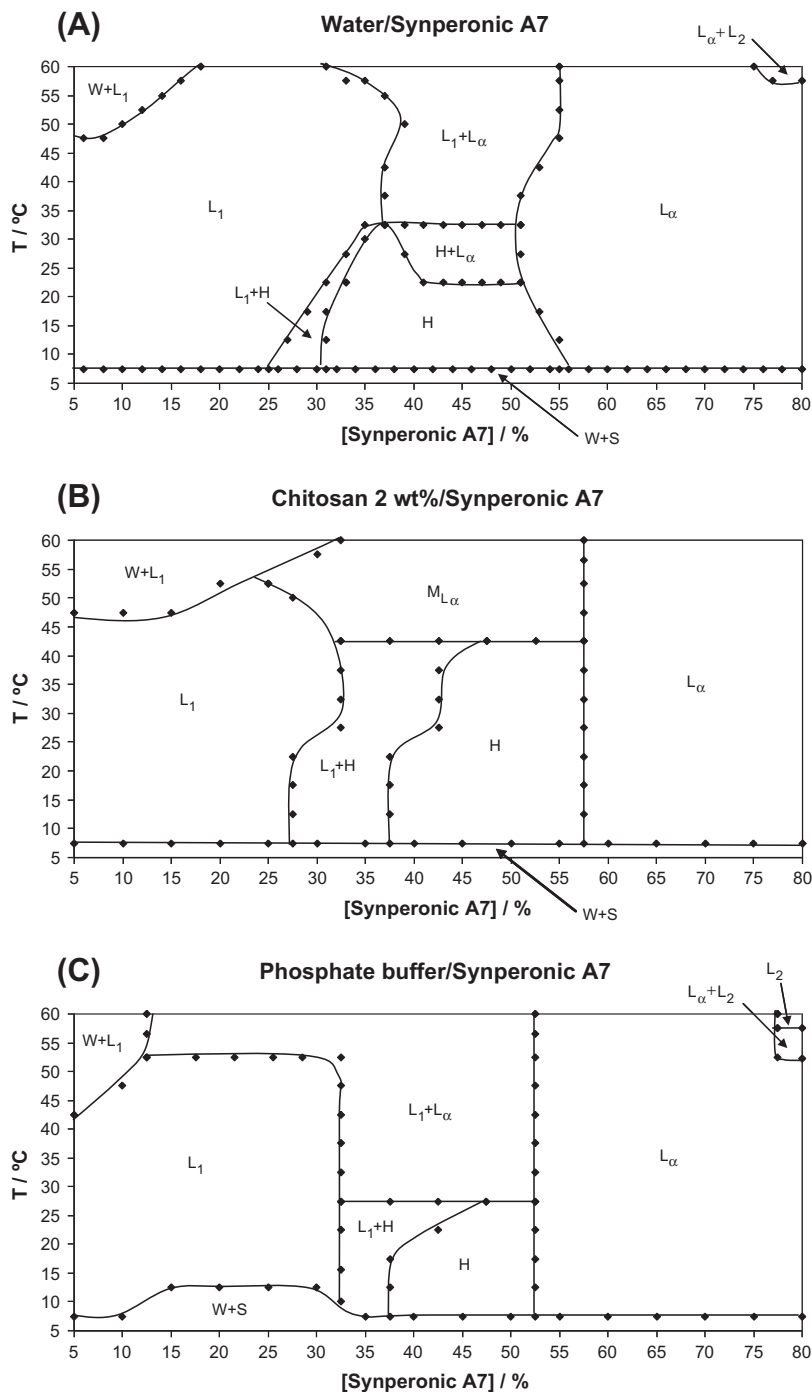
#### 3.1. Phase behavior

Preliminary experiments showed that the addition of chitosan to O/W emulsions had a great impact on emulsion properties, increasing emulsion viscosity, as expected. Considering that chitosan is a charged molecule (depending on pH), with large molecular weight, one could presume that this molecule may interact with surfactant, influencing self-aggregation. Therefore, phase behavior

studies were carried out before emulsion formation, obtaining information about possible interactions between surfactant and chitosan.

The phase behavior of the water/Synperonic A7 has been studied, and the influence of chitosan and buffer solution has been evaluated in the range of Synperonic A7 concentration up to 80 wt% and between 5 and 60 °C. The Synperonic A7 surfactant was selected because it is hydrophilic (HLB = 12.2), liquid at room temperature and forms a variety of different self-aggregates in water [50]. The pseudobinary phase diagram of water/Synperonic A7 system, as a function of surfactant concentration and temperature, is shown in Fig. 1A. Below approximately 10 °C, an isotropic

liquid phase coexists with hydrated solid surfactant at all surfactant concentrations ( $W + S$ ). Above  $\approx 10$  °C, three monophasic regions were observed. Below 30 wt% surfactant, an isotropic liquid region, consisting in a micellar solution, appears in a large temperature range. At higher surfactant concentrations (between 35 and 55 wt%), an hexagonal liquid crystalline phase (H) was formed, melting at  $\approx 25$  °C. When increasing further the surfactant concentration ( $>50$  wt%), a lamellar liquid crystal ( $L_\alpha$ ) was observed in a wide range of temperatures. In addition, five different biphasic regions were detected: (a) two coexisting isotropic liquid phases ( $W + L_1$ ) at low surfactant concentrations and at temperatures higher than 47 °C (cloud point), (b) micellar solution and



**Fig. 1.** Phase diagrams as a function of surfactant concentration and temperature for the systems water/Synperonic A7 (A), chitosan solution/Synperonic A7 (B) and phosphate buffer solution/Synperonic A7 (C).  $L_1$ : micellar solution, H: hexagonal liquid crystal,  $L_2$ : lamellar liquid crystal,  $L_\alpha$ : inverse micellar solution, W: aqueous phase,  $M_{L_\alpha}$ : multiphasic zone with the presence of lamellar liquid crystal and S: hydrated solid surfactant.



hexagonal liquid crystalline phases ( $L_1 + H$ ) in a narrow region of Synperonic A7 concentration below 30 °C, (c) two coexisting anisotropic liquid crystalline phases ( $H + L_\alpha$ ) between 22 and 30 °C, (d) another biphasic region with an isotropic solution and a lamellar liquid crystalline phases ( $L_1 + L_\alpha$ ) above 30 °C, at approximately the same Synperonic A7 concentration, and (e) a small biphasic region characterized by the presence of lamellar liquid crystal and inverse micellar solution ( $L_\alpha + L_2$ ) at the highest surfactant concentration and temperature, 80 wt% and 60 °C.

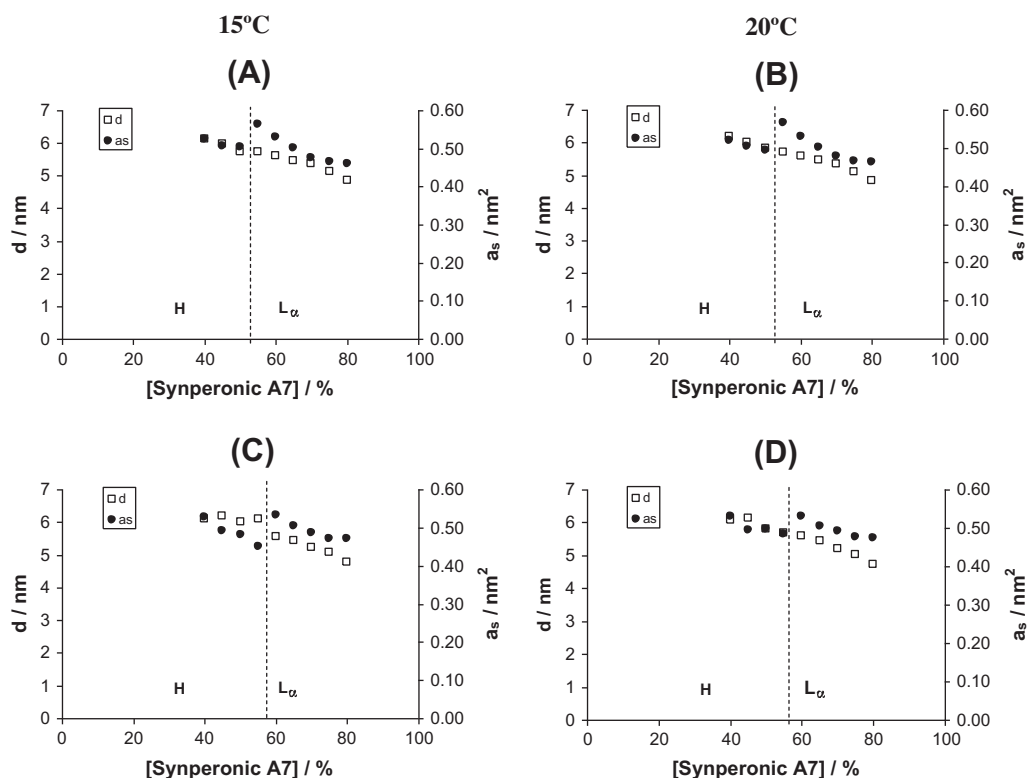
The main features were in agreement with those reported in the literature [50]. However, the biphasic regions ( $L_1 + H$ ,  $H + L_\alpha$ , and  $L_1 + L_\alpha$ ), which could be expected according to the phase rule, were not described in that previous paper. In the present work, these biphasic regions have been detected, except for the  $H + L_\alpha$  region (Fig. 1B and C). Most likely, this is a rather narrow area in the phase diagram, which is not easy to observe. The slight differences in the extent of the phases between phase diagrams reported in the literature [50], and the diagrams show in the present paper could be due to impurities in these commercial surfactants, which from batch to batch can produce small differences in the phase behavior.

When chitosan (Fig. 1B) or phosphate buffer (Fig. 1C) was added to the previous system, no great differences were observed in the phase behavior. The same main regions were observed at similar surfactant concentrations. However, a slight shrinkage of the isotropic micellar region ( $L_1$ ) was observed, and the hexagonal liquid crystalline phase (H) shifted to higher Synperonic A7 concentration and temperature. The main differences could be observed in biphasic regions. The regions  $W + S$  and  $L_1 + H$  increased and the region  $H + L_\alpha$  decreased with the incorporation of chitosan or phosphate buffer. Regarding the multiphasic region with presence of lamellar liquid crystal ( $M_{L_\alpha}$ ), the phase behavior could not be fully assessed because of slow phase separation, probably due to the higher viscosity in the presence of chitosan. Most likely, the system would separate in  $L_1 + L_\alpha$  after allowing a long time for equilibration.

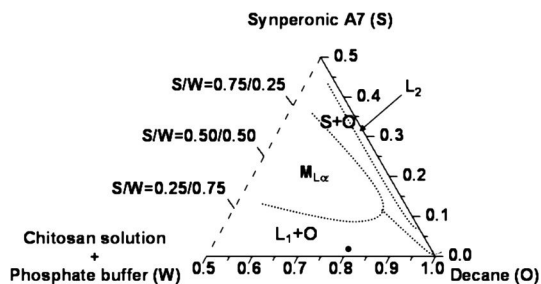
Comparing the three systems (Fig. 1A–C), the fact that incorporation of chitosan does not produce large influence in the phase behavior of the water/Synperonic A7 system, could be due to a number of reasons. First, chitosan most likely does not incorporate into surfactant aggregates and remains mainly in the water domains, and second, the small chitosan concentration (2 wt% in the aqueous solution) may not be enough to disturb the surfactant aggregates. Although this chitosan concentration is low, it was selected since higher amounts were difficult to dissolve. However, these results demonstrate that chitosan did not interact with surfactant aggregates. This fact could open possible applications of chitosan in others surfactant systems, for the preparation of porous materials. This initial hypothesis may show potential applications to obtain meso/macroporous materials by templating in highly concentrated emulsions with a liquid crystal in the emulsion external phase.

In order to confirm whether or not chitosan is incorporated into surfactant aggregates of liquid crystalline phases and to confirm the previous hypothesis, the geometric parameters such as  $d$ -spacing and area per molecule have been determined (Fig. 2). Two different temperatures have been selected 15 and 20 °C, since only around these temperatures, a hexagonal liquid crystal could be formed in both systems.

Fig. 2(A–D) shows that the repeat distance decreased when surfactant concentration increased, as expected, due to a dehydration of the ethoxylated chains [51]. The area per molecule also showed the same trend, a decrease by increasing surfactant concentration, most likely attributed to the same dehydration effect. The repulsive forces between ethoxylated chains decreased, and surfactant molecules become more packed because of higher concentration. Moreover, it can be noticed that in both systems, the transition from hexagonal (H) to lamellar ( $L_\alpha$ ) liquid crystalline structure produces an increase in area per molecule. Regarding the influence of the temperature, both the repeat distance and



**Fig. 2.** Repeat distance ( $d$ ) and area per molecule ( $a_s$ ) of liquid crystalline phases at 15 and 20 °C (A and B) for the systems water/Synperonic A7 and chitosan solution/Synperonic (C and D).



**Fig. 3.** Chitosan solution/Synperonic A7/decane/phosphate buffer ternary phase diagram.  $L_1$ : micellar solution,  $M_{LC}$ : multiphasic region with lamellar liquid crystal,  $L_2$ : inverse micellar solution,  $S$ : hydrated solid surfactant. The black dot indicates the composition used for the preparation of highly concentrated emulsions.

the area per molecule did not vary between 15 and 20 °C, probably due to the narrow temperature difference (Fig. S1 as Supporting information).

These results confirmed the previous assumptions based on the phase diagram determination. The incorporation of chitosan did not produce any influence in both the repeat distance ( $d$ ) and the area per molecule ( $a_s$ ) of the liquid crystalline phases. This result could be attributed, as already mentioned, to the low chitosan concentration used in this study (2 wt%) and also due a lack of penetration of the chitosan chains into the surfactant aggregates. Most likely, chitosan is incorporated into the aqueous domains of liquids crystals. These results encourage us to use, in a future work, highly concentrated emulsions with liquid crystalline structures in the continuous phase. These surfactant structures could allow preparing dual meso/macroporous chitosan materials. Bimodal porous materials possess high specific surface area, from mesopores, and high macropore volume, from macropores [4,52]. This study will be the subject of a future work.

After characterization of binary systems, the ternary phase diagram of the emulsion forming the system chitosan solution/Synperonic A7/decane/phosphate buffer solution (Fig. 3) was determined in the region of high content of decane (>50 wt%) at 40 °C (emulsification was carried out at 40 °C). The objective was to gain information about the surfactant structures formed in the external phase of the highly concentrated emulsions. To the best of our knowledge, any ternary phase diagram in presence of chitosan has not been reported, yet.

Different regions at high decane content (>50 wt%) can be observed in this ternary phase diagram (Fig. 3). In the Synperonic A7/decane axis, a monophasic region of inverse micellar solution ( $L_2$ ) is shown at Synperonic concentrations above 8 wt%. At slightly higher concentrations of the aqueous component (chitosan solution and phosphate buffer), a biphasic region was detected, composed of a hydrated solid surfactant that coexists with an isotropic liquid phase ( $S+O$ ). Between 60 and 80 wt% of decane and at surfactant concentration higher than 10 wt%, a large multiphasic region with lamellar liquid crystalline phase ( $M_{LC}$ ) is observed. Whereas, a biphasic region appears by decreasing the surfactant concentration, which consists in an isotropic micellar solution with decane ( $L_1+O$ ). These results also confirm the presence of a wide liquid crystalline phase observed in the binary diagrams. After the determination of the ternary phase diagram, a composition in the micellar region (2 wt% Synperonic A7, 18 wt% aqueous phase and 80 wt% decane) was selected for the preparation of chitosan macroporous foams. The oil phase content, 80 wt%, was selected since higher volume fraction would reduce the final chitosan content in the porous foams. Moreover, a surfactant concentration of 2 wt% was chosen to use the least amount of surfactant that allowed emulsification. The selected composition is indicated in Table 1.

**Table 1**  
Compositions (wt%) of highly concentrated emulsions.

Emulsion	Surfactant	Aqueous phase	Oil phase
1	2% Synperonic A7	9% Acetic acid (1 wt%), 9% water	80% Decane
2	2% Synperonic A7	9% Chitosan solution (2 wt%), 9% phosphate buffer	80% Decane

### 3.2. Preparation of highly concentrated emulsions

Highly concentrated emulsions were prepared in the presence and absence of chitosan, as described in Experimental section. Their compositions are shown in Table 1.

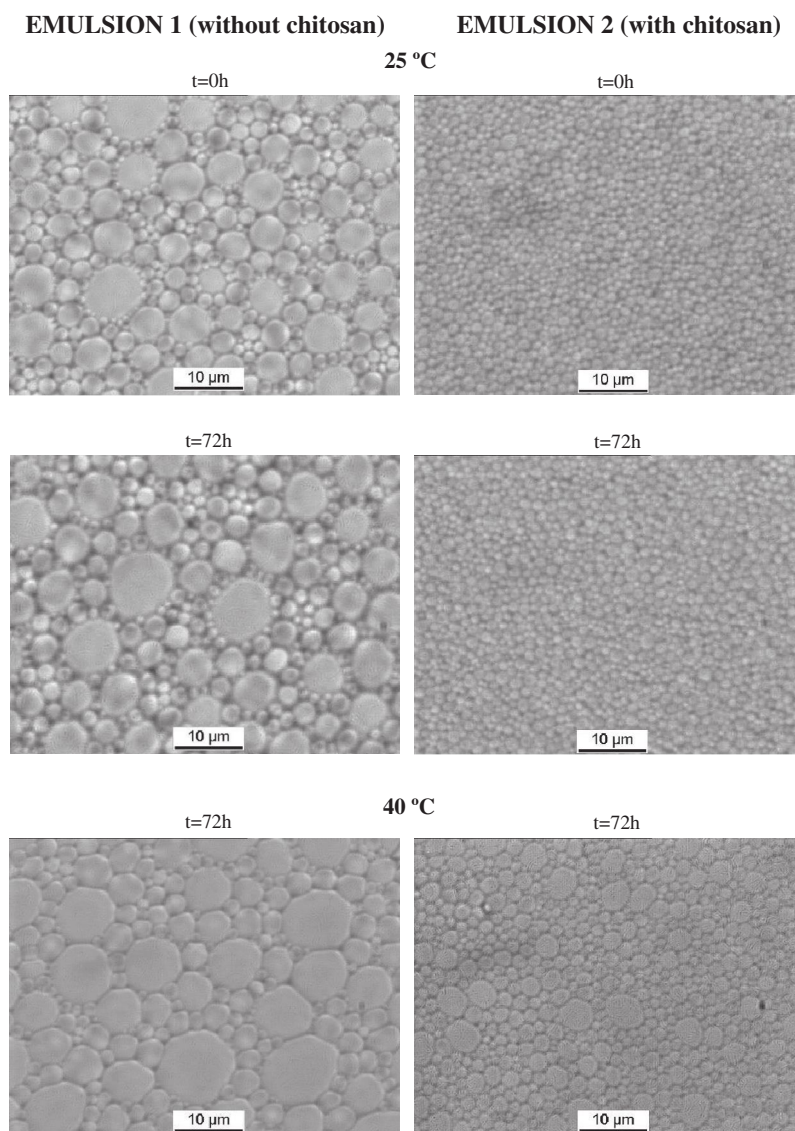
Both emulsions were characterized by optical microscopy and laser diffraction, as a function of time, just after preparation ( $t=0$ ), from  $\approx 0$  h up to 72 h, for two different temperatures, 25 and 40 °C (Fig. 4). The objective was to evaluate the influence of chitosan on the emulsion droplet size and their stability. The incorporation of chitosan produced a significant decrease in the droplet size (Fig. 4). The average droplet size,  $D[4,3]$ , in freshly prepared samples ( $t \approx 0$ ) at 25 °C decreased from 5.2  $\mu\text{m}$  for emulsion 1 (without chitosan) to 1.5  $\mu\text{m}$  for emulsion 2 (with chitosan), as shown in Table 2.

The decrease in droplet size in the presence of chitosan could be explained by its adsorption, which could facilitate emulsification. The influence of chitosan on interfacial tension was measured, at 2 wt% chitosan concentration, in the presence of surfactant (data not shown). The results showed that chitosan did not decrease interfacial tension, demonstrating that chitosan adsorbed poorly on droplets since surfactant molecules have stronger surface affinity. Another factor that could influence droplet size is viscosity, as it will be discussed below.

The influence of chitosan on emulsion stability may depend on various parameters, including volume fraction, droplet surface charge, droplet size, chitosan concentration, pH, and ionic strength [53,54]. The emulsion stability was evaluated as a function of time, at both temperatures, 25 and 40 °C, during 72 h. Emulsions 1 and 2 were stable at 25 °C, since only very small variations in average droplet size and polydispersity were observed after 72 h (Table 2). These emulsions, in the presence of chitosan, showed an increase in droplet size at 40 °C, from 1.5 to 3.4  $\mu\text{m}$  (Table 2).

Table 2 also shows the comparison of the results obtained by using optical microscopy and laser diffraction. Optical microscopy allows a direct measurement of droplet size distribution and does not require any manipulation of the sample (for instance, emulsion dilution). However, the droplet size distributions, obtained by optical microscopy, neglect the fraction of smaller droplets (typically < 1  $\mu\text{m}$ ), since this size is close to the maximum resolution. Nevertheless, a very large number of droplets should be measured, in order to have statistically representative results. On the other hand, laser diffraction method allows measuring smaller droplets, below 1  $\mu\text{m}$ , but dilution of emulsions is required, which may influence the droplet size distribution. These distributions, obtained using these two techniques (both in number and in volume), are shown as Supporting information (Figs. S2–S4).

The incorporation of chitosan produced a decrease in the average droplet size and polydispersity, obtaining a monomodal population (Table 2 and Figs. S3 and S4). The values  $D[4,3]$  and Span are quite similar for both techniques of characterization (optical microscopy and laser diffraction) at 25 °C. The results obtained by laser diffraction of the emulsion kept at 40 °C during 72 h (Supporting information, Fig. S4) indicate that its dilution produced a second population, above 100  $\mu\text{m}$ , probably due to flocculation, and it produced a high increase in average droplet size at 40 °C for 72 h (Table 2). This instability was confirmed by optical micros-



**Fig. 4.** Optical microscopy images of emulsion 1 (without chitosan) and 2 (with chitosan) from time 0 h (25 °C) to 72 h (25 and 40 °C).

**Table 2**

Average droplet size ( $\mu$  or  $D[4,3]$ ) and polydispersity ( $\sigma^2/\mu$  or *Span*) of highly concentrated emulsions 1 and 2. Number and volume distributions were determined by optical microscopy, and volume distribution was determined also by laser diffraction.

			Optical microscopy				Laser diffraction	
			$\mu$ ( $\mu\text{m}$ )	$\sigma^2/\mu$ ( $\mu\text{m}$ )	$D[4,3]$ ( $\mu\text{m}$ )	Span	$D[4,3]$ ( $\mu\text{m}$ )	Span
Emulsion 1 (without chitosan)	T = 25 °C	t = 0 h	2.7	0.8	5.2	1.7	6.0	1.5
		t = 72 h	2.8	0.8	5.3	1.6	6.1	1.5
	T = 40 °C	t = 72 h	3.4	1.1	6.5	1.8	37.1	17.4
Emulsion 2 (with chitosan)	T = 25 °C	t = 0 h	1.3	0.05	1.5	0.7	1.7	1.2
		t = 72 h	1.4	0.06	1.7	0.6	2.5	0.9
	T = 40 °C	t = 72 h	2.2	0.3	3.4	1.0	63.0	62.2

copy observations of the diluted highly concentrated emulsions (Fig. S5 in Supporting information), with and without chitosan.

After comparing both techniques, it can be concluded that optical microscopy observations show more realistic droplet size distributions of highly concentrated emulsions. The dilution of the emulsions, needed to measure them by laser diffraction, produced flocculation.

The decrease in droplet size, produced by chitosan addition, could be due to the higher viscosity of the continuous phase, induced by

addition of the polymer. The higher viscosity can increase stress during emulsification (the stress is given by the product of velocity gradient and the viscosity), reducing droplet size if agitation velocity is kept constant, as described in the literature [55–57]. Several reports have described that the main parameters that govern the viscoelastic properties of a highly concentrated emulsion are the dispersed phase volume fraction ( $\phi$ ) and the droplet size [58–60]. In the current work, both emulsions in presence and absence of chitosan were prepared at constant volume fraction of dispersed phase ( $\phi = 0.8$ ) and constant

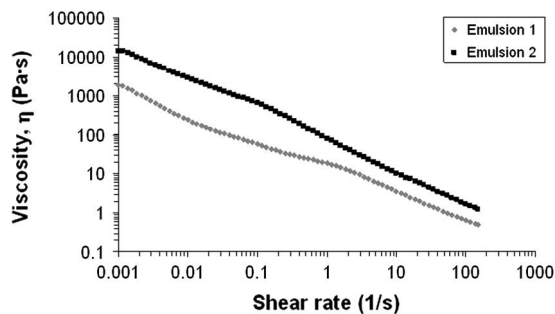


Fig. 5. Steady state flow curves for Emulsion 1 (without chitosan) and Emulsion 2 (with chitosan).

energy input (agitation rate and emulsification time). To study the reduction in droplet size produced by the addition of chitosan, the viscosity of these two emulsions was determined.

### 3.3. Rheological characterization of highly concentrated emulsions

The viscosity of emulsions, in presence and absence of chitosan (Table 1, emulsions 1 and 2, respectively), was measured by steady shear flow determinations. The viscosity flow curve is shown in Fig. 5, where a shear-thinning behavior is observed (viscosity decreases with shear rate). This behavior is typical of highly concentrated emulsions [58]. Moreover, it can also be observed that addition of chitosan increases emulsion viscosity by one order of magnitude, at low shear rate. However, a lower difference in vis-

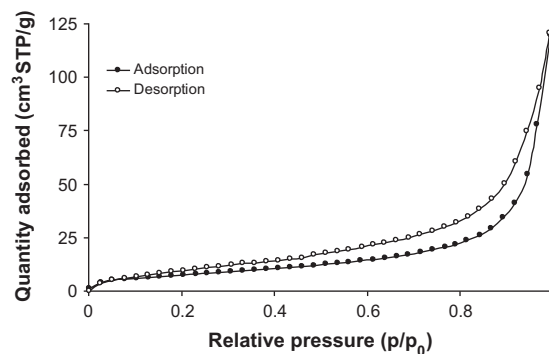


Fig. 7. Nitrogen sorption isotherms of chitosan foam.

cosity (between absence and presence of chitosan) is observed at higher shear rate. In any case, these results indicate that the decrease in droplet size by addition of chitosan is probably produced by the increase in viscosity.

### 3.4. Preparation and characterization of chitosan porous materials

Chitosan porous materials were prepared by templating in highly concentrated emulsions. The composition of the emulsions corresponds to emulsion 2 (Table 1). The stability of this emulsion is enough for the purpose of preparing chitosan solid foams. The crosslinker genipin was added to the phosphate buffer solution, and the highly concentrated emulsion was prepared at 25 °C. The crosslinking reaction was carried out at 40 °C during 72 h, because of faster reaction kinetics at this temperature.

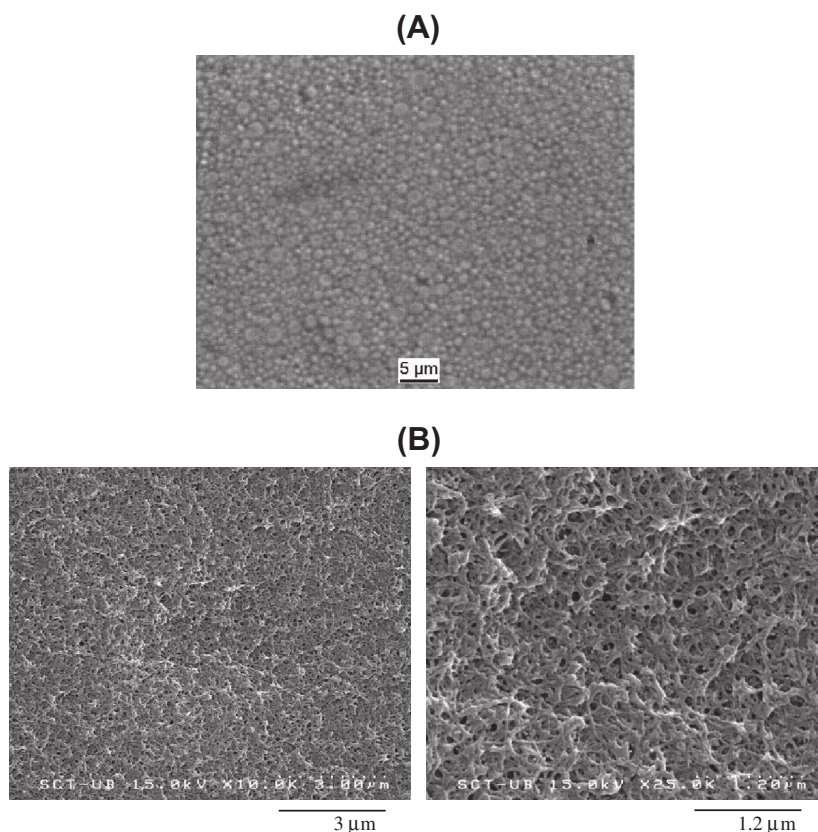


Fig. 6. Optical microscopy image of highly concentrated emulsion in the system chitosan solution/Synperonic A7/decane/genipin solution (A) and SEM micrographs of chitosan macroporous foam after freeze-drying at different magnifications (B).

Fig. 6A shows an optical micrograph of the highly concentrated emulsion in the presence of genipin, just after preparation. An accurate measurement of droplet size could not be carried out because of sample gelation. However, the initial droplet size probably was close to 1.5  $\mu\text{m}$ , the average size determined without genipin. After keeping HIPE for 3 days at 40  $^{\circ}\text{C}$ , a dark blue monolith was obtained, after the crosslinking of chitosan with genipin. The dark color can be associated to the chitosan–genipin reaction [38].

The chitosan foam was obtained after removal of surfactant, decane, and water by soxhlet extraction with ethanol and water, followed by freeze-drying. Finally, the materials were characterized. The resulting crosslinking degree was 91%, and the skeletal density was 1.6  $\text{g}/\text{cm}^3$ . The morphology of the freeze-dried material was characterized by SEM (Fig. 6B). This material has a uniform porous structure with a diameter of the macropores smaller than 0.5  $\mu\text{m}$ . This difference between the pore diameter of the material and the diameter of the drops of the highly concentrated emulsion, 1.5  $\mu\text{m}$  (Fig. 6A), could be due to shrinkage during washing and drying.

Nitrogen sorption isotherms were performed to determine the specific surface area of these chitosan macroporous foams. The hysteresis loop that also appears in the range of 0.60 and 0.98 of relative pressure is associated with the presence of macropores (Fig. 7).

The specific surface area, calculated by fitting the BET equation [49] to the adsorption curve for relative pressures between 0.05 and 0.3, was  $27 \pm 2 \text{ m}^2/\text{g}$ . This low value confirms the macroporous nature of the material, with negligible micropores and mesopores, since the amount of adsorbed nitrogen volume is quite small at low relative pressure. This macropore nature of chitosan foams is shown clearly when the total pore volume ( $V_p$ ) was calculated Eq. (13). Chitosan foams, obtained with a volume fraction of dispersed phase  $\phi = 0.8$ , show  $V_p \sim 48 \text{ cm}^3/\text{g}$ . This result is consistent with the values shown in the literature,  $\sim 30 \text{ cm}^3/\text{g}$  [61], obtained at lower volume fractions of dispersed phase ( $\phi = 0.74$ ). Qian et al. [61] described the influence of dispersed phase volume fraction ( $\phi$ ) in the total pore volume ( $V_p$ ) for sodium carboxymethyl cellulose materials obtained using highly concentrated emulsions as templates. It could be observed a strong dependency between  $\phi$  and  $V_p$ .

#### 4. Conclusions

Chitosan macroporous foams have been obtained by crosslinking in the external phase of highly concentrated O/W emulsions. These materials possess a moderate surface area  $27 \pm 2 \text{ m}^2/\text{g}$ , but a very high total pore volume,  $\sim 48 \text{ cm}^3/\text{g}$  [61]. They also show a porous texture with rather uniform macropores, with size below 0.5  $\mu\text{m}$ , smaller than other chitosan solid foams [28,46]. These materials have been prepared using a simple method, in which the polymer and the crosslinker genipin are added to the external aqueous phase of decane-in-water highly concentrated emulsions. This approach, to the best of our knowledge, has not been reported for the preparation of chitosan porous foams. In the literature, the preparation of organic macroporous and meso/macroporous materials has been widely studied using highly concentrated emulsions as templates, from the early reports in the 80s [1,4–15,52,62]. In most contributions, the preparation of organic polymer, by radical polymerization, is reported. However, little attention has been focused on the preparation of porous biopolymers [27–30]. In the present work, chitosan-based materials with controlled porosity have been obtained by soft-templating in emulsions stabilized with nonionic surfactants, compatible with chitosan positive charges. Moreover, previous works describing formation of chitosan porous materials do not focus on the possible interactions be-

tween chitosan–surfactant aggregates [28,46]. Herein, the study of phase behavior has shown that the incorporation of chitosan does not modify significantly the self-aggregation properties of the non-ionic surfactant, since the structure of hexagonal and lamellar liquid crystals (morphology and lattice parameters) is not influenced by the presence of chitosan.

The possible use of soft-templating by surfactant aggregates, including micelles and liquid crystals, could open many novel possibilities for preparation of biopolymer materials with complex porous textures. The phase behavior studies have shown that biopolymer materials with dual porosities could be obtained. This topic will be the subject of a future work. Chitosan porous foams crosslinked with genipin could have major applications in drug delivery, due to the biocompatibility of chitosan and the low toxicity of the crosslinker. Other applications of these materials could be as absorbents, since they possess high pore volume with hydrophilic surface.

#### Acknowledgments

The authors acknowledge the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness for the (CTQ2008-06892-C03-01 and CTQ2011-23842 Projects) and Generalitat de Catalunya for the 2009SGR961 Grant.

#### Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2013.07.072>.

#### References

- [1] D. Barby, Z. Haq, Low Density Porous Cross-linked Polymeric Materials and their Preparation, European patent 0060138, 1982.
- [2] K.J. Lissant, *J. Colloid Interface Sci.* 22 (1966) 462–468.
- [3] H.M. Princen, *J. Colloid Interface Sci.* 71 (1979) 55–66.
- [4] C. Solans, J. Esquena, N. Azemar, C. Rodríguez, H. Kunieda, in: D.N. Petsev (Ed.), *Highly Concentrated Emulsions as Templates for Solid Foams in Emulsions: Structure, Stability and Interactions*, Elsevier, Amsterdam, 2004.
- [5] J. Esquena, G.S.R. Ravi Sankar, C. Solans, *Langmuir* 19 (2003) 2983–2988.
- [6] H. Maekawa, J. Esquena, S. Bishop, C. Solans, F. Chmelka, *Adv. Mater.* 15 (2003) 591–596.
- [7] P. Hainey, I.M. Huxham, B. Rowatt, D.C. Sherrington, L. Tetley, *Macromolecules* 24 (1991) 117–121.
- [8] N.R. Cameron, D.C. Sherrington, *Adv. Polym. Sci.* 126 (1996) 162–214.
- [9] N.R. Cameron, D.C. Sherrington, L. Albiston, D.P. Gregory, *Colloid Polym. Sci.* 274 (1996) 592–595.
- [10] E. Ruckenstein, J.S. Park, *Polymer* 33 (1992) 405–417.
- [11] E. Ruckenstein, *Adv. Polym. Sci.* 127 (1997) 1–58.
- [12] C. Solans, J. Esquena, N. Azemar, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 8 (2003) 156–163.
- [13] Z. Abbasian, M.R. Moghbeli, *J. Appl. Polym. Sci.* 116 (2010) 986–994.
- [14] G. Ghosh, A. Vilchez, J. Esquena, C. Solans, C. Rodríguez-Abreu, *Prog. Colloid Polym. Sci.* 138 (2010) 161–164.
- [15] F. Fernández-Trillo, J.C.M. Van Hest, J.C. Thies, T. Michon, R. Weberskirch, N.R. Cameron, *Adv. Mater.* 21 (2009) 55–59.
- [16] J. Esquena, C. Solans, S. Vilchez, P. Erra, J. Miras, *Materiales poliméricos macroporosos o meso/macroporosos obtenidos en emulsiones concentradas y altamente concentradas*, Spanish patent, P200930038, 2010.
- [17] M. Rinaudo, *Prog. Polym. Sci.* 31 (2006) 603–632.
- [18] G. Crini, P.M. Badot, *Prog. Polym. Sci.* 33 (2008) 399–447.
- [19] K. Azlan, W.N. Wan Saime, L. Lai Ken, *J. Environ. Sci. – China* 21 (2009) 296–302.
- [20] A. Srinivasan, T. Viraraghavan, *J. Environ. Manage.* 91 (2010) 1915–1929.
- [21] D.Y. Pratt, L.D. Wilson, J.A. Kozinski, *J. Colloid Interface Sci.* 395 (2013) 205–211.
- [22] N. Bhattarai, J. Gunn, M. Zhang, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 (2010) 83–99.
- [23] M. Dash, F. Chiellini, R.M. Ottenbrite, E. Chiellini, *Prog. Polym. Sci.* 36 (2011) 981–1014.
- [24] M. Prabaharan, R. Jayakumar, *Polymeric bionanocomposites as promising materials for controlled drug delivery*, in: R. Jayakumar, M. Prabaharan, R.A.A. Muzzarelli (Eds.), *Chitosan for Biomaterials II, Advances in Polymer Sciences*, Springer-Verlag, vol. 244, 2011.
- [25] R. Riva, H. Ragelle, A. des Rieux, N. Duhem, C. Jérôme, J. Préat, *Chitosan and chitosan derivatives in drug delivery and tissue engineering*, in: R. Jayakumar,

- M. Prabaharan, R.A.A. Muzzarelli (Eds.), *Chitosan for Biomaterials II, Advances in Polymer Sciences, Berlin-Heilderberg*, vol. 244, 2011.
- [26] R.A.A. Muzzarelli, F. Greco, A. Busilacchi, A.G. Sollazzo, *Carbohydr. Polym.* 89 (2012) 723–739.
- [27] S. Partap, I. Rehman, J.R. Jones, J.A. Darr, *Adv. Mater.* 18 (2006) 501–504.
- [28] J.Y. Lee, B. Tan, A.I. Cooper, *Macromolecules* 40 (2007) 1955–1961.
- [29] A. Barbetta, E. Barigelli, M. Dentini, *Biomacromolecules* 10 (2009) 2328–2337.
- [30] F. Dehghani, N. Annabi, *Curr. Opin. Biotechnol.* 22 (2011) 661–666.
- [31] G. Skjak-Braek, T. Anthonsen, P. Sandford, *Chitin and Chitosan*, Elsevier Applied Science, London, 1989.
- [32] P.M. Claesson, B.W. Ninham, *Langmuir* 8 (1992) 1406–1412.
- [33] E. Furusaki, Y. Ueno, N. Sakairi, N. Nishi, S. Tokura, *Carbohydr. Polym.* 9 (1996) 29–34.
- [34] F. Shahidi, J.K.V. Arachchi, Y.J. Jeon, *Trends Food Sci. Technol.* 10 (1999) 37–51.
- [35] M. Rinaudo, *Polym. Int.* 57 (2008) 397–430.
- [36] C. Nishi, N. Nakajima, Y. Ikada, *J. Biomed. Mater. Res.* 29 (1995) 829–834.
- [37] H.W. Sung, Y. Chang, C.T. Chiu, C.N. Chen, H.C. Liang, *J. Biomed. Mater. Res.* 47 (1999) 116–126.
- [38] F.L. Mi, H.W. Sung, S.S. Shyu, *J. Polym. Sci. Polym. Chem.* 38 (2000) 2804–2814.
- [39] F.L. Mi, Y.C. Tan, H.C. Liang, R.N. Huang, H.W. Sung, *J. Biomater. Sci. – Polym. Ed.* 12 (2001) 835–850.
- [40] H.W. Sung, I.L. Liang, C.N. Chen, R.N. Huang, H.F. Liang, *J. Biomed. Mater. Res.* 55 (2001) 538–546.
- [41] F.L. Mi, H.W. Sung, S.S. Shyu, *Carbohydr. Polym.* 48 (2002) 61–72.
- [42] F.L. Mi, Y.C. Tan, H.F. Liang, H.W. Sung, *Biomaterials* 23 (2002) 181–191.
- [43] F.L. Mi, H.W. Sung, S.S. Shyu, C.C. Su, C.K. Peng, *Polymer* 44 (2003) 6521–6530.
- [44] S.C. Chen, Y.C. Wu, F.L. Mi, Y.H. Lin, L.C. Yu, H.W. Sung, *J. Control. Release* 96 (2004) 285–300.
- [45] S. Vílchez, V. Samitier, M. Porras, J. Esquena, P. Erra, *Tenside Surfact. Det.* 46 (2009) 13–17.
- [46] X. Zhong, C. Ji, A.K.L. Chan, S.G. Kazarian, A. Ruys, F. Dehghani, *J. Mater. Sci. – Mater. Med.* 22 (2011) 279–288.
- [47] H. Kunieda, K. Ozawa, K.-L. Huang, *J. Phys. Chem. B* 102 (1998) 831–838.
- [48] A.C. Chao, S.H. Yu, G.S. Chuang, *J. Membr. Sci.* 280 (2006) 163–174.
- [49] S. Brunauer, P.H. Emmett, E. Teller, *J. Am. Chem. Soc.* 60 (1938) 309–319.
- [50] G.T. Dimitrova, Th.F. Tadros, P.F. Luckham, *Langmuir* 11 (1995) 1101–1111.
- [51] H. Kunieda, M.H. Uddin, H. Furukawa, A. Harashima, *Macromolecules* 34 (2001) 9093–9099.
- [52] J. Esquena, J. Nestor, A. Vílchez, K. Aramaki, C. Solans, *Langmuir* 28 (2012) 12334–12340.
- [53] A. Pinotti, A. Bevilacqua, N. Zaritzky, *J. Surfactants Deterg.* 4 (2001) 57–63.
- [54] S. Mun, E.A. Decker, D.J. McClements, *Langmuir* 21 (2005) 6228–6234.
- [55] P. Walstra, *Formation of emulsion*, in: P. Becher (Ed.), *Encyclopedia of Emulsion Technology*, Marcel Dekker, New York and Basel, 1983, pp. 57–127 (Chapter 2).
- [56] Th.F. Tadros, *Emulsions Science and Technology: A General Introduction*, in *Emulsion Science and Technology*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2010.
- [57] J. Miras, S. Vílchez, C. Solans, Th.F. Tadros, J. Esquena, *Soft Matter* 9 (2013) 8678–8686.
- [58] H.A. Barnes, *Colloids Surf. A* 91 (1993) 89–95.
- [59] R. Pal, *AIChE J.* 42 (1996) 3181–3190.
- [60] A.Y. Malkin, I. Masalova, P. Slatyer, K. Wilson, *Rheol. Acta* 43 (2004) 584–591.
- [61] L. Qian, A. Ahmed, A. Foster, S.P. Rannard, A.I. Cooper, H. Zhang, *J. Mater. Chem.* 19 (2009) 5212–5219.
- [62] O. Lépine, M. Birot, H. Deleuze, *Macromol. Mater.* 294 (2009) 599–604.

## Kinetics of chitosan hydrogel formation in high internal phase oil-in-water emulsions (HIPEs) using viscoelastic measurements

Cite this: *Soft Matter*, 2013, 9, 8678

Jonathan Miras,<sup>a</sup> Susana Vílchez,<sup>a</sup> Conxita Solans,<sup>a</sup> Tharwat Tadros<sup>b</sup> and Jordi Esquena<sup>\*a</sup>

High internal phase emulsions (HIPEs) have been used as templates for the preparation of low-density highly porous chitosan foams. The formation of hydrogels and porous foams, by crosslinking in the external phase of O/W HIPEs, has been studied. The stability of the emulsions, prepared using a nonionic surfactant (C13/C15 alkyl chains with 7 moles ethylene oxide), was investigated using droplet size vs. time measurements, in the presence and absence of chitosan. The stability was also assessed using dynamic (oscillating) measurements, where the storage modulus ( $G'_{LVR}$ ) and cohesive energy density ( $E_c$ ) were measured as a function of time. The effect of agitation was investigated by preparing the HIPEs at 700, 900 and 1200 rpm. The HIPEs prepared using nonionic surfactants in the absence of chitosan gave large droplet sizes but they were quite stable against coalescence. Addition of chitosan caused a significant reduction in droplet size and polydispersity, but the emulsions were less stable against coalescence. For emulsions prepared at low speeds of agitation (700 and 900 rpm), both  $G'_{LVR}$  and  $E_c$  showed an initial increase of the modulus due to flocculation, but at times longer than 24 h, the flocculated emulsion showed coalescence. In the presence of chitosan, all HIPEs showed an exponential decrease in  $G'_{LVR}$  and  $E_c$  with time, indicating coalescence of the emulsion. The crosslinking of chitosan with genipin was investigated using oscillatory and creep measurements. Both methods showed an increase in  $G'_{LVR}$ ,  $E_c$  and compliance  $J$  with time, reaching a plateau value when  $t \geq 24$  h. This clearly shows completion of the crosslinking process after 24 h. Finally, crosslinked chitosan porous foams were obtained and characterized by SEM, which showed uniform porous textures.

Received 16th May 2013

Accepted 18th July 2013

DOI: 10.1039/c3sm51375k

[www.rsc.org/softmatter](http://www.rsc.org/softmatter)

### Introduction

During the last two decades, polymeric hydrogels have been intensively studied due to their potential applications in a variety of fields, such as chemical engineering, biotechnology and pharmaceuticals.<sup>1–4</sup> Hydrogels can change their characteristics, in particular swelling, as a result of changes in the external environment such as pH, temperature, ionic strength or application of an electric current.<sup>5–8</sup> Hydrogels can be potentially applied as drug delivery systems. For this purpose, it is necessary to use biocompatible and biodegradable polymers. The drugs can be incorporated into the hydrogel matrix and by changing the conditions, such as pH, temperature or ionic strength, a controlled release can be achieved.

The preparation methods by direct crosslinking in aqueous media to obtain chitosan hydrogels do not allow one to control

porosity and pore size distribution in such materials. We have recently developed a new procedure to synthesize chitosan porous materials by a simple single-step method which provides a direct route to obtain these chitosan foams.<sup>9</sup> This procedure, as mentioned above, involves crosslinking with a low toxicity reagent, genipin, in the external phase of oil-in-water (O/W) highly concentrated emulsions. Since emulsions are thermodynamically unstable, several breakdown processes occur with time through different instability mechanisms, *e.g.*, flocculation, coalescence and Ostwald ripening.<sup>10</sup>

Emulsion-templating techniques are versatile for the preparation of well-defined and controlled porous organic polymers,<sup>11–15</sup> inorganic materials<sup>16–19</sup> and inorganic–organic composites.<sup>20,21</sup> The technique involves the preparation of high internal phase emulsions (HIPEs), which has a volume fraction of the dispersed phase ( $\phi$ ) larger than the theoretical maximum packing volume fraction ( $\phi = 0.74$ ) for equal size spheres. When  $\phi > 0.74$ , the droplets lose the spherical shape and take the form of a polyhedron,<sup>22–24</sup> similar to the structure of a foam. After polymerization/crosslinking in the continuous phase of the highly concentrated emulsion, the dispersed phase (emulsion droplets) is removed to give rise to a porous replica material of the emulsion.<sup>9,24–29</sup>

<sup>a</sup>Institute for Advanced Chemistry of Catalonia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IQAC-CSIC) and CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Jordi Girona 18-26, Barcelona, Spain. E-mail: [jordi.esquena@iqac.csic.es](mailto:jordi.esquena@iqac.csic.es); Fax: +34 93 204 59 04; Tel: +34 93 400 61 78

<sup>b</sup>89 Nash Grove Lane, Wokingham, Berkshire RG40 4HE, UK

In the present paper, we have investigated the stability of high internal phase emulsions (HIPEs) used as templates, by measuring the droplet size and viscoelastic properties as a function of time. The crosslinking reaction of chitosan in highly concentrated oil-in-water emulsions was also investigated using viscoelastic measurements. Porous chitosan foams were obtained after crosslinking and solvent removal. Finally, the topography of chitosan foams was characterized. The capacity of this emulsion-templating technique to tailor the foam pore size, by controlling the emulsion droplet size, was evaluated.

Chitosan is the most commonly used cationic naturally occurring polysaccharide that can be applied in drug delivery systems due to its biocompatibility, biodegradability, non-toxic nature and film-forming properties.<sup>8,30–34</sup> Chitosan is obtained by alkaline deacetylation of chitin, which is the principal component of the protective skeleton of crustaceans (such as crabs and shrimps) and of the cell walls of some fungi.<sup>35</sup> Chitin and chitosan are formed by units of *N*-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine, joined by  $\beta$ -[1  $\rightarrow$  4] links. When the D-glucosamine ratio is higher than 60%, the final product is called chitosan.<sup>32</sup> Chitosan has a  $pK_a \approx 6.5$ , and it becomes positively charged when the pH is less than 6. Under these conditions, the molecule becomes water soluble.<sup>8,30,36</sup>

Different crosslinkers can be used to crosslink chitosan through the reaction with amino groups, such as glutaraldehyde, formaldehyde or epoxy compounds.<sup>37–39</sup> The present investigation is focused on the use of a natural crosslinker reagent, namely genipin (obtained from the fruits of *Gardenia jasminoides* ELLIS), since it is 5000–10 000 times less cytotoxic than glutaraldehyde.<sup>40</sup>

The main objective of the current study is to investigate the formation of hydrogels and porous foams, by templating in high internal phase emulsions (HIPEs). For this purpose, rheological properties and droplet size determinations, as a function of time, have been studied, which can provide useful information on the physical stability of the emulsions. The influence of the presence of chitosan in the continuous phase of emulsions is evaluated since chitosan could affect the stability of emulsions, as described before.<sup>41–43</sup> Another important objective is to achieve an appropriate control of emulsion droplet size, allowing us to obtain the desired pore size of the chitosan final porous foams.

Furthermore, the chitosan crosslinking process and its kinetics, produced in the continuous phase of emulsions to obtain chitosan hydrogels, are also studied by rheological measurements. Finally, the topography of crosslinked chitosan foams was characterized to evaluate the structure of foams.

## Materials and methods

### Materials

Chitosan (medium molecular weight,  $M_w \approx 300$  kDa) with 85% deacetylation degree was purchased from Sigma-Aldrich. The emulsifier used was a nonionic surfactant, Synperonic A7, consisting of  $C_{13-15}$  alkyl chains and 7 moles of ethylene oxides (EO), with a hydrophilic–lipophilic balance (HLB) of 12.2, and was supplied by Uniqema (UK). Decane, with 94% purity, was

obtained from Fluka. The crosslinker genipin, with an average molecular weight of  $226 \text{ g mol}^{-1}$ , was obtained from Challenge Bioproducts Co. (Taiwan). Acetic acid glacial,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , was obtained from Panreac (Spain) with a purity of 99.5%. Deionized and filtered water and phosphate buffer solution (pH = 7.4) were used for the preparation of all solutions.

### Methods

Chitosan solution at  $0.02 \text{ g mL}^{-1}$  was prepared by dissolving chitosan powder in an acetic acid solution at 1 vol% by stirring overnight (magnetic stirrer). Genipin solution was prepared at 1 wt% in phosphate buffer solution at pH = 7.4 and stirred for 1 h.

### Preparation of O/W high internal phase emulsions (HIPEs)

Three different series of high internal phase oil-in-water (O/W) emulsions (HIPE1, HIPE2 and HIPE3) were prepared by dropwise addition of the dispersed phase, decane (keeping the volume fraction constant at  $\phi = 0.8$ ), to the continuous phase at  $25^\circ\text{C}$  with mechanical stirring at three different agitation rates for every series: 700, 900 and 1200 rpm. This study was carried out as a function of the continuous phase composition (Table 1). Emulsions with composition HIPE3, in the presence of a crosslinker, were used for the preparation of chitosan porous foams. For this purpose, emulsion HIPE3 was kept for 72 h in a water bath at  $40^\circ\text{C}$ , as described before.<sup>9</sup> The resulting material was purified by Soxhlet extraction with ethanol and water for 12 h in each solvent. Finally, crosslinked chitosan foams were obtained by freeze-drying.

### Droplet size measurements

The droplet size distributions were obtained after increasing the temperature from  $25$  to  $40^\circ\text{C}$ , using optical microscopy. Emulsions were observed with a Reichert Polyvar 2 microscope, supplied by Leica (Germany), equipped with a video camera (Sony CCD-Iris). A drop of the concentrated emulsion was placed on a glass slide and optical micrographs were taken. Images were processed using the IM500 software supplied by Leica. Droplet size and size distributions were obtained from optical micrographs by sizing 800 randomly droplets, acquired using an oil-immersion objective ( $\times 100$  magnification). An image analysis software program (Image J) was used for statistical analysis to calculate the droplet size distributions (expressed in vol%). From these distributions, the de Brouckere

**Table 1** Composition of the continuous phase (wt%) of high internal phase emulsions

Component	Content, wt%		
	HIPE1	HIPE2	HIPE3
Synperonic A7	10	10	10
$\text{CH}_3\text{COOH}$ 1 vol%	45	0	0
Chitosan solution $0.02 \text{ g mL}^{-1}$	0	45	45
Phosphate buffer pH = 7.4	45	45	0
Genipin solution 1 wt%	0	0	45



mean diameter (eqn (1)),  $D[4,3]$ , and the polydispersity, expressed as Span (eqn (2)), were calculated.

$$D[4,3] = \frac{\sum d^4}{\sum d^3} \quad (1)$$

where  $d$  is the droplet diameter ( $\mu\text{m}$ ).

$$\text{Span} = \frac{d(0.9) - d(0.1)}{d(0.5)} \quad (2)$$

where  $d(0.1)$ ,  $d(0.5)$  and  $d(0.9)$  are the cumulative volume distributions at 10%, 50% and 90%, respectively.

The droplet sizes of HIPE1 (with no chitosan) and HIPE2 series, with chitosan (Table 1), prepared at three agitation rates (700, 900 and 1200 rpm) were measured over 72 h at 40 °C in order to evaluate their stability.

### Interfacial tension experiments

Measurements were carried out by forming a drop of surfactant (Synperonic A7) aqueous solution inside the oil (decane). These experiments were performed as a function of Synperonic A7 concentration with a syringe of 1 mL (Hamilton, Switzerland) attached into a graduated micrometer in order to achieve an accurate volume of the drop. It has to be mentioned that the manipulation of the micrometer screw must be carried out carefully to attain adsorption equilibrium. The measurement finishes when the drop is released from the needle, and its volume can be calculated by comparing the final and the starting point in the micrometer readable scale.

### Crosslinking of chitosan in the HIPEs

Emulsions from the HIPE3 series (Table 1), in the presence of chitosan and crosslinker (genipin), were kept in a water bath for 72 h at 40 °C, allowing the chitosan crosslinking reaction.

### Rheological measurements

These measurements were carried out using an AR-G2 controlled stress rheometer (TA Instruments). The viscosity of the continuous phase of the emulsions HIPE1 and HIPE2 (see Table 1) was measured using a steady state procedure at 25 °C with a cone-plate geometry with a diameter of 40 mm, a cone angle of 4° and a gap of 105  $\mu\text{m}$ . For comparison, the viscosity of water was measured using concentric cylinders (gap = 4000  $\mu\text{m}$ ).

For the highly concentrated emulsions, only viscoelastic measurements were carried out using a parallel plate geometry with a diameter of 20 mm. Measurements were carried out at 40 °C for 72 h with a solvent trap, to avoid evaporation. Two types of viscoelastic measurements were performed, namely oscillating and creep measurements. In the oscillating technique, a sinusoidal strain with amplitude ( $\gamma_0$ ) is applied on the system and the stress amplitude ( $\sigma_0$ ) is measured simultaneously. From the time shift ( $\Delta t$ ) between stress and strain amplitudes and the frequency,  $\omega$  ( $\text{rad s}^{-1}$ ), the phase angle shift ( $\delta$ ) is obtained. From  $\gamma_0$ ,  $\sigma_0$  and  $\delta$ , the following rheological parameters are estimated: complex modulus (eqn (3)), storage or elastic modulus (eqn (4)) and loss or viscous modulus (eqn (5)).

$$|G^*| = \sigma_0/\gamma_0 \quad (3)$$

$$G' = |G^*| \cdot \cos \delta \quad (4)$$

$$G'' = |G^*| \cdot \sin \delta \quad (5)$$

The elastic modulus values were taken in the linear viscoelastic region ( $G'_{LVR}$ ), which are independent of the applied strain. For this purpose, the strain was gradually increased, from 0.01 to 20% for emulsions HIPE1 and from 0.05 to 20% for HIPE2, both at a frequency of 1 Hz and a gap of 1000  $\mu\text{m}$ . For the evaluation of the crosslinking process, two types of measurements were carried out for emulsions HIPE3 as a function of time. In the first experiment, the elastic modulus in the linear viscoelastic region ( $G'_{LVR}$ ), at a frequency of 2 Hz, was measured as a function of time for 72 h. In the second experiment, creep measurements were carried out at constant shear stresses of 10 and 40 Pa and the variation of the compliance  $J$  ( $J = \gamma/\sigma$ ), determined in the linear viscoelastic region, was obtained with time, where  $\gamma$  is the deformation and  $\sigma$  the applied stress. Measurements were also carried out for 2 min after removing the stress (creep recovery). These creep and recovery measurements were performed as a function of time (0, 2, 4, 6, 24, 48 and 72 h). In these kinetics measurements, the gap of the parallel plate geometry was kept at 2700  $\mu\text{m}$ . This characterization has been performed by the Nanostructured Liquid Characterization Unit of the Spanish National Research Council (CSIC) and the Biomedical Networking Center (CIBER-BBN), located at IQAC-CSIC.

### Surface characterization of crosslinked chitosan foams

Crosslinked chitosan porous foams, obtained by the emulsion-templating technique at 700, 900 and 1200 rpm, were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM). A Hitachi 4100 microscope was used, operating at 15 kV. Samples were previously coated with gold by sputtering.

## Results and discussion

### Stability of the high internal phase emulsions (HIPEs), in the presence and absence of chitosan, using droplet size measurements

Table 2 shows the average droplet size diameter,  $D[4,3]$ , and the polydispersity, Span, of the emulsion HIPE1 without chitosan, as a function of time at three different speeds of agitation.

The above results show a systematic reduction in drop size with increase of agitation rate, as expected. Also, the average

**Table 2** Average droplet diameter,  $D[4,3]$  ( $\mu\text{m}$ ), and polydispersity, Span, for HIPE1 (without chitosan) as a function of agitation rate and time

	$t = 0$ h		$t = 24$ h		$t = 48$ h		$t = 72$ h	
	$D[4,3]$	Span	$D[4,3]$	Span	$D[4,3]$	Span	$D[4,3]$	Span
700 rpm	5.2	0.9	5.5	0.9	6.4	0.8	6.5	0.8
900 rpm	3.5	1.1	4.1	0.9	4.2	0.8	4.3	0.9
1200 rpm	2.1	0.9	2.3	0.8	2.4	0.8	2.7	0.9

size increases slightly with increase of time, whereas Span remains almost constant. The slight increase of the average droplet size with time could be the result of coalescence and/or Ostwald ripening.<sup>44</sup>

To test which one of these processes is the main cause of instability, we have plotted cubic radius ( $r^3$ ) vs. time for Ostwald ripening.<sup>45,46</sup> However, the plots of  $r^3$  vs. time (data not shown) did not show a linear fit, at any agitation speed. Therefore, most likely, the instability is not produced by Ostwald ripening, and it could be attributed to coalescence.

Different models could be used to evaluate if coalescence was the main instability process. The coalescence rate could be quantified using the Deminiere model,<sup>47</sup> which explains the formation of critical holes between adjacent droplets, leading to the rupture of stabilizing films and producing coalescence. This process may be described by eqn (6), which was applied to rather monodisperse and concentrated emulsions.<sup>47</sup>

$$1/r^2 = 1/r_0^2 - (3\pi/8)\omega t \quad (6)$$

where  $r$  is the droplet radius at time  $t$ ,  $r_0$  is the initial droplet radius and  $\omega$  is the frequency of rupture per unit surface of the film. However, in the present case, the Deminiere model did not produce an acceptable linear fit to the experimental results (data not shown).

Assuming that the coalescence rate may have a first order kinetics, certainly governed by the rupture of the aqueous film that separates adjacent droplets,<sup>48–50</sup> the droplet size could follow:

$$\log r = \log r_0 + kt \quad (7)$$

where  $r$  is the droplet radius at time  $t$ ,  $r_0$  is the value at  $t = 0$  and  $k$  is the coalescence rate. In the present case, plots of logarithm of droplet radius vs. time show linear fits that are reasonably good (Fig. 1). Consequently, the instability process is probably dominated by coalescence, which follows a first order kinetics.

From these fits, the coalescence rate was calculated from the slopes, obtaining a fairly constant value, between 0.0012 and 0.0015  $\text{h}^{-1}$ , which is very low indicating reasonable stability for the emulsions. Addition of chitosan in the continuous phase (HIPE2) showed a significant reduction in the average droplet diameter at all agitation speeds (Table 3). This could be due to the increase of the viscosity of the continuous phase which results in an increase in stress produced during agitation (the

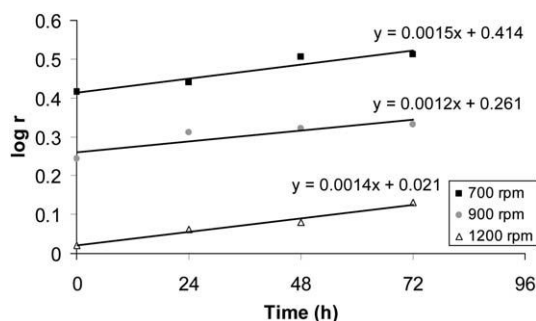


Fig. 1 Logarithm of droplet radius vs. time for HIPE1 (without chitosan).

Table 3 Average droplet diameter,  $D[4,3]$  ( $\mu\text{m}$ ), and polydispersity, Span, for HIPE2 (with chitosan) as a function of agitation rate and time

	$t = 0$ h		$t = 24$ h		$t = 48$ h		$t = 72$ h	
	$D[4,3]$	Span	$D[4,3]$	Span	$D[4,3]$	Span	$D[4,3]$	Span
700 rpm	1.5	0.7	2.1	0.6	2.2	0.7	3.5	1.0
900 rpm	1.4	0.8	1.9	0.7	2.2	0.8	2.6	0.8
1200 rpm	0.9	0.5	1.2	0.6	1.7	0.7	2.1	0.7

stress is given by the product of velocity gradient and the viscosity).<sup>51</sup> However, these emulsions were less stable than those obtained in the absence of chitosan, showing higher coalescence rates (ranging from 0.0036 to 0.0052  $\text{h}^{-1}$  depending on the agitation rate) as indicated in Fig. 2 (plots of droplet radius vs. time).

On addition of chitosan, the interfacial tension increases, as shown in Fig. 3. Chitosan is a polysaccharide with amino groups and hydroxyl groups. This molecule probably possesses certain amphiphilic character, being able to adsorb on interfaces and interacting with other amphiphilic compounds. At relatively low pH (below the  $\text{pK}_a$ , of chitosan, 6.5), amino groups are protonated ( $\text{NH}_3^+$ ), which enhances the chitosan hydrophilic character, producing an increase in interfacial tension, leading to faster coalescence rate of emulsion droplets.<sup>41,52</sup>

#### Stability of the HIPEs using rheological measurements

Fig. 4 shows the viscosity shear stress curves for water, 10% Synperonic aqueous solution (continuous phase of HIPE1),

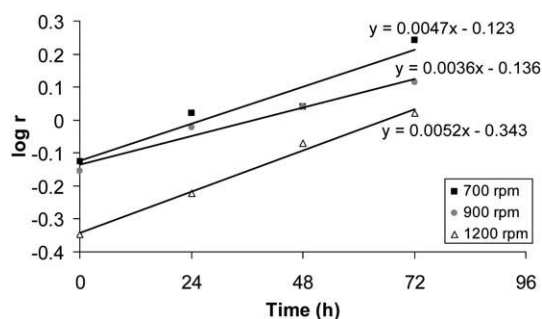


Fig. 2 Droplet radius vs. time for HIPE2, with chitosan.

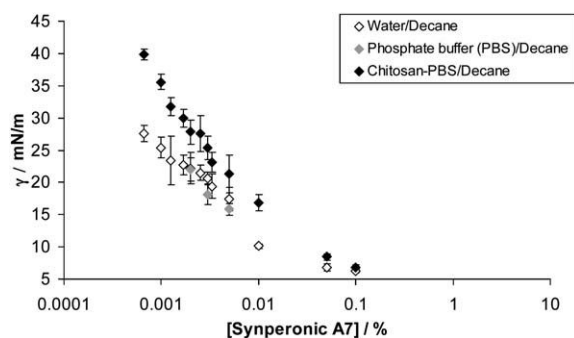
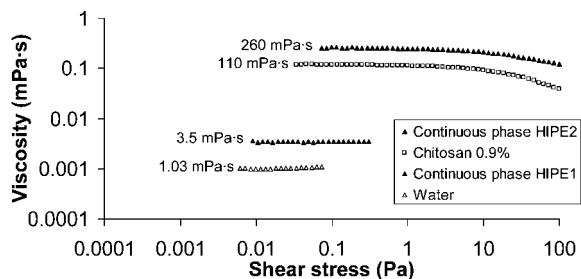


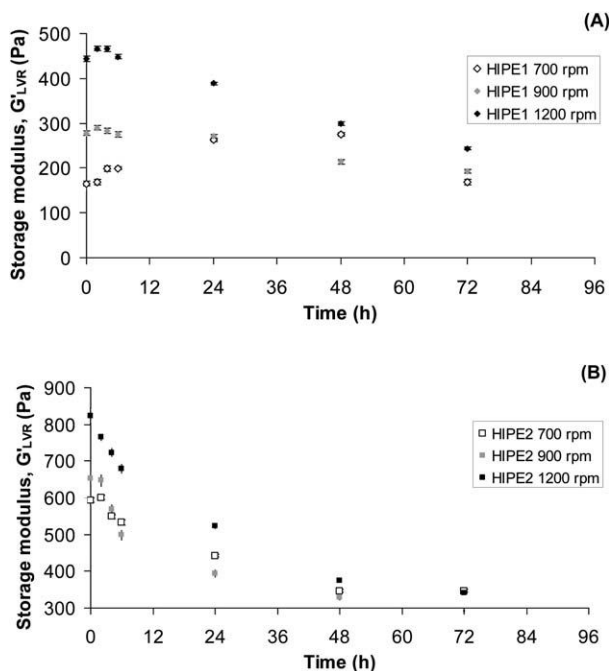
Fig. 3 Interfacial tension for the systems water/decane, phosphate buffer/decane and chitosan-phosphate buffer/decane.



**Fig. 4** Steady state measurements for water, 10% Synperonic A7 (continuous phase of HIPE1), 0.9% chitosan and 0.9% chitosan with 10% Synperonic A7 and phosphate buffer (continuous phase of HIPE2).

0.9% chitosan solution and 10% Synperonic A7/0.9% chitosan solution/phosphate buffer (continuous phase of HIPE2). Both water and 10% Synperonic A7 solution show Newtonian behavior. Addition of 10% Synperonic A7 causes a slight increase in the viscosity from 1.03 to 3.5 mPa·s. Both solutions of 0.9% of chitosan as well as 10% Synperonic A7/0.9% chitosan/phosphate buffer show non-Newtonian behavior, with a reduction in viscosity as the shear stress increases above 5 Pa. The 0.9% chitosan solution has a much higher viscosity (110 mPa·s) when compared with that of the 10% Synperonic A7 solution. Addition of 10% Synperonic A7 to chitosan solution causes a high increase of the viscosity (260 mPa·s). This illustrates the interaction between Synperonic A7 and the chitosan molecule as discussed in the previous section.

The stability of the emulsions is determined by following the storage modulus (in the linear viscoelastic region) as a function



**Fig. 5** Storage modulus values in the linear region,  $G'_{LVR}$ , as a function of time for HIPE1, in the absence of chitosan (A), and for HIPE2, in the presence of chitosan (B), at 700, 900 and 1200 rpm. All measurements were carried out at a frequency of 1 Hz.

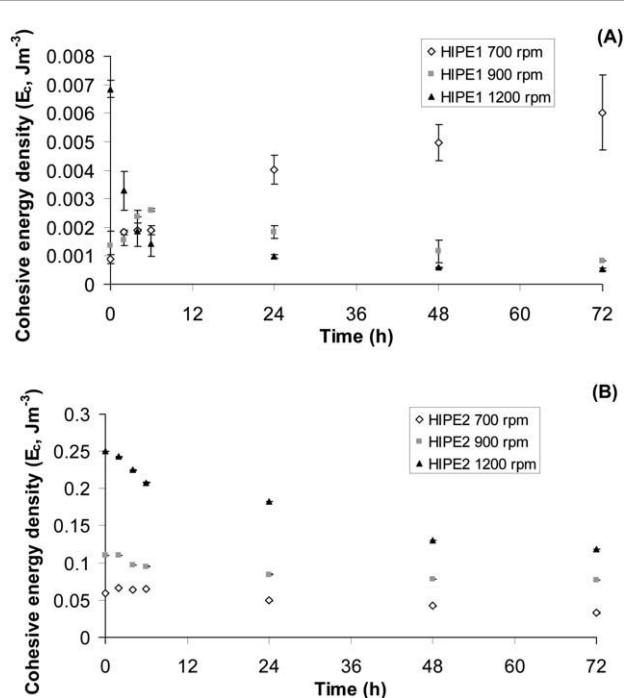
of time for the two systems, HIPE1 and HIPE2, at three speeds of agitation (Fig. 5).

Fig. 5A shows the results for HIPE1 (absence of chitosan). The emulsion prepared at low speed (700 rpm) shows an initial increase in the modulus for 48 h, after which it decreases from 48 to 72 h. The initial increase in the modulus may be due to flocculation since in this case the droplets are quite large ( $D_{[4,3]} = 5.2 \mu\text{m}$ ).<sup>52</sup> The flocculated emulsion finally undergoes some coalescence at longer periods of time. The emulsion prepared at 900 rpm shows only a small reduction of  $G'_{LVR}$  during the period from  $t = 0$  h to 72 h. This shows the high stability of the emulsion as inferred from Fig. 1. The emulsion prepared at 1200 rpm shows the expected exponential decrease of  $G'_{LVR}$  vs. time, which indicates the presence of coalescence that produces an increase in droplet size.<sup>53,54</sup> The results obtained in the presence of chitosan (Fig. 5B) all show an exponential decrease of  $G'_{LVR}$  vs. time at all rotational speeds. These rheological results are consistent with the results obtained using droplet size measurements (Fig. 2) which show high coalescence rates ( $0.0036\text{--}0.0052 \text{ h}^{-1}$ ) when compared to the results obtained in the absence of chitosan.

An alternative method to measure the stability is to follow the variation of cohesive energy density of the emulsion ( $E_c$ , eqn (8)) as a function of time.<sup>55</sup>

$$E_c = \frac{1}{2} G'_{LVR} \gamma_{cr}^2 \quad (8)$$

where  $G'_{LVR}$  (Pa) is the storage modulus in the linear viscoelastic region and  $\gamma_{cr}$  is the critical strain above which non-linear response is obtained where  $G'$  decreases with increase of strain amplitude. The cohesive energy density is a useful quantitative



**Fig. 6** Cohesive energy density values,  $E_c$ , as a function of time for HIPE1, in the absence of chitosan (A), and for HIPE2, in the presence of chitosan (B), prepared at 700, 900 and 1200 rpm.

parameter to measure the structure strength of an emulsion. The cohesive energy density depends on the droplet size distribution and the interaction forces between droplets.

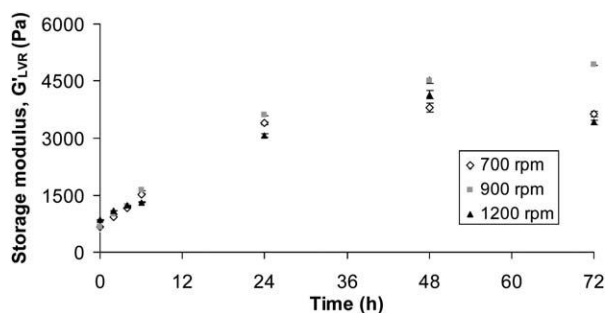
The emulsion prepared at 700 rpm shows an increase in  $E_c$  with time, which indicates possible flocculation of the emulsion droplets due to attractive interactions between droplets (Fig. 6A). The emulsions prepared at 900 rpm do not show a significant change in  $E_c$  with time, indicating the emulsion stability. However, emulsions prepared at 1200 rpm show an exponential decrease of  $E_c$  with time, indicating some emulsion coalescence. The reduction of the number of contacts between droplets, produced by the increase of droplet size, causes a reduction in  $E_c$ .<sup>50</sup> The emulsions prepared in the presence of chitosan, HIPE2 (Fig. 6B), also show a small change in  $E_c$  with time when the stirring speed was relatively low (700 and 900 rpm). However, the emulsions prepared at 1200 rpm show the expected exponential decrease of  $E_c$  vs. time and this reflects the higher rate of coalescence (See Fig. 2).

### Investigation of the crosslinking process

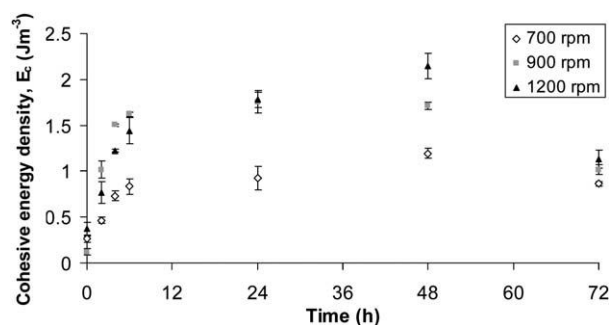
The kinetics of the crosslinking process was carried out by following the variation of elastic modulus,  $G'_{LVR}$  (in the linear viscoelastic region at a frequency of 2 Hz), as a function of time for emulsion HIPE3, containing the crosslinker genipin. The gelation or crosslinking process has been widely studied in bulk hydrogels by rheological measurements as a function of time or temperature.<sup>56–58</sup> When gelation occurs, an increase of storage modulus is observed. A similar procedure was carried out to study the crosslinking of chitosan hydrogels obtained using highly concentrated emulsions as templates. The results are shown in Fig. 7 for three emulsions prepared at different agitation speeds.

The results show a logarithmic increase in  $G'_{LVR}$  with time, and it seems that a plateau is almost reached after 24 h, indicating completion of the crosslinking reaction. However, with the emulsions at 1200 rpm there is some reduction in the storage modulus between 48 and 72 h, which may be due to the shrinkage of the gel.

Fig. 8 shows the variation of cohesive energy density as a function of time for emulsions HIPE3, prepared at the same



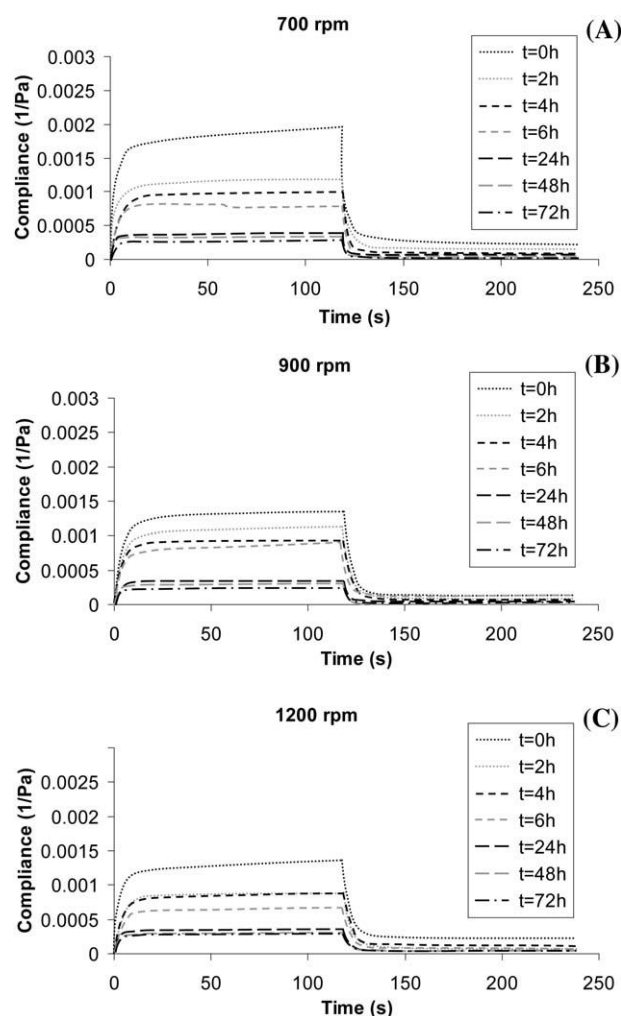
**Fig. 7** Storage modulus in the linear viscoelastic region,  $G'_{LVR}$ , as a function of time for HIPE3 (with chitosan and genipin) at 700, 900 and 1200 rpm from the oscillatory strain measurements. All measurements were carried out at a frequency of 2 Hz.



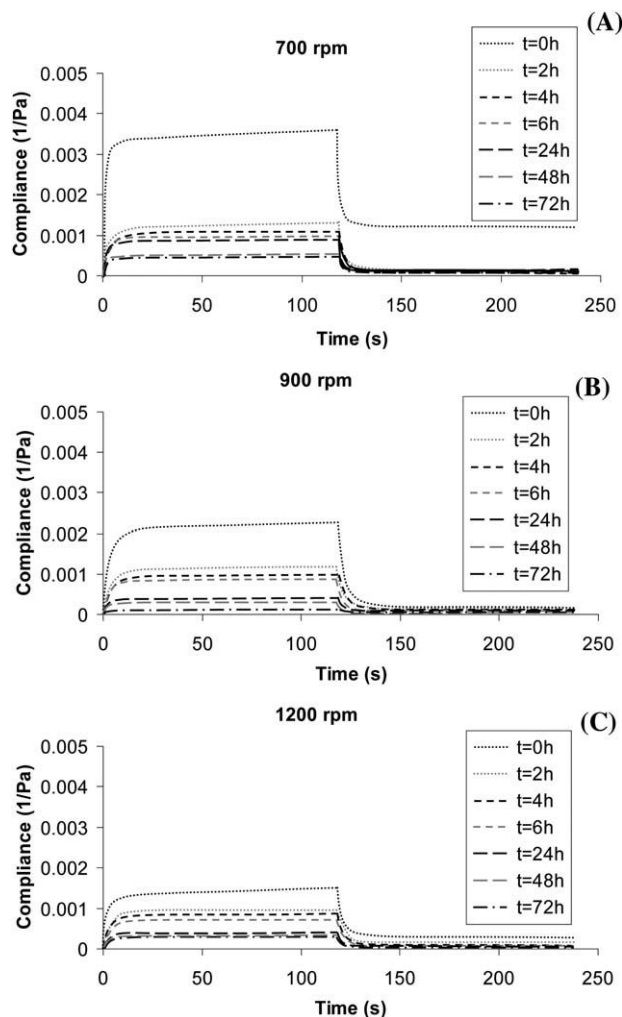
**Fig. 8** Cohesive energy density,  $E_c$ , as a function of time for HIPE3 (with chitosan and genipin) at 700, 900 and 1200 rpm, obtained from oscillatory strain measurements.

agitation speeds. The trends are similar to those of the storage modulus vs. time (Fig. 7).

Another rheological technique that can be applied to investigate the crosslinking or gelation process is constant stress (creep) measurements.<sup>59,60</sup> Fig. 9 and 10 show the creep compliance and recovery curves obtained at stresses of 10 Pa

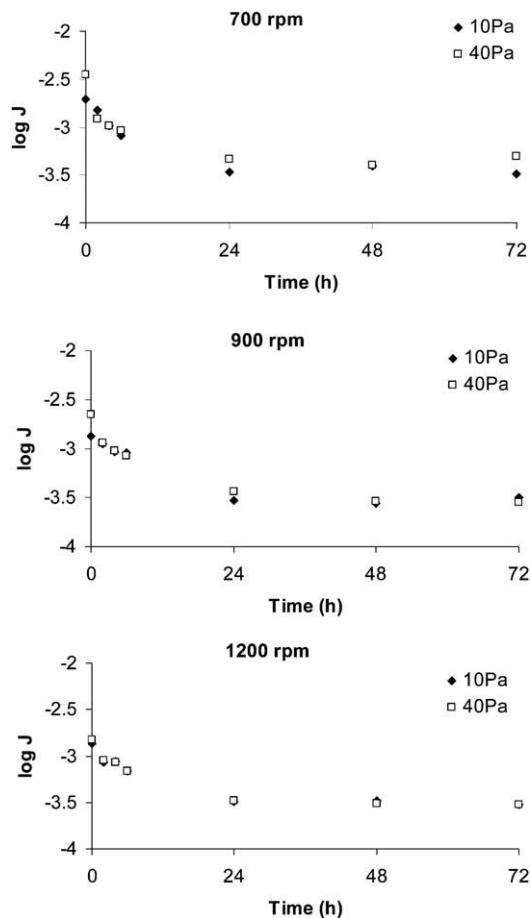


**Fig. 9** Creep and recovery measurements for an applied shear stress of 10 Pa for HIPE3 emulsions prepared at 700 (A), 900 (B) and 1200 rpm (C).



**Fig. 10** Creep and recovery measurements for an applied shear stress of 40 Pa for HIPE3 emulsions prepared at 700 (A), 900 (B) and 1200 rpm (C).

(Fig. 9) and 40 Pa (Fig. 10) as a function of crosslinking time (0, 2, 4, 6, 24, 48 and 72 h) and for HIPEs prepared at three speeds (700, 900 and 1200 rpm). These creep curves should give clear indication of the crosslinking reaction. For example, for HIPE3 prepared at 700 rpm and  $t = 0$  h (Fig. 9A) the creep curve initially shows a rapid increase in the compliance (characterized by an instantaneous compliance,  $J_0$ ) followed by a slow increase in the compliance (the retarded region) and finally  $J$  shows a linear increase with increase of time, up to 120 s. When the stress is removed at this point, the compliance changes sign and the equilibrium value is reached at 240 s. The final compliance value is not equal to zero, indicating partial recovery of the structure. As the crosslinking time is increased from 0 to 72 h, the slope of the  $J$  vs. time curve in the initial period decreases gradually and finally it approaches 0 at  $t \geq 24$  h. In the latter cases, complete recovery is observed, indicating a change from viscoelastic liquid behavior at  $t = 0$  h to viscoelastic solid behavior at  $t \geq 24$  h. The trends obtained for HIPEs prepared at 900 rpm (Fig. 9B) and 1200 rpm (Fig. 9C) are similar to those obtained at 700 rpm. It should be mentioned



**Fig. 11** Variation of  $\log J$  vs. time at a shear stress of 10 and 40 Pa for emulsions prepared at 700, 900 and 1200 rpm.

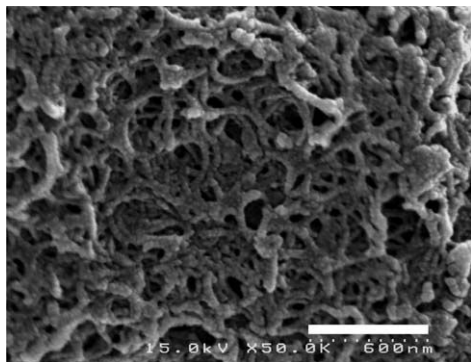
that the compliance values obtained for emulsions prepared at 900 and 1200 rpm are lower than those obtained at 700 rpm, indicating the more solid-like behavior. The trends obtained at a stress of 40 Pa are similar to those obtained at 10 Pa, with higher compliance values in the case of 40 Pa.

Fig. 11 shows the variation of  $\log J$  at the beginning of the recovery curve ( $t = 120$  s) vs. time for the two applied stresses. In all cases,  $\log J$  decreases exponentially with the increase of time, reaching a plateau at  $t \geq 24$  h. These results show that the crosslinking process is almost completed after 24 h, as shown from dynamic measurements.

### Topography of crosslinked chitosan porous foams

The surface characterization of chitosan foams obtained using high internal phase emulsions as templates (HIPE3) was carried out by SEM. The morphology of these materials shows a uniform porous structure. For example, a SEM image of the material obtained at 1200 rpm is shown in Fig. 12.

The pore size is smaller than the corresponding emulsion droplets, probably due to shrinkage, which was visually observed during purification by Soxhlet extraction. The droplet size from the emulsions HIPE3 used as a template is  $0.9 \mu\text{m}$  at  $t = 0$  h (Table 3), whereas the chitosan porous foam obtained



**Fig. 12** SEM images of chitosan foams obtained at 1200 rpm (scale bar = 600 nm).

showed a pore size below 200 nm. Nevertheless, this templating emulsion technique allows us to obtain monolithic chitosan foams with homogeneous macropores.

## Conclusions

Chitosan porous foams, with controlled pore size, were successfully obtained using oil-in-water high internal phase emulsions (HIPEs) as templates *via* chitosan crosslinking with genipin. The incorporation of chitosan produced a large decrease in droplet size, achieving emulsions with narrow droplet size distributions and with average droplet size,  $D[4,3]$ , below 1  $\mu\text{m}$  ( $t = 0$  h). Although emulsions with chitosan in the continuous phase (HIPE2) exhibited coalescence, they were suitable systems to obtain chitosan porous foams due to their narrow droplet size distributions and smaller droplet sizes. Rheological measurements showed the same trend. The influence of the agitation rate was clearly observed. By increasing the agitation rate, the storage modulus in the linear viscoelastic region ( $G'_{LVR}$ ) and the cohesive energy density ( $E_c$ ) increased due to the decrease of droplet size. However, both emulsions, with and without chitosan (HIPE2 and HIPE1, respectively), showed some coalescence after 6 h. The emulsions with chitosan and crosslinker (HIPE3) showed a logarithmic increase in  $G'_{LVR}$  and  $E_c$ , due to the chitosan crosslinking process, and they reached a plateau after 24 h, indicating that the crosslinking reaction is finished. The same behavior was observed by creep measurements, which reached again a plateau of compliance values after 24 h. Finally, the pore size of the porous foams was smaller than the corresponding emulsion droplets, probably due to shrinkage. However, the HIPEs proved to be useful systems for the preparation of porous chitosan foams with controlled pore size.

## Acknowledgements

The authors acknowledge the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness for the CTQ2008-06892-C03-01 and CTQ2011-23842 projects and Generalitat de Catalunya for the 2009SGR961 grant.

## Notes and references

- 1 N. A. Peppas, K. B. Keys, M. Torres-Lugo and A. M. Lowma, *J. Controlled Release*, 1999, **62**, 81.
- 2 F. L. Mi, S. S. Shyu, Y. B. Wu, S. T. Lee, J. Y. Shyong and R. N. Huang, *Biomacromolecules*, 2001, **22**, 165.
- 3 R. A. A. Muzzarelli, P. Morganti, G. Morganti, P. Palombo, M. Palombo, G. Biagini, M. M. Belmonte, F. Giantomassi, F. Orlandi and C. Muzzarelli, *Carbohydr. Polym.*, 2007, **70**, 274.
- 4 J. F. Mano, *Adv. Eng. Mater.*, 2008, **10**, 515.
- 5 Y. M. Lee and S. H. Cho, *J. Appl. Polym. Sci.*, 1996, **62**, 301.
- 6 L. Brannon-Peppas and N. A. Peppas, *Chem. Eng. Sci.*, 1991, **46**, 715.
- 7 E. S. Gil and S. M. Hudson, *Prog. Polym. Sci.*, 2004, **29**, 1173.
- 8 G. Skjak-Braek, T. Anthonsen and P. Sandford, *Chitin and Chitosan*, Elsevier Applied Science, London, 1989.
- 9 J. Esquena, C. Solans, S. Vilchez, P. Erra and J. Miras, Spanish patent, P200930038, 2010.
- 10 P. Walstra, in *Encyclopedia of Emulsion Technology*, ed. P. Becher, Marcel Dekker, New York, 1983, ch. 2.
- 11 N. R. Cameron, D. C. Sherrington, D. C. Albistol and D. P. Gregory, *Colloid Polym. Sci.*, 1996, **274**, 592.
- 12 A. Barbetta, N. R. Cameron and J. S. Cooper, *Chem. Commun.*, 2000, 221.
- 13 J. Esquena, G. S. R. Ravi Sankar and C. Solans, *Langmuir*, 2003, **19**, 2983.
- 14 Z. Abbasian and M. R. Moghbeli, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2010, **116**, 986.
- 15 F. Fernández-Trillo, J. C. M. van Hest, J. C. Thies, T. Michon, R. Weberskirch and N. R. Cameron, *Adv. Mater.*, 2009, **21**, 55.
- 16 A. Imhof and D. Pine, *Nature*, 1997, **389**, 948.
- 17 A. Imhof and D. Pine, *Adv. Mater.*, 1999, **11**, 311.
- 18 H. Maekawa, J. Esquena, S. Bishop, C. Solans and B. F. Chmelka, *Adv. Mater.*, 2003, **15**, 591.
- 19 Z.-Y. Yuan and B.-L. Su, *J. Mater. Chem.*, 2006, **16**, 663.
- 20 A. R. Mahdavian, M. Ashjari and A. B. Makoo, *Eur. Polym. J.*, 2007, **43**, 336.
- 21 G. Ghosh, A. Vilchez, J. Esquena and C. Solans, *Mater. Chem. Phys.*, 2011, **130**, 786.
- 22 K. J. Lissant, *J. Colloid Interface Sci.*, 1966, **22**, 462.
- 23 H. M. Princen, *J. Colloid Interface Sci.*, 1979, **71**, 55.
- 24 C. Solans, J. Esquena, N. Azemar, C. Rodriguez and H. Kunieda, in *Emulsions: Structure, Stability and Interactions*, ed. D. N. Petsev, Elsevier, Amsterdam, 2004.
- 25 V. H. Bartl and W. Von Bonin, *Macromol. Chem. Phys.*, 1962, **57**, 74.
- 26 D. Barby and Z. Haq, European patent, 0060138, 1982.
- 27 E. Ruckenstein and J. S. Park, *Polymer*, 1992, **33**, 405.
- 28 N. R. Cameron and D. C. Sherrington, *Adv. Polym. Sci.*, 1996, **126**, 162.
- 29 C. Solans, J. Esquena and N. Azemar, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2003, **8**, 156.
- 30 P. M. Claesson and B. W. Ninham, *Langmuir*, 1992, **8**, 1406.
- 31 E. Furusaki, Y. Ueno, N. Sakairi, N. Nishi and S. Tokura, *Carbohydr. Polym.*, 1996, **9**, 29.
- 32 M. Rinaudo, *Prog. Polym. Sci.*, 2006, **31**, 603.

- 33 M. Rinaudo, *Polym. Int.*, 2008, **57**, 397.
- 34 R. A. A. Muzzarelli, F. Greco, A. Busilacchi and V. Sollazzo, *Carbohydr. Polym.*, 2012, **89**, 723.
- 35 E. Agulló, R. Mato, C. Peniche, *et al.*, *Quitina y Quitosano: Obtención, caracterización y aplicaciones*, Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú, Perú, 2004.
- 36 F. Shahidi, J. K. V. Arachchi and Y. J. Jeon, *Trends Food Sci. Technol.*, 1999, **10**, 37.
- 37 I. Y. Kim, S. J. Kim, M.-S. Shin, Y. M. Lee, D.-I. Shin and S. I. Kim, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2002, **85**, 2661.
- 38 S. Chen, M. Liu, S. Jin and Y. Chen, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2005, **98**, 1720.
- 39 L. Yin, L. Fei, F. Cui, C. Tang and C. Yin, *Biomaterials*, 2007, **28**, 1258.
- 40 C. Nishi, N. Nakajima and Y. Ikada, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1995, **29**, 829.
- 41 P. C. Schulz, M. S. Rodríguez, L. F. Del Blanco, M. Pistonesi and E. Agulló, *Colloid Polym. Sci.*, 1998, **276**, 1159.
- 42 S. Mun, E. A. Decker and D. J. McClements, *Langmuir*, 2005, **21**, 6228.
- 43 N. Calero, J. Muñoz, P. W. Cox, A. Heuer and A. Guerrero, *Food Hydrocolloids*, 2013, **30**, 152.
- 44 Th. F. Tadros and B. Vincent, in *Encyclopedia of Emulsion Technology*, ed. P. Becher, Marcel Dekker, New York, 1983, ch. 3.
- 45 I. M. Lifshitz and V. V. Slyozov, *J. Phys. Chem. Solids*, 1961, **19**, 35.
- 46 C. Wagner, *Z. Elektrochem.*, 1961, **65**, 581.
- 47 B. Deminiere, A. Colin, F. Leal Calderon and J. Bibette, Lifetime and destruction of concentrated emulsions undergoing coalescence, in *Modern Aspects of Emulsion Science*, ed. B. P. Binks, The Royal Society of Chemistry, Cambridge (UK), 1998, ch. 8, pp. 261–291.
- 48 E. G. Cockbain and T. S. McRoberts, *J. Colloid Sci.*, 1953, **8**, 440.
- 49 G. W. J. Lee and Th. F. Tadros, *Colloids Surf.*, 1982, **5**, 117.
- 50 Th. F. Tadros, Use of rheological measurements for assesment and prediction of the long-term physical stability of formulations, in *Rheology of dispersions: Principles and applications*, Wiley-VCH, Weinheim (Germany), 2010, ch. 8.
- 51 Th. F. Tadros, Emulsions Science and Technology: A General Introduction, in *Emulsion Science and Technology*, Wiley-VCH, Weinheim (Germany), 2009, ch. 1, pp. 18–19.
- 52 I. Pepić, J. Filipović and I. Jalšenjčak, *Colloids Surf., A*, 2008, **327**, 95.
- 53 R. Pal, *AIChE J.*, 1996, **42**, 3181.
- 54 A. Langenfeld, V. Schmitt and M. J. Stébé, *J. Colloid Interface Sci.*, 1999, **218**, 522.
- 55 Th. F. Tadros, *Langmuir*, 1990, **6**, 28.
- 56 M. J. Moura, M. M. Figueiredo and M. H. Gil, *Biomacromolecules*, 2007, **8**, 3823.
- 57 P. Matricardi, M. Pontoriero, T. Coviello, M. A. Casadei and F. Alhaique, *Biomacromolecules*, 2008, **9**, 2014.
- 58 C. A. Bonino, J. E. Samorezov, O. Jeon, E. Alsberg and S. A. Khan, *Soft Matter*, 2011, **7**, 11510.
- 59 P. M. Gilsenan and S. B. Ross-Murphy, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2001, **29**, 53.
- 60 E. Marsich, M. Borgogna, I. Donati, P. Mozetic, B. L. Strand, S. Gomez Salavador, F. Vittur and S. Paoletti, *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, 2007, **84**, 364.

### 8.13 PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

A continuación, se presenta una lista de los congresos científicos en que J. Miras ha participado como primer autor o contribuido como coautor durante el periodo correspondiente a la tesis doctoral. En las contribuciones orales, se indica el conferenciante.

- J. Miras, S. Vílchez, J. Esquena, **Tuneable architecture of chitosan materials by emulsion templating technique**, VI Workshop of the Department of Chemical and Biomolecular Nanotechnology (CBN2014), comunicación póster, Barcelona (España), 16 Octubre 2014.
- F. Roig, J. Miras, J. Esquena, M.J. García-Celma, **Hidrogels i escumes sòlides d'àcid hialuronic per a ser utilitzats com a sistemes d'alliberació de fàrmacs**, Vuitena Trobada de Joves Investigadors dels Països Catalans, comunicació oral, Andorra la Vella (Andorra), 27-29 Novembre 2013.
- S. Vílchez, I. Solè, J. Miras, J. Esquena, **Chitosan a versatile polysaccharide**, V Workshop of the Department of Chemical and Biomolecular Nanotechnology (CBN2013), comunicació oral, Barcelona (España), 17 Octubre 2013.
- J. Miras, S. Vílchez, Th.F. Tadros, J. Esquena, **Stability and rheology of highly concentrated emulsions used as templates for the preparation of chitosan porous foams**, V Workshop of the Department of Chemical and Biomolecular Nanotechnology (CBN2013), comunicació póster, Barcelona (España), 17 Octubre 2013.
- F. Roig, J. Miras, C. Solans, J. Esquena, M.J. García-Celma, **Hyaluronan-based porous foams as drug delivery systems**, 27th Conference of European Colloid and Interface Society (ECIS), comunicació póster, Sofia (Bulgaria), 1-6 Septiembre 2013.
- J. Miras, C. Liu, E. Blomberg, E. Thormann, E. Tyrode, S. Vílchez, J. Esquena, K. Persson, P. Claesson, **pH-response and crosslinking time effect on chitosan**



**nanofilms**, 5th Iberian Meeting on Colloids and Interfaces (RICI5), comunicación oral, San Sebastián (España), 26-28 Junio 2013.

- J. Miras, S. Vílchez, Th.F. Tadros, J. Esquena, **Stability and rheology of highly concentrated emulsions used as templates for the preparation of chitosan porous foams**, 11th International Conference of the European Chitin Society (EUCHIS), comunicación póster, Porto (Portugal), 5-8 Mayo 2013.
- F. Roig, J. Miras, C. Solans, J. Esquena, M.J. Garcia-Celma, **Highly concentrated emulsions as template for hyaluronan porous materials**, V Jornadas IN2UB, comunicación póster, Barcelona (España), 15 Noviembre 2012.
- J. Miras, S. Vílchez, J. Esquena, **Influence of crosslinking and pH response of chitosan films**, IV Workshop CBN'12, comunicación oral, Barcelona (España), 18 Octubre 2012.
- F. Roig, J. Miras, C. Solans, J. Esquena, M.J. Garcia-Celma, **Formulation of crosslinked hyaluronan hydrogels and particles from highly concentrated emulsions**, Workshop “Nano-biocolloidal materials and non-equilibrium self-assembly” (COST2011), comunicación póster, Barcelona (España), 18-19 Junio 2012.
- S. Vílchez, L.A. Pérez-Carrillo, J. Miras, C. Solans, J. Esquena, **Oil-in-alcohol highly concentrated emulsions as templates for the preparation of macroporous materials**, Workshop “Nano-biocolloidal materials and non-equilibrium self-assembly” (COST2011), comunicación póster, Barcelona (España), 18-19 Junio 2012.
- M.M. Alam, L.A. Pérez-Carrillo, S. Vílchez, J. Miras, C. Solans, T. Imae, M. Ujihara, J. Esquena, **Highly concentrated emulsions – a fascinating route for the preparation of carbonaceous porous materials**, Nanoformulation 2012, presentación póster, Barcelona (España), 28 Mayo-1 Junio 2012.

- J. Miras, S. Vílchez, J. Esquena, **Formation and stability of O/W highly concentrated emulsions in presence of chitosan**, Nanoformulation 2012, presentación póster, Barcelona (España), 28 Mayo-1 Junio 2012.
- J. Miras, S. Vílchez, J. Esquena, **Synthesis and characterization of biocompatible chitosan macroporous materials by emulsion templating**, 42 Jornadas Anuales del Comité Español de la Detergencia (CED), comunicación oral, Barcelona (España), 28-29 Marzo 2012.
- F. Roig, J. Miras, J. Esquena, M.J. Garcia-Celma, **Hyaluronan meso/macroporous materials from highly concentrated emulsions**, IV Jornadas IN2UB, comunicación póster, Barcelona (España), 14 Noviembre 2011.
- F. Roig, J. Miras, J. Esquena, M.J. Garcia-Celma, **Hyaluronan porous material from highly concentrated emulsions**, Fourth International Symposium on Advanced micro- and mesoporous materials (VARNA'11), comunicación póster, Varna (Bulgaria), 6-9 Septiembre 2011.

Se adjuntan los *proceedings* presentados en el 42 Jornadas Anuales del Comité Español de la Detergencia (CED 2012) y en el 11th International Conference of the European Chitin Society (EUCHIS 2013).

# SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF BIOCOMPATIBLE CHITOSAN MACROPOROUS MATERIALS BY EMULSION TEMPLATING

J. Miras, S. Vílchez, J. Esquena

Institut de Química Avançada de Catalunya, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IQAC-CSIC), and CIBER en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN)

In the last years, the preparation of organic porous materials from highly concentrated emulsions [1-3], via different synthesis methods, has seen increasing interest due to the versatility to obtain porous materials. These materials have been used at different applications such as separation media, catalyst supports, biological tissue scaffolds and controlled release devices [3]. In this research, we have developed a method to synthesize porous materials of chitosan, using highly concentrated emulsions as templates, via crosslinking in the external phase with genipin, a natural reagent [4]. The emulsion stability and the influence of agitation during emulsification in the final porous material were studied. For this purpose, the emulsions were characterized by optical microscopy to study the droplet size distribution and their stability. Then, rheological measurements were carried out to study the crosslinking process. We could observe that emulsions prepared at 1200 rpm showed lower average diameter, below 1  $\mu\text{m}$ , and higher stability due to the lower polydispersity for 72h by increasing the agitation. Final chitosan porous materials were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM), which shows the influence of agitation during the emulsification that produces the decrease of pore diameter from 200 to 150 nm. Finally, the porous texture was studied by Nitrogen sorption, indicating that the materials are mainly macroporous, which low surface area.

## 1. INTRODUCTION

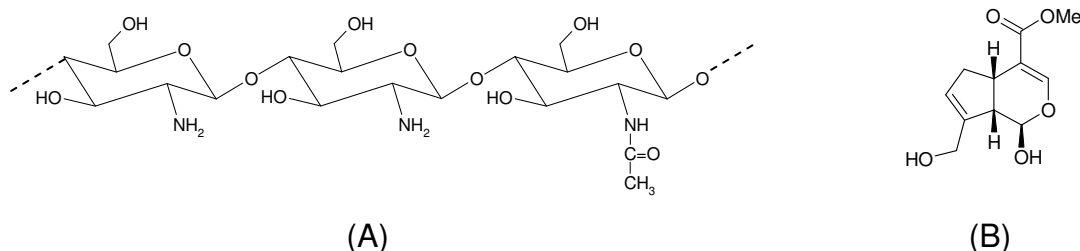
Highly concentrated emulsions are defined as emulsions with an internal phase volume larger than 0.74, the maximum packaging fraction of monodispersed droplets [5-8]. Highly concentrated emulsions have been used for many years in a wide range of applications: food, fuels, cosmetics, etc. In the last years, the interest in these emulsions has increased considerably due to the high number of applications for porous materials prepared by templating in such emulsions: separation media, catalyst supports, biological tissue scaffolds and controlled release devices [3]. A strategy to obtain these porous materials is by polymerization and/or crosslinking reactions in the external phase of the emulsion, followed by the removal of the dispersed phase [9-14].

The preparation of porous materials with natural polymers would have great interest due to their biodegradability and/or biocompatibility. These materials could have potential applications in biomedicine as drug delivery systems.

Jordi Girona, 18-26, Barcelona, Spain

[jonathan.miras@iqac.csic.es](mailto:jonathan.miras@iqac.csic.es)

The present work describes the preparation of porous materials based on chitosan (Figure 1A), a polysaccharide biopolymer obtained from deacetylation of chitin. The procedure involves the chemical crosslinking of chitosan with a natural reagent [15, 16], genipin (Figure 1B), in the external phase of the emulsion, followed by the removal of the dispersed phase and freeze-drying to obtain a porous and low dense chitosan solid foams.



**Figure 1.** Chitosan (A) and genipin (B) molecules.

Chitosan was crosslinked with genipin in the external phase of highly concentrated emulsions, which were characterized by optical microscopy to determine the droplet size distribution and studied by rheology to assess the stability. Finally, the porous texture and the surface area of the chitosan porous materials were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM) and Nitrogen sorption isotherms.

## 2. AIMS

The main aim of this research has been to tailor the pore size by controlling the droplet diameter of the emulsions. The influence of the emulsion droplet size distribution on the pore structure has been studied. For this reason, emulsions with various average droplet sizes were prepared by applying different agitation conditions during emulsification.

## 3. MATERIALS AND METHODS

### 3.1. Materials

Chitosan medium molecular weight with deacetylation degree was purchased from Sigma-Aldrich. The crosslinker genipin with a molecular weight of 226 g/mol was from Challenge Bioproducts Co. (Taiwan). The nonionic surfactant was Synperonic A7 (C<sub>13-15</sub>OE<sub>7</sub>) with HLB of 12.2 purchased from Uniqema. Decane with 94% purity was from Fluka. Acetic acid (99.5wt% purity) was from Panreac. Deionized and filtered water (Ultra-pure Millipore water system, Milli-Q<sub>plus</sub> 185 filter) and phosphate buffer solution pH=7.4 were used for the preparation of all solutions.

### 3.2. Preparation of highly concentrated emulsions

First, chitosan solutions were prepared by dissolving 2% w/v chitosan in 1% v/v acetic acid. This solution was shaken overnight to ensure complete dissolution. Genipin solutions were prepared at 1 wt% and dissolved in phosphate buffer at pH=7.4. Next, oil-in-water (O/W) highly concentrated emulsions were prepared in a selected compositions (Table 1) by dropwise addition of the dispersed phase (decane 80% wt.) to the continuous phase (Synperonic A7 and Chitosan solution) at 25°C with mechanical stirring. Finally, the phosphate buffer at pH 7.4 (Composition 1) or the genipin solution (Composition 2) was added while the sample was stirred.

**Table 1.** Compositions of highly concentrated emulsions

Composition	Synperonic A7 / wt%	Chitosan solution 2% / wt%	Decane / wt%	Phosphate buffer / wt%	Genipin solution 1% / wt%
1	2	9	80	9	-
2	2	9	80	-	9

### 3.3. Preparation of chitosan porous materials

After preparing highly concentrated emulsions (Composition 2), emulsions were kept in a water bath at 40°C for 72h to carry out the crosslinking reaction of chitosan with genipin. Then, crosslinked chitosan foams were purified by Soxhlet solvent extraction with ethanol and water for 12 hours, respectively. Finally, residual water was removed from chitosan foams by freeze-drying.

### 3.4. Characterization of highly concentrated emulsions and chitosan porous materials

#### *Droplet size distribution of highly concentrated emulsions*

Highly concentrated emulsions without crosslinker (Composition 1) were characterized at 40°C for 72h with a Reichert Polyvar 2 microscope, supplied by Leica (Germany), equipped with a video camera (Sony CCD-Iris). The droplet size distributions were obtained by sizing of 750 droplets. An image analysis software (Image J) was used for the statistical analysis to calculate the droplet size distributions as a function of droplet volume (%) and the parameters average droplet size,  $D[4,3]$  (Equation 1) and the polydispersity,  $Span$  (Equation 2), were calculated from these distributions.

$$D[4,3] = \frac{\sum d^4}{\sum d^3} \quad \text{Equation 1}$$

where  $d$  is the droplet diameter ( $\mu\text{m}$ ).

$$Span = \frac{d(0.9) - d(0.1)}{d(0.5)} \quad \text{Equation 2}$$

where  $d(0.1)$ ,  $d(0.5)$  and  $d(0.9)$  are the accumulative volume distribution at 10%, 50% and 90%, respectively.

#### *Rheological properties of highly concentrated emulsions used as templates*

Stability and crosslinking process of highly concentrated emulsions used as template (Composition 2) were studied at 40°C for 72h using an AR-G2 controlled stress rheometer (TA Instruments) in controlled strain mode. These measurements were carried out with parallel plate geometry (plate diameter 20mm) equipped with solvent trap to avoid the evaporation of solvent. The gap in the parallel plate geometry was kept constant at approximately  $2.6 \pm 0.25$  mm. The error in the gap was calculated as the standard deviation of all measurements. This possible error is relatively small (approximately 10%), compared to the gap value of 2.6 mm. Consequently, it could be assumed that error in gap does not influence the measurements. Dynamic strain measurements in the range of strain from 0.05 to 30% were carried out at 2Hz of frequency to study the variation of elastic modulus ( $G'$ ) as a function of time. Two replicas were carried out for each measurement.

#### *Morphological characterization of chitosan porous materials*

The porous structure of freeze-dried polyHIPEs was characterized using a scanning electron microscope, SEM, (Hitachi 4100). Samples were coated by gold sputtering.

#### *Specific surface area determination of chitosan porous materials*

Nitrogen sorption isotherms were obtained using a Quantachrome Autosorb-iQ porosimeter. To determine the specific surface area was applied the Brunauer-Emmett-Teller (BET) method [17]. Samples were outgassed at 55°C for twelve hours and weighed prior sorption experiments.

## **4. RESULTS AND DISCUSSION**

The main objective of this research was to obtain porous chitosan foams and to control its pore size. The foams have been obtained by crosslinking chitosan with genipin, in the external phase of highly concentrated emulsions. For this reason, the droplet size distribution of emulsions, prepared at 700 and 1200 rpm, and the pore size of chitosan foams were characterized by different techniques.

### **4.1. Determination of droplet size distributions of highly concentrated emulsions**

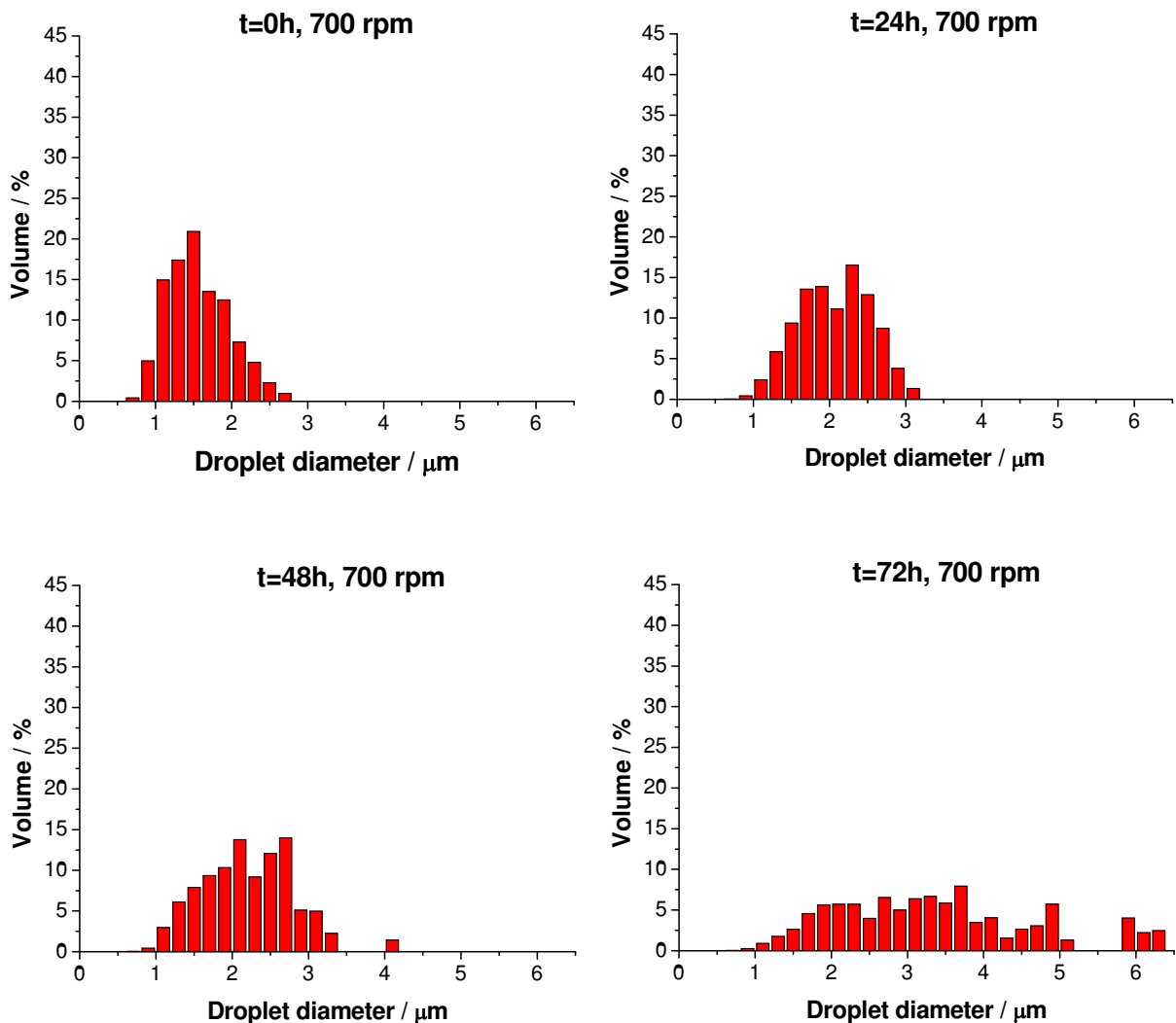
Highly concentrated emulsions (Corresponding to the composition 1) were characterized by optical microscopy for 72h at 40°C. Values of average droplet diameter ( $D[4,3]$ ) and polydispersity (Span) were calculated (Table 2). The influence of agitation during emulsification was studied. The initial diameter decreases from 1.55 (at 700 rpm) to 0.87  $\mu\text{m}$  (at 1200 rpm). As a function of time, from  $t=0\text{h}$  to  $t=72\text{h}$ ,  $D[4,3]$  increased for both emulsions. The emulsion prepared at faster agitation (1200 rpm) had always smaller sizes and polydispersities (Spans) than those prepared at

slower agitation, independently of time. A summary of these results is shown in Table 2.

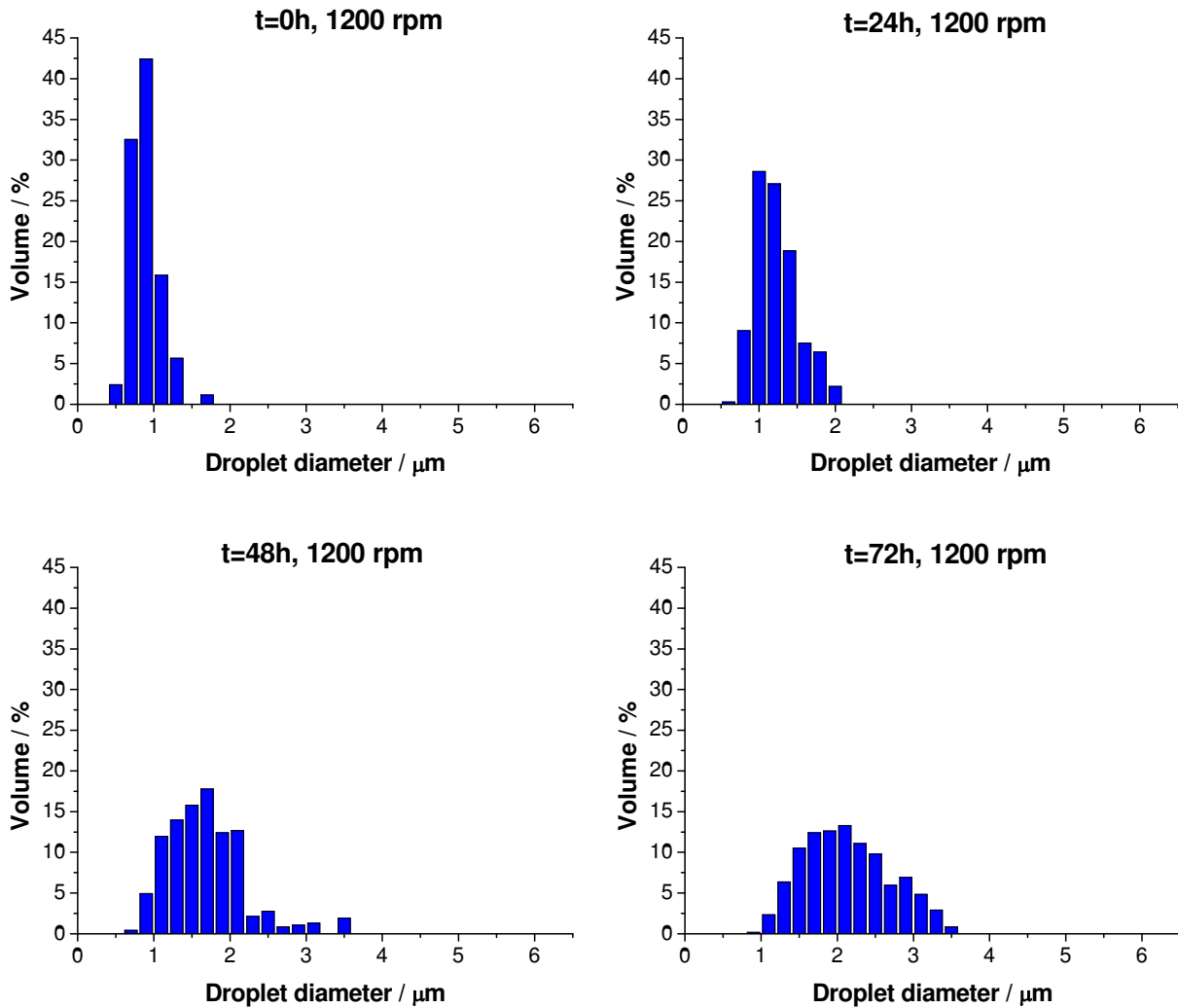
**Table 2.** Average droplet size diameter ( $D[4,3]$ ) and polydispersity (Span), for composition 1

t / h	700 rpm		1200 rpm	
	$D[4,3]$ / $\mu\text{m}$	Span	$D[4,3]$ / $\mu\text{m}$	Span
0	1.55	0.72	0.87	0.52
24	2.06	0.60	1.22	0.63
48	2.21	0.71	1.68	0.68
72	3.45	0.97	2.13	0.74

The droplet size distribution for both emulsions were compared (Figure 2 for the emulsion at 700 rpm and Figure 3 for the emulsion at 1200 rpm), where the differences between emulsions are clearly observed.



**Figure 2.** Droplet size distribution in volume (%) of the emulsion at 700 rpm for different times (0, 24, 48 and 72h)



**Figure 3.** Droplet size distribution in volume (%) of the emulsion at 1200 rpm for different times (0, 24, 48 and 72h)

Comparing both droplet size distributions, at 700 and at 1200 rpm, it was observed that the increase in agitation during the emulsification produces a decrease in the average droplet diameter and also in the polydispersity of the emulsion, obtaining higher monodispersity and improved stability at 1200 rpm.

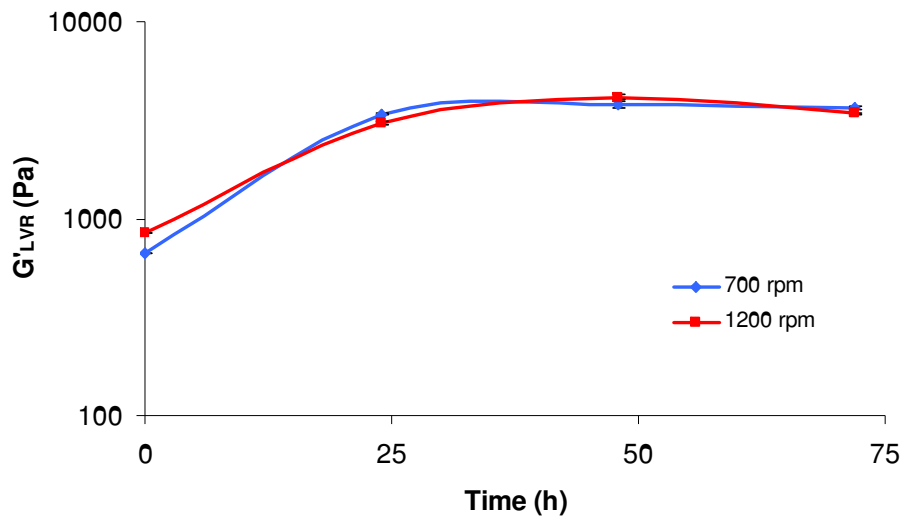
After controlling the characteristic properties (droplet diameter and polydispersity) of highly concentrated emulsions, prepared at 700 and 1200 rpm, these emulsions were used to obtain chitosan porous foams. The crosslinker was added to the emulsion prepared with composition 2 (Table 1). The stability and the crosslinking process between chitosan and genipin was studied by rheology.

#### 4.2. Rheological properties of highly concentrated emulsions crosslinking with genipin

Emulsions prepared at 700 and 1200 rpm were characterized by dynamic strain measurements for 72h at 40°C. Rheological measurements were carried out in the range from 0.05 to 30% strain at constant frequency of 2Hz and the values of elastic



modulus ( $G'$ ) in the linear viscoelastic region (LVR) were compared as a function of time for both emulsions (Figure 4). Linear viscoelastic region corresponds to the strain range where  $G'$  is constant.



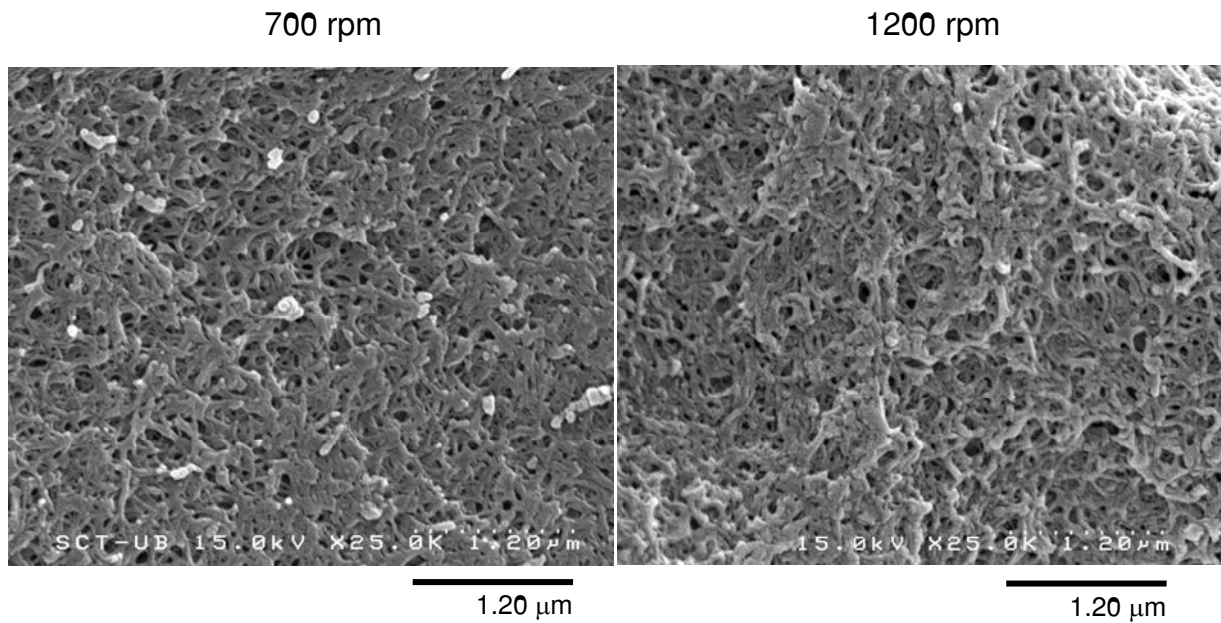
**Figure 4.** Elastic modulus ( $G'$ ) in the linear viscoelastic region (LVR) for emulsions at 700 and 1200 rpm, as a function of crosslinking time at 40°C. The values are the average of two replicas. The standard deviation is around 2%, respect to the values of  $G'$ , and hence the error bars are very close to the points in the plot.

As is shown in Figure 4,  $G'$  in the linear viscoelastic region increases with time in both emulsions, at 700 and 1200 rpm. The elastic modulus  $G'$  was higher for the emulsion with smaller droplet size, prepared at higher speed (1200 rpm). This result can be attributed to the fact that smaller droplets are more elastic and less deformable due to higher Laplace pressure. At long crosslinking times, the elastic modulus  $G'$  decreases, probably due to some instability process.

#### 4.3. Preparation and characterization of chitosan porous materials

Chitosan porous foams were obtained after washing by soxhlet extraction to remove decane and surfactant and finally, samples were freeze-dried to characterize them by SEM and Nitrogen sorption.

Chitosan porous foams were obtained using composition 2 (in presence of genipin), in both 700 and 1200 rpm, after 72h in a water bath at 40°C. These materials were characterized by SEM (Figure 5) to study the influence of agitation during emulsification in the pore size of such materials.

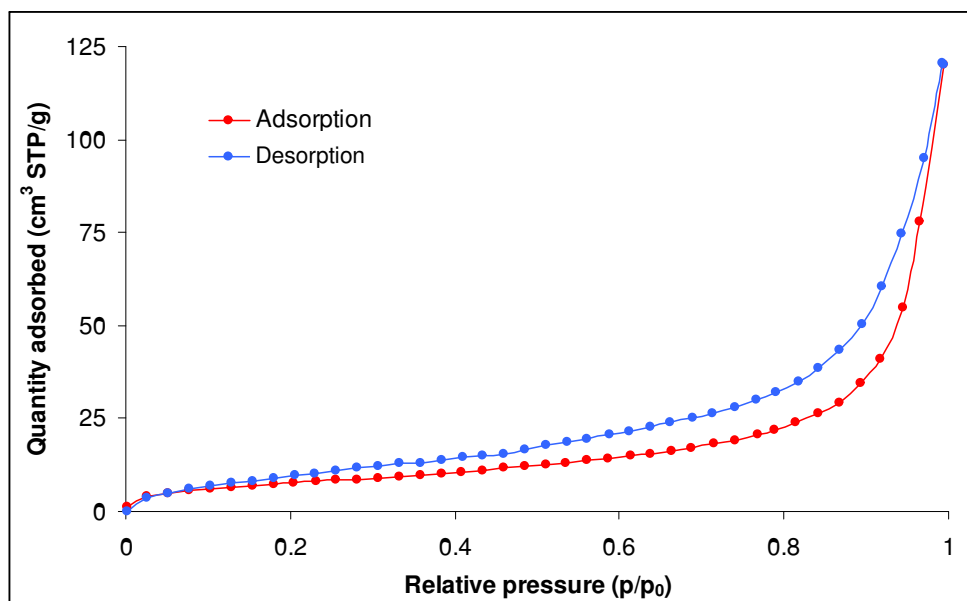


**Figure 5.** SEM images for chitosan materials obtained using highly concentrated emulsions as templates prepared at 700 and 1200 rpm.

SEM images show the uniform porous structure obtained at two different agitation speeds during emulsification, 700 and 1200 rpm. A slightly decrease of pore diameter was observed by increasing agitation. From these SEM images, the pore diameter was estimated to be below 200 nm at 700 rpm and below 150 nm at 1200 rpm. These values confirm the influence of agitation during the emulsification in the size pore of chitosan porous materials.

#### **4.4. Porous texture of chitosan solid foams**

Finally, chitosan porous materials were characterized by Nitrogen sorption isotherms to determine their specific surface area. As illustration, the Nitrogen adsorption and desorption isotherms are shown in Figure 6, corresponding to the material obtained at 700 rpm.



**Figure 6.** Nitrogen sorption isotherms of chitosan porous material obtained at 700 rpm

The hysteresis loop appeared at high relative pressure, which is typical from macroporous materials, and the fitting of BET equation provided a specific surface area of 29 m<sup>2</sup>/g. This low value indicates absence of mesopores, and confirms that the material is mainly macroporous.

## 5. CONCLUSIONS

Chitosan porous materials have been obtained using O/W highly concentrated emulsions as templates. These highly concentrated emulsions were prepared controlling the average droplet size. The emulsions showed an increase in droplet size as a function of time, which could be due to coalescence. The addition of the crosslinker induced the gelification in the external phase of the emulsion, which become predominantly elastic, with a high value of  $G'$ . This elastic modulus increased even further with time, after reaching a maximum at 48h. Porous chitosan foams were obtained after washing and freeze-drying. These materials were mainly macroporous, with pore sizes depending of the emulsion droplet size. This work has demonstrated that highly concentrated emulsions effectively control the pore size of the final chitosan materials. The macropores size can be controlled by tuning agitation speed.

## 6. REFERENCES

- [1] Cameron, N.R., Sherrington, D.C., *Adv. Polym. Sci.*, 126, 163-214 (1996).
- [2] Solans, C., Esquena, J., Azemar, N., *Curr. Opin. Colloid. In.*, 8 (2), 156-163 (2003).
- [3] Esquena, J., Solans, C., "Highly concentrated emulsions as templates for solid foams", in: "Emulsions and emulsion stability" (Ed. J. Sjöblom), Francis & Taylor (Surfactant Science Series), New York (2006).
- [4] Esquena, J., Solans, C., Vílchez, S., Erra, P., Miras, J., Spanish patent, P200930038 (2010).
- [5] Lissant, K.J., *Colloid. Interf. Sci.*, 22 (5), 462-468 (1966).
- [6] Princen, H.M., *Colloid. Interf. Sci.*, 71 (1), 55-66 (1979).
- [7] Solans, C., Pons, R., Kunieda, H., "Modern Aspects of Emulsion Science" (Ed. B.P. Binks), Cambridge: Royal Society of Chemistry (1998), pp 367-394.
- [8] Solans, C., Esquena, J., Azemar, N., Rodríguez, C., Kunieda, H., "Emulsions: Structure, Stability and Interactions" (Ed. D.N. Petsev), Amsterdam, Elsevier (2004), pp 367-394.
- [9] Barby, D., Haq, Z., European Patent 0060138 (Unilever), 1982.
- [10] Williams, J.M., Wroblewski, D.A., *Langmuir*, 4, 656-662 (1988).
- [11] Cameron, N.R., Sherrington, D.C., *Adv. Polym. Sci.*, 126, 163-214 (1996).
- [12] Ruckenstein, E., *Adv. Polym. Sci.*, 127, 3-58 (1997).
- [13] Esquena, J., Sankar, G.S.R.R., Solans, C., *Langmuir*, 19, 2983-2988 (2003).
- [14] Maekawa, H., Esquena, J., Bishop, S., Solans, C., Chmelka, B.F., *Adv. Materials*, 15, 591-596 (2003).
- [15] Chen, S., Wu, Y. C., Mi, F.L., Lin, Y.H., Yu, L.C., Sung, H.W., *J. Controlled Release*, 96, 285-300 (2004).
- [16] Vilchez, S., Samitier, V., Porras, M., Esquena, J., Erra, P., *Tenside Surf. Det.*, 46, 1-5 (2009).
- [17] Brunauer, S., Emmett, P.H., *J. Am. Chem. Soc.*, 60, 309-319 (1938).

# STABILITY AND RHEOLOGY OF HIGHLY CONCENTRATED EMULSIONS USED AS TEMPLATES FOR THE PREPARATION OF CHITOSAN POROUS FOAMS

J. Miras<sup>1</sup>, S. Vilchez<sup>1,\*</sup>, Th.F. Tadros<sup>2</sup> and J. Esquena<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute for Advanced Chemistry of Catalonia (IQAC), CSIC, and CIBER of Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN)*

*Jordi Girona, 18-26, Barcelona, Spain*

<sup>2</sup>*89 Nash Grove Lane, Wokingham, Berkshire RG40 4HE, United Kingdom*

\*e-mail address: [susana.vilchez@iqac.csic.es](mailto:susana.vilchez@iqac.csic.es)

## INTRODUCTION

Highly concentrated emulsions (HCE), which are often denominated as high internal phase emulsions (HIPE), gel-emulsions, etc., are emulsions where the dispersed phase volume fraction occupies at least 0.74, the maximum packing of spherical droplets [1,2]. These emulsions have the structure of bilyquid foams and behave as gels since they present viscoelastic or plastic properties. Due to their properties, HCEs are of interest for the preparation of porous foams by the emulsion templating technique that consists in a polymerization or crosslinking process, in the continuous phase of the emulsions, followed by the removal of the dispersed phase (emulsion droplets) [4]. These porous foams would be interesting to use for fuel cell and battery applications, support for catalysts, templates for the preparation of other materials, etc [4].

The rheological properties of HCEs are tunable depending on a wide range of variables: droplet size and polydispersity, viscosity of continuous and dispersed phase and temperature [3]. The current work describes a systematic study on the influence of droplet size on the viscoelastic properties of HCEs used as templates for the preparation of chitosan-based highly porous foams. For this purpose, oil-in-water (O/W) highly concentrated emulsions (HCEs) were used as templates [5] by covalently crosslinking of chitosan with genipin. This is a natural reagent extracted from gardenia fruits (*Gardenia jasminoides* Ellis), widely used as a crosslinker because of its low toxicity. For instance, it is considered about 5000-10000 times less cytotoxic than glutaraldehyde [6]. Due to this low toxicity, it is extensively used such as manufacture of drug carriers for controlled release or encapsulation of biological products [7].

In the present study, chitosan highly porous foams have been obtained by crosslinking in the external phase of O/W highly concentrated emulsions. The droplet size was tailored by controlling the agitation speed during emulsification, determining the droplet size distributions by optical microscopy. The chitosan crosslinking reaction was monitored by rheological measurements and, after removing the dispersed phase of crosslinked chitosan materials, chitosan-based foams were obtained and characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM).

## MATERIALS and METHODS

**Materials.** Nonionic surfactant Synperonic A7 (C<sub>13-15</sub>EO<sub>7</sub>) with HLB of 12.2 (Uniqema). Chitosan medium molecular weight (Sigma-Aldrich) with deacetylation degree of 85%. Decane (Fluka) with 98% purity. Genipin (Challenge Bioproducts Co.) with an average molecular weight of 226 g/mol.

**Preparation of solutions.** 2 wt% chitosan solution was prepared in 1 vol% acetic acid. This solution was shaken overnight by magnetic agitation to ensure complete dissolution. Genipin solution (1 wt%) was prepared in phosphate buffer at pH 7.4.

**Preparation of highly concentrated emulsions.** Three O/W highly concentrated emulsions were prepared (Table 1) by dropwise addition of decane to the mixture Synperonic A7/acetic acid (HCE1) or Synperonic A7/Chitosan solution (HCE2 and HCE3) at 25°C. These experiments were carried out at two different agitation rates, stirring at 700 and 1200 rpm. Finally, acetic solution, phosphate buffer or genipin solution, HCE1, HCE2 or HCE3, respectively, was added while the emulsion was stirred. After preparing the emulsions, they were kept in a water bath at 40°C for 72h.

**Table 1. Composition (wt%) of highly concentrated emulsions**

Emulsion	Surfactant	Continuous phase	Dispersed phase
HCE1	2% Synperonic A7	9% acetic acid (1 vol%) 9% phosphate buffer	80% decane
HCE2	2% Synperonic A7	9% Chitosan solution (2 wt%) 9% phosphate buffer	80% decane
HCE3	2% Synperonic A7	9% Chitosan solution (2 wt%) 9% Genipin solution (1 wt%)	80% decane

**Optical microscopy.** Emulsions, in absence of genipin (HCE1 and HCE2) were characterized at 40°C for 72h with a Reichert Polyvar 2 optical microscope with image analysis. The droplet size distributions (in vol%) were determined by sizing randomly 800 droplets from microscope images. Two characteristic parameters were calculated from droplet size distributions, the de Brouckere mean diameter (Equation 1),  $D[4,3]$ , and the polydispersity, defined as the Span (Equation 2).

$$D[4,3] = \frac{\sum d^4}{\sum d^3} \quad \text{Equation 1}$$

where  $d$  is the droplet diameter ( $\mu\text{m}$ ).

$$\text{Span} = \frac{d(0.9) - d(0.1)}{d(0.5)} \quad \text{Equation 2}$$

where  $d(0.1)$ ,  $d(0.5)$  and  $d(0.9)$  are the cumulative volume distributions at 10%, 50% and 90%, respectively.

**Rheological measurements.** Emulsions corresponding to HCE3 composition (in presence of genipin) were kept in a water bath for 72h at 40°C. The crosslinking reaction of chitosan with genipin was monitored by rheology. An AR-G2 controlled stress rheometer (TA Instruments) was used. This characterization has been performed by the Nanostructured Liquid Characterization Unit of the Spanish National Research Council (CSIC) and the

Biomedical Networking Center (CIBER-BBN), located at IQAC-CSIC. The experiments consisted in creep measurements, where a constant shear stress is applied ( $\sigma = 10$  Pa) and the variation of the compliance  $J$  ( $J = \gamma / \sigma$ ) with time is obtained, where  $\gamma$  is the deformation and  $\sigma$  the applied stress. Measurements were also carried out for 2 min after removing the stress (creep recovery). The gap of the parallel plate geometry used was kept at 2700  $\mu\text{m}$ .

**Preparation of chitosan-based foams.** After keeping HCE3 emulsions in a water bath at 40°C for 72h, final materials were cleaned by Soxhlet extraction with ethanol and water for 12 hours, in each solvent. Finally, the materials were dried in a freeze-dryer to remove residual water, obtaining the crosslinked chitosan highly porous foams.

**Scanning electron microscopy (SEM).** The porous structure of freeze-dried chitosan foams was characterized using a scanning electron microscope (Hitachi 4100). Samples were coated by gold sputtering.

## RESULTS and DISCUSSION

**Stability of HCEs and chitosan influence by droplet size measurements.** The stability of the emulsions was studied at 40°C for 72h. The average droplet size,  $D[4,3]$ , and polydispersity, Span, were calculated from droplet size distributions for HCE1 (in the absence of chitosan) and HCE2 (in the presence of chitosan). Table 2 shows the values of  $D[4,3]$  and Span for both HCEs as a function of time, at two different agitation rates, 700 and 1200 rpm.

Table 2. Average droplet diameter,  $D[4,3]$  ( $\mu\text{m}$ ), and polydispersity, Span, for HCE1 (without chitosan) and HCE2 (with chitosan) as a function of time and agitation rate

		700 rpm		1200 rpm	
		HCE1 (without chitosan)	HCE2 (with chitosan)	HCE1 (without chitosan)	HCE2 (with chitosan)
<b>D[4,3]</b>	<b>t=0h</b>	5.2	1.5	2.1	0.9
	<b>t=24h</b>	5.5	2.1	2.3	1.2
	<b>t=48h</b>	6.4	2.2	2.4	1.7
	<b>t=72h</b>	6.5	3.5	2.7	2.1
<b>Span</b>	<b>t=0h</b>	0.9	0.7	0.9	0.5
	<b>t=24h</b>	0.9	0.6	0.8	0.6
	<b>t=48h</b>	0.8	0.7	0.8	0.7
	<b>t=72h</b>	0.8	1.0	0.9	0.7

As expected, the results showed a significant decrease of droplet size by increasing the agitation rate, while Span remained almost constant. The addition of chitosan in the continuous phase (HCE2) showed a significant reduction in the average droplet diameter at all agitation speeds. This decrease in size could be a consequence of the increase in the external phase viscosity, which results in a increase in stress produced during agitation (the stress is given by the product of velocity gradient and the viscosity) [8].

A gradual increase of  $D[4,3]$  was observed for both HCEs that could be due to result of coalescence and/or Oswald ripening [8]. To test which of these processes was the main emulsion instability mechanism, the values of cubic droplet radius ( $r^3$ ) versus time (Ostwald ripening) [9] and logarithm of droplet radius ( $\log r$ ) versus time (Coalescence) [10] were plotted. Straight lines were obtained for 700 and 1200 rpm in plots  $\log r$  vs time for HCE1 (without chitosan), shown in Figure 1. These results might indicate that emulsion instability was due to coalescence. Additionally, both emulsions showed a coalescence rate, as the slope of the line, constant ( $0.001 \text{ h}^{-1}$ ), that it is reasonable low indicating a suitable stability of the emulsions. However, the presence of chitosan produces a decrease in the stability that those obtained without chitosan, showing higher coalescence rate ( $0.005 \text{ h}^{-1}$ ) as indicated in the plot  $\log r$  vs time (Figure 1).

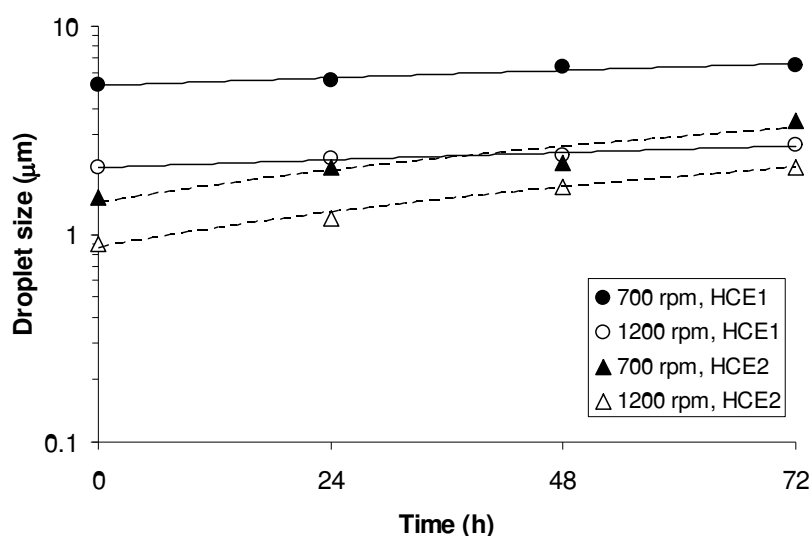
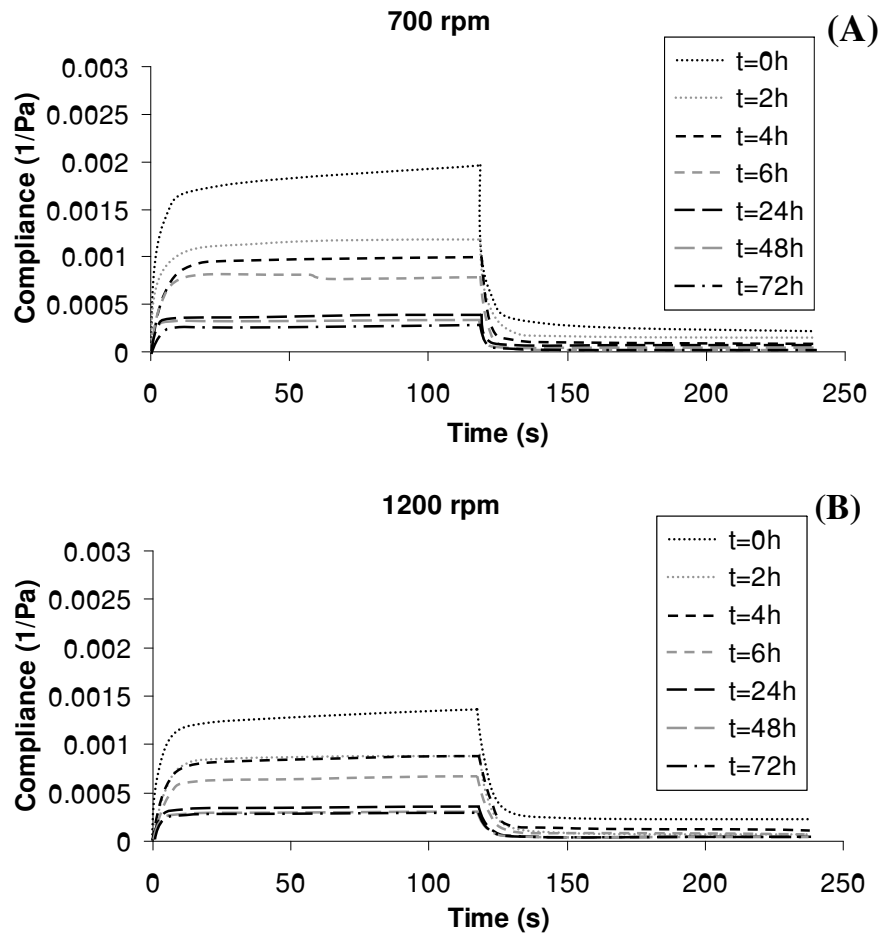


Figure 1. Droplet radius versus time for HCE1 (without chitosan) and HCE2 (with chitosan)

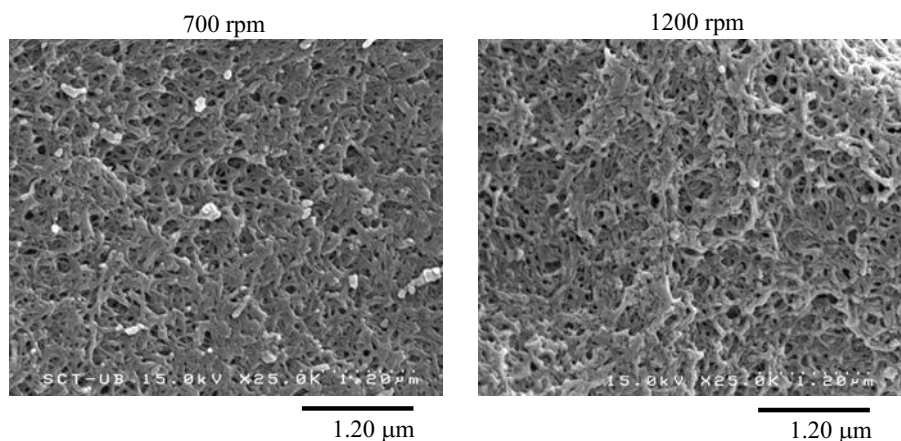
**Monitoring of chitosan crosslinking reaction using rheological measurements.** The chitosan crosslinking process was investigated with constant stress (creep) measurements as a function of crosslinking time (0, 2, 4, 6, 24, 48 and 72h) for HCE3 prepared at 700 and 1200 rpm. The creep compliance and recovery curves obtained at stress of 10 Pa are shown in Figure 2. It can be clearly observed that compliance decreases with time, after removing the applied stress ( $t > 120\text{s}$ ) for both agitation rates, 700 rpm (Figure 2A) and 1200 rpm (Figure 2B). This trend is due to the change from viscoelastic liquid ( $t = 0\text{h}$ ) to viscoelastic solid ( $t \geq 24\text{h}$ ), because of crosslinking. These results also show that the reaction is almost completed after 24h. It should be mentioned that the compliance values obtained for emulsions prepared at 1200 rpm were lower than for the emulsion obtained at 700 rpm, indicating a more solid-like behavior, probably due to smaller droplet size, which increases the elastic modulus (See Table 2).





**Figure 2. Creep & recovery measurements for a shear stress applied of 10 Pa for HCE3 emulsions prepared at 700 (A) and 1200 rpm (B).**

Highly porous chitosan-based foams were obtained after crosslinking and purification by Soxhlet extraction and freeze-drying. The morphology of the foams was characterized by SEM, observing that the pore size slightly decreased with increasing agitation velocity (Figure 3). From these SEM images, the pore diameter was estimated below 200 nm at 700 rpm and below 150 nm at 1200 rpm. These values confirm the influence of agitation during the emulsification in the size pore of chitosan-based porous foams.



**Figure 3. SEM micrographs of crosslinked chitosan foams at two different agitation rates.**

## CONCLUSIONS

Chitosan-based porous foams, with controlled droplet size, were successfully obtained using oil-in-water highly concentrated emulsions as templates via chitosan crosslinking with genipin. The incorporation of chitosan produced a large decrease on droplet size, probably due to the viscosity increase in the continuous phase of emulsions. However, the presence of chitosan (HCE2) produces an increase in coalescence rate. The crosslinking reaction greatly influences rheological properties, changing from a viscoelastic liquid to a viscoelastic solid at  $t \geq 24$ h. Probably, the crosslinking reaction is almost completed after 24h. Finally, SEM images of chitosan porous foams showed that pore size can be decreased by increasing agitation during emulsification. This work has demonstrated that highly concentrated emulsions effectively control the pore size of the final chitosan porous materials.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness for the CTQ2008-06892-C03-01 and CTQ2011-23842 projects and Generalitat de Catalunya for the 2009SGR961 grant.

## REFERENCES

- [1] Lissant, K. J. (1966). The geometry of high-internal-phase-ratio emulsions. *J. Col. Int. Sci.*, 22, 462-68.
- [2] Princen, H. M. (1979). Highly concentrated emulsions. I. Cylindrical systems. *J. Colloid. Interf. Sci.*, 71, 55-66.
- [3] Tadros, Th.F. (2010). *Rheology of emulsions*, Wiley-VCH, Weinheim (Germany).
- [4] Esquena, J., Solans, C. (2006). Highly concentrated emulsions as templates for solid foams. In *Emulsions and emulsion stability* (Ed. J. Sjöblom), pp. 245-261, Surfactant Science Series.
- [5] Esquena, J., Solans, C., Vilchez, S., Erra, P., Miras, J. (2010). Spanish patent, P200930038.
- [6] Nishi, C., Nakajima, N., Ikada, Y. (1995). In vitro evaluation of cytotoxicity of diepoxy compounds used for biomaterial modification. *J. Biomed. Mat. Res.*, 29, 829-34.
- [7] Muzzarelli, R.A.A. (2009). Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydr. Pol.*, 77, 1-9.
- [8] Tadros, Th.F. (2009). *Emulsions Science and Technology: A General Introduction*. In *Emulsion Science and Technology* (Ed. Wiley-VCH), Weinheim (Germany).
- [9] Lifshitz, I.M., Slyozov, V.V. (1961). The kinetics of precipitation from supersaturated solid solutions. *J. Phys. Chem. Solids*, 19, 35-50.
- [10] Cockbain, E.G., McRoberts, T.S. (1953). The stability of elementary emulsion drops and emulsions. *J. Colloid Sci.*, 8, 440-451.





