

Encapsulación multicapa de terpenos bioactivos para acción biocida prolongada.

Multilayer encapsulation of bioactive terpenes for enhanced long-term biocidal performance

Doctorando:

Sergio MARINO

<https://orcid.org/0009-0000-0142-6992>

Universidad Tecnológica Nacional - Facultad Regional La Plata - Argentina

smarino315@gmail.com

Directora:

Andrea PEREYRA

Resumen

La encapsulación eficaz de compuestos activos depende de las interacciones entre la molécula huésped y la matriz de soporte, lo que determina la eficiencia en la carga, la integridad estructural y la cinética de liberación. Este trabajo describe el desarrollo de un nuevo material híbrido basado en terpeno/MCM-41/policaprolactona (PCL) mediante una estrategia de encapsulación multicapa secuencial. El mentol o el timol se cargaron en los mesoporos de MCM-41 y posteriormente se microencapsularon dentro de PCL mediante electrospray. La integridad estructural, la estabilidad química y la morfología de los sistemas híbridos se evaluaron mediante microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). La encapsulación multicapa preservó la estabilidad estructural a lo largo del tiempo, mientras que las microcápsulas de control que contenían timol incorporado directamente en PCL sufrieron una deformación progresiva y un colapso estructural. El análisis por FTIR de las bandas de estiramiento del carbonilo y del hidroxilo reveló interacciones de enlaces de hidrógeno $-C=O \cdots H-O-$ que confirman la miscibilidad molecular y el efecto plastificante del timol libre dentro de la matriz de PCL. Los ensayos microbiológicos contra *P.aeruginosa* validaron la eficacia biocida de largo plazo del sistema de doble barrera.

Palabras clave: encapsulación multicapa; timol; mentol; MCM-41; poli(ϵ -caprolactona); protección biocida a largo plazo.

Abstract

Effective encapsulation of active compounds depends on well-balanced interactions between the guest molecule and the host matrix, which determines loading efficiency, structural integrity, and release kinetics. This work reports the development of a novel hybrid material based on terpene/MCM-41/polycaprolactone (PCL) through a sequential multilayer encapsulation strategy. Menthol or thymol were loaded into MCM-41 mesopores and subsequently microencapsulated within PCL via electrospraying. The structural integrity, chemical stability, and long-term morphological aspect of the hybrid systems were evaluated by optical microscopy, scanning electron microscopy (SEM), and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR). The multilayer encapsulation preserved structural stability over time, whereas control microcapsules containing thymol directly incorporated into PCL underwent progressive deformation and structural collapse. FTIR analysis of the carbonyl and hydroxyl stretching regions revealed $-C=O \cdots H-O-$ hydrogen bonding interactions confirming the molecular miscibility and plasticizing effect of free thymol within the PCL matrix. Microbiological assays against *P.aeruginosa* validated the long-term biocidal efficacy of the dual-barrier system.

Keywords: multilayer encapsulation; thymol; menthol; MCM-4; poly(ϵ -caprolactone); long term biocidal protection.

Introducción

La encapsulación de sustancias activas es actualmente una de las estrategias más reconocidas para garantizar la estabilización de compuestos bioactivos. Lograr una encapsulación eficaz requiere ajustar cuidadosamente las interacciones entre la molécula huésped y la matriz de soporte, ya que las incompatibilidades pueden dificultar la retención y la estabilización, provocando una liberación prematura o incontrolada al medio circundante. Por el contrario, una compatibilidad excesiva entre los componentes puede dar lugar a una alta miscibilidad y fuertes interacciones intermoleculares, lo que puede perjudicar el proceso de liberación. En la literatura, diversas estrategias destinadas a proteger los compuestos activos reciben diferentes denominaciones, como encapsulación multicapa, recubrimiento sucesivo o sistemas integrados (Arzani, 2022 y Wang, 2024). Independientemente de la terminología, el objetivo fundamental sigue siendo la preservación de la integridad estructural y la funcionalidad del agente activo frente a factores ambientales o interacciones químicas desfavorables con la matriz de soporte.

Los compuestos monoterpénicos derivados de aceites esenciales, como el timol y el mentol, son de gran valor en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética debido a sus propiedades antisépticas, antibacterianas y antifúngicas. Actualmente se presentan como una alternativa ecológica a los biocidas sintéticos tradicionales utilizados en numerosos sectores industriales para prevenir el crecimiento de microorganismos que pueden comprometer la calidad, la seguridad y la vida útil del producto (Gómez de Saravia, 2018 y Trombetta, 2025). Estas sustancias sintéticas (comúnmente basadas en isotiazolinonas) son esenciales en industrias como la de recubrimientos, textiles, cosméticos y productos farmacéuticos. Sin embargo, se observan importantes inconvenientes, como alta toxicidad, sensibilidad a las condiciones ambientales (especialmente pH y temperatura) y efectos adversos en la salud humana y los ecosistemas (Pereyra, 2015 y Machado, 2019). Como resultado, su uso está cada vez más restringido por marcos regulatorios estrictos, que limitan las concentraciones permitidas según la aplicación (Mardones, 2018).

Este trabajo presenta el desarrollo y la caracterización de un nuevo material híbrido compuesto de terpeno/MCM-41/poli(ϵ - caprolactona) sintetizado mediante una vía de encapsulación sucesiva. Se utilizó la técnica de electrospray para producir microcápsulas de poli(ϵ - caprolactona) (PCL) que contenían timol o mentol previamente cargados en los canales nanométricos de MCM-41. La morfología, la integridad estructural y las interacciones químicas de las microcápsulas se evaluaron mediante microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Se evaluó la respuesta microbiológica de las microcápsulas frente a *Pseudomonas aeruginosa* tanto bajo una exposición inmediata a corto plazo (hasta 72 h) como después de un período de envejecimiento con solvente de 7 días para validar el rendimiento del sistema de doble barrera y su capacidad para el control bacteriano a largo plazo.

Desarrollo

Materiales. Los reactivos utilizados en este estudio fueron ortosilicato de tetraetilo (TEOS 98%, Aldrich), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB 96%, Sigma-Aldrich), ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 98%, Anedra), amoníaco (25%, Merck), alcohol etílico absoluto (99,5%, Soria Analytical), timol o mentol (T o M, 99% de pureza, Sigma-Aldrich), cloroformo (CF, grado PA, Ciccarelli) y policaprolactona lineal (PCL, $M_w=45.000$ g/ mol, Perstorp, Malmö, Suecia).

Síntesis de MCM-41 e impregnación. Se aplicó el método sol-gel utilizando TEOS y CTAB (O Grün, 1999). La composición molar fue 1 TEOS: 0,3 CTAB: 11 NH_4OH : 58 EtOH: 144 H_2O . La temperatura media de síntesis fue de 30 °C. Se aseguró la disolución completa del CTAB y, posteriormente, se añadió la fuente de silicio gota a gota bajo agitación a 30 °C durante 2 h. El material se filtró y se lavó con etanol y luego con agua destilada. Finalmente, se eliminó el exceso de humedad secándolo a 100 °C durante 24 h. El surfactante se eliminó mediante un tratamiento térmico en aire a 510 °C durante 2 h, 5 °C/min. Luego, se impregnó 1 g de MCM-41 con 6 mL de una solución de 0,5 mol L^{-1} de terpeno en etanol. Las muestras se secaron y se mantuvieron bajo condiciones controladas (25 °C y 50 % HR) durante 7 días. Las muestras se denominaron MCM-T y MCM-M (ver Tabla 1).

Encapsulación. Se obtuvieron microcápsulas de poli(ϵ - caprolactona) mediante el método de electrospray reportado en (Pardini, 2023). Las microcápsulas se recogieron en una lámina cuadrada de acero inoxidable (de 10 cm por lado) colocada

a 20 cm de la punta de la aguja y se almacenaron en un desecador al vacío a temperatura ambiente durante 48 horas para eliminar el cloroformo residual. Un conjunto de microcápsulas se dejó envejecer en un desecador al vacío durante 30 días. Las microcápsulas se denominaron PCL-T, PCL-M, PCL-MCM-T y PCL-MCM-M (ver Tabla 1). Todos los sistemas se fabricaron con las mismas cantidades de terpenos.

Caracterización. Se obtuvieron micrografías ópticas utilizando un microscopio Olympus BX51. Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) se adquirieron en un microscopio Zeiss Cross Beam 340 operado a 2 kV. Las muestras se recubrieron con una fina película de oro. Las secciones transversales de las microcápsulas se obtuvieron mediante haz de iones focalizado (FIB). La microscopía electrónica de transmisión (TEM) se realizó utilizando un microscopio Tecnai F20 G2 operado a 200 kV. Los espectros FTIR-ATR se obtuvieron en un espectrofotómetro FT-IR Shimadzu IRAffinity-1 con un accesorio ATR iD5.

Ensayos microbiológicos. Se determinó la respuesta antimicrobiana de las microcápsulas de PCL-MCM-terpeno frente a *P. aeruginosa* a través de la evaluación de la densidad óptica (OD_{600}). Se realizaron ensayos a corto (72 h) y a largo plazo (luego de 7 días de envejecimiento en solvente). Los ensayos a corto plazo evaluaron la eficacia de la barrera de la capa externa de PCL para prevenir la liberación prematura del biocida. Los ensayos a largo plazo incluyeron un período de envejecimiento en dimetilsulfóxido (DMSO) para evaluar la difusión de los terpenos a través de la capa polimérica.

Muestra	Compuestos
T	Timol
M	Mentol
MCM	MCM-41
PCL	Poli (ϵ - caprolactona)
MCM-T	Timol encapsulado en MCM-41
MCM-M	Mentol encapsulado MCM-41
PCL-T	Timol encapsulado en PCL
PCL-M	Mentol encapsulado en PCL
PCL-MCM-T	MCM-41 impregnado con timol y encapsulado en PCL
PCL-MCM-M	MCM-41 impregnado de mentol y encapsulado en PCL

Tabla 1. Identificación de las muestras.

Resultados

Caracterización morfológica y estructural de MCM-41. Las imágenes SEM y TEM (Fig. 1 a-b) mostraron partículas de forma esférica, con una amplia distribución de tamaño (entre 100 y 700 nm) dispuestas en aglomerados. Las imágenes de TEM evidenciaron que las partículas esféricas presentaron los mesocanales radiales típicos de este tipo de material. Los difractogramas a bajos ángulos (SAXS, Fig. 1c) muestran las reflexiones típicas de este material y son consistentes con la estructura hexagonal 2D esperada.

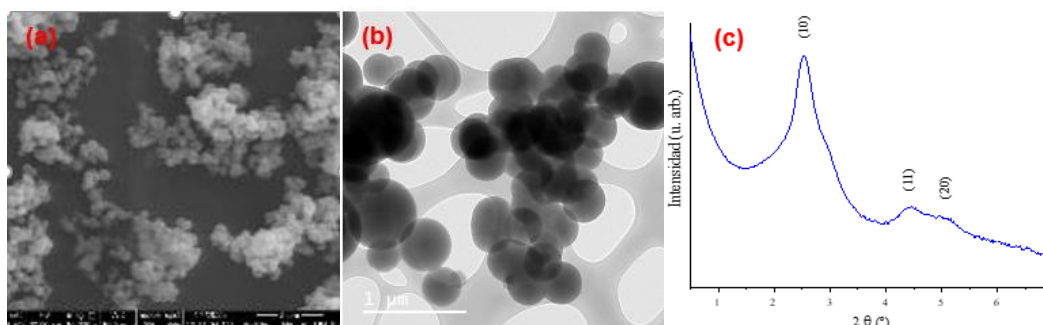


Figura 1. Imagen (a) SEM, (b) TEM y (c) difracción de rayos X de bajo ángulo de la MCM-41.

Caracterización morfológica, química y estructural de las microcápsulas. Las imágenes SEM de las microcápsulas se muestran en las Figs. 2a-c. En las microcápsulas PCL-MCM-M y PCL-MCM-T (Figs. 2b y 2c) se observan protuberancias atribuidas a la sílice MCM-41. Para investigar más a fondo la arquitectura interna y la distribución espacial de MCM-41, se realizó una microscopía electrónica de barrido con haz de iones focalizado (FIB-SEM) de sección transversal (Fig. 2c). El

mapa elemental Si-K se muestra en las Fig. 2d. Estos resultados revelan que las partículas de MCM-41 no se encuentran simplemente adsorbidas en la superficie o aglomeradas, sino que se distribuyen por todo el volumen de la matriz de PCL.

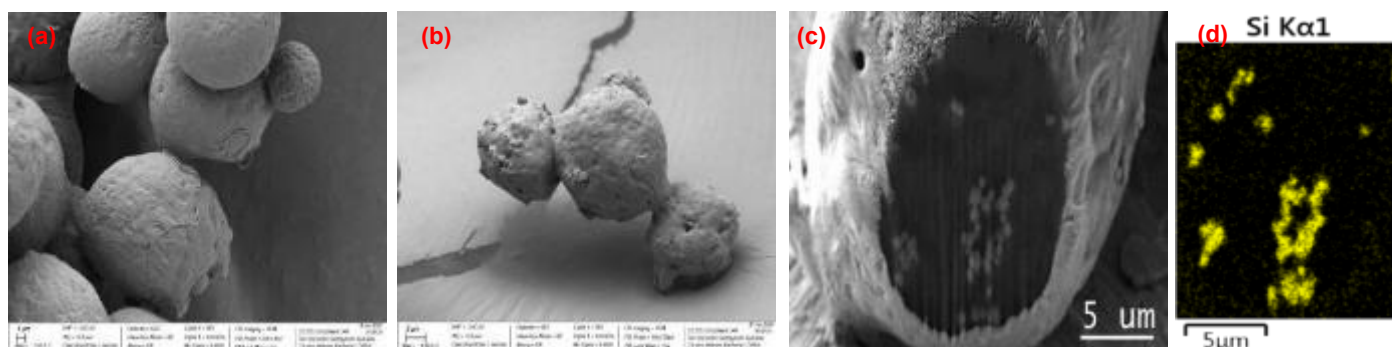


Figura 2. Imágenes SEM de las microcápsulas preparadas: (a) PCL-Mentol, (b) PCL-MCM-Mentol, (c) sección transversal de PCL-MCM-Timol, (d) mapa elemental de Si en la región seccionada en (c).

Las características y evolución morfológica a través del tiempo de las microcápsulas se evaluaron mediante microscopía óptica (Fig. 3). Las cápsulas recién preparadas (Fig. 3 panel superior) mostraron una morfología predominantemente esférica, con diámetros entre 2 y 10 μm para las microcápsulas PCL-M, y entre 5 y 20 μm para los sistemas PCL-T, mientras que las microcápsulas que contenían MCM-41 oscilaban entre 10 y 20 μm con una distribución de tamaño estrecha. La Fig. 3 (panel inferior) muestra las imágenes de las microcápsulas envejecidas durante 30 días. Se observó que las microcápsulas de PCL-M conservaron en gran medida su morfología, mientras que las de PCL-T sufrieron una degradación estructural significativa, pareciendo miscibilizarse con la PCL y formar una mezcla en lugar de estructuras encapsuladas discretas. Por el contrario, los sistemas multicapa conservaron su forma esférica sin alteraciones perceptibles. Esta observación sugiere que la incorporación de MCM-41 tuvo un efecto estabilizador en los sistemas.

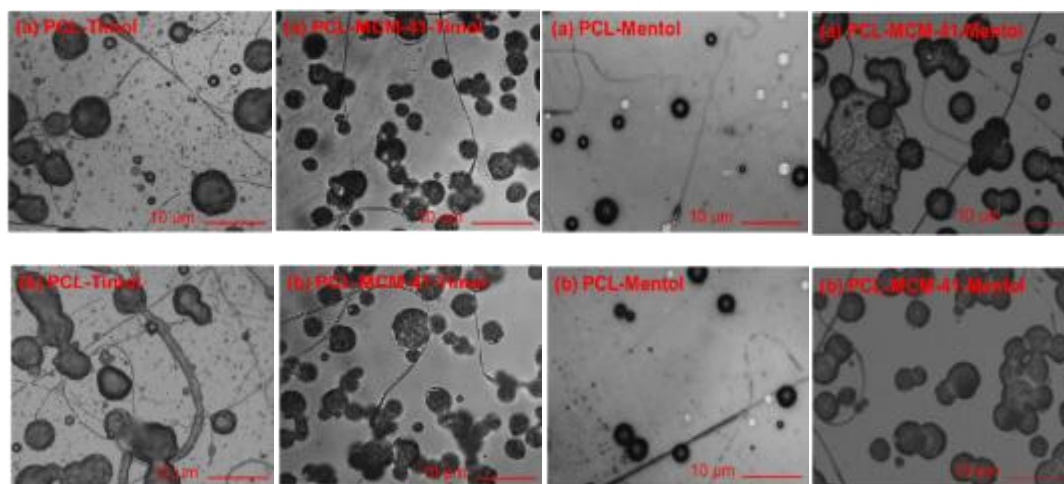


Figura 3. Imágenes de microscopía óptica de las microcápsulas recién preparadas (panel superior) y luego de 30 días (panel inferior).

La Fig. 4 presenta los espectros FT-IR que muestran la evolución temporal de las microcápsulas PCL-M y PCL-T, PCL-MCM-M y PCL-MCM-T. Después de 30 días de envejecimiento, sólo las las microcápsulas PCL-T exhibieron la aparición de dos hombros alrededor de la banda de la banda de estiramiento carbonilo característica de la PCL a 1720 cm⁻¹ (Fig. 4b, recuadro). La evolución de esta banda indica el aumento en la fracción amorfa de PCL. Además, se observan nuevas bandas de absorción en la región 1620-1585 cm⁻¹, correspondientes a vibraciones de estiramiento C=C de timol y grupos bencenoides aromáticos (Fig. 4b). La observación de estas bandas indicaría la segregación de timol. La banda a 3420 cm⁻¹ se atribuye a los grupos hidroxilo del timol unidos mediante enlaces de hidrógeno con los grupos carbonilo del PCL (–C=O···H–O–) (Sanchez Rexach, 2016). Estos cambios en el espectro de FTIR evidencian fuertes interacciones de enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo del timol y los grupos carbonilo del PCL, lo que indica miscibilidad entre los

componentes. También indican un efecto plastificante de la matriz de PCL, que podría incrementar la movilidad de las cadenas del polímero justificando la deformación observada mediante microscopía óptica. Estas interacciones intermoleculares impulsarían la deformación progresiva y la ruptura estructural de las microcápsulas, en concordancia con los cambios morfológicos detectados. Por el contrario, los espectros FT-IR de todas las otras microcápsulas envejecidas permanecieron inalterados.

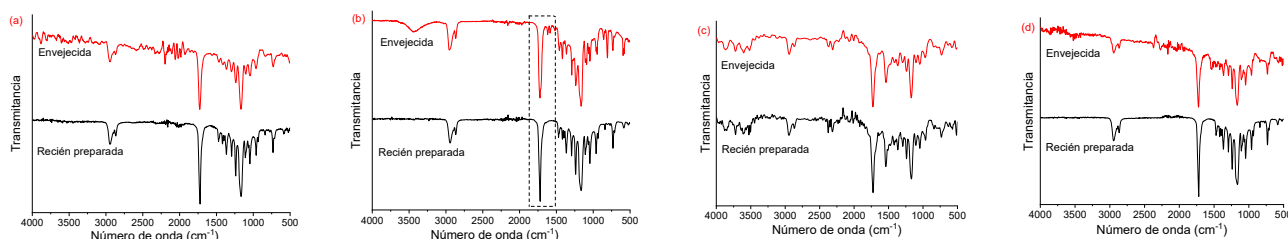


Figura 4. Espectros FTIR de microcápsulas recién preparadas y después de 30 días de fabricación. (a) PCL-Mentol, (b) PCL-Timol, (c) PCL-MCM-41-Mentol, (d) PCL-MCM-41-Timol.

Las pruebas microbiológicas de las microcápsulas híbridas de PCL-MCM-terpeno frente a *P. aeruginosa* comprobó su capacidad como biocida de largo plazo. Durante las primeras 72 h de incubación (Fig. 5a), el monitoreo de la densidad óptica (OD₆₀₀) indicó que las microcápsulas híbridas (PCL-MCM-terpenos) no ejercieron un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento bacteriano mostrando un comportamiento similar a las matrices en blanco (PCL y MCM). En lugar de una limitación, esta etapa de latencia a corto plazo confirma que la capa externa de PCL aísla eficazmente la carga útil activa del medio de cultivo, suprimiendo la difusión prematura de los terpenos y el efecto característico de liberación rápida. Por el contrario, la capacidad biocida de la arquitectura multicapa se reveló después del protocolo de envejecimiento de las microcápsulas en DMSO (Fig. 5b). Luego de un tiempo en inmersión, el hinchamiento de la capa externa de PCL permitió que los terpenos confinados difundieran hacia el exterior de las microcápsulas mostrando un efecto biocida.

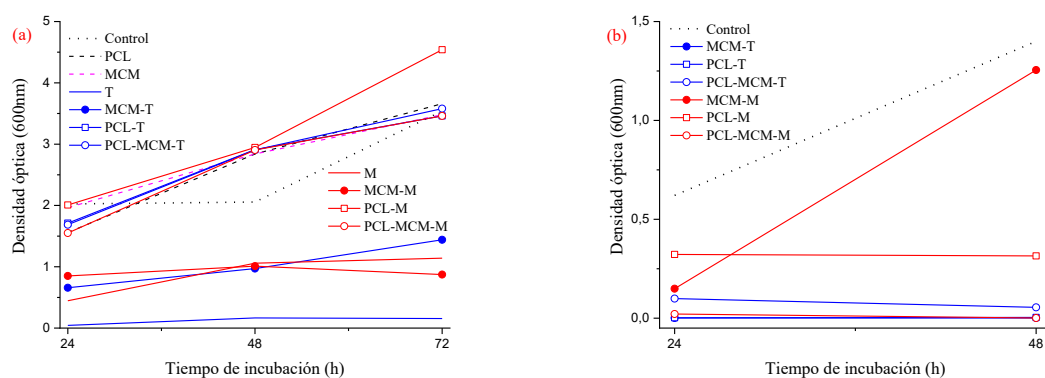


Figura 5. Evolución temporal de la densidad óptica del cultivo de *P. aeruginosa* para ensayos a corto (a) y largo plazo (b).

Conclusiones

Los resultados confirman que la incorporación de la MCM-41 en las microcápsulas permite conservar la integridad morfológica, química y estructural evitando principalmente las interacciones deletéreas entre la PCL y los terpenos. Adicionalmente, las pruebas microbiológicas confirman que este tipo de arquitectura proporciona una plataforma eficaz para su uso como biocida a largo plazo, ya que mantienen una reserva activa para la protección prolongada como la que se requiere por ejemplo en la industria de los recubrimientos, cosmética, productos farmacéuticos y agrícolas.

Referencias

Arzani, F. A. (2022). Biocides and techniques for their encapsulation: a review. *Soft Matter*, 18(27), 5340–5358. <https://doi.org/10.1039/D1SM01114F>

- Gómez de Saravia, S. G. (2018). Compuestos naturales como potenciales alguicidas para pinturas a base de agua. *Journal of Coatings Technology and Research*, 15(5), 1191–1200. <https://doi.org/10.1007/s11998-018-0099-7>
- Grün, M. (1999). Nuevas vías para la preparación de materiales MCM-41 mesoporosos: control de la porosidad y la morfología. *Microporous and Mesoporous Materials*, 27(2-3), 207–216. [https://doi.org/10.1016/S13871811\(98\)00255-8](https://doi.org/10.1016/S13871811(98)00255-8).
- Machado, G. E. (2019). Mejora de la actividad biocida de formulaciones de recubrimientos para exteriores mediante el uso de nanopartículas de plata soportadas en zeolita. *Materials Science and Engineering: C*, 98, 789–799. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.040>
- Mardones, L. E. (2018). Biocida de larga duración a base de isotiazolinona para formulaciones de pintura. *Progress in Organic Coatings*, 119, 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2018.02.023>
- Pardini, F. M. (2023). Microencapsulación de aceites esenciales mediante electrospray simple y coaxial en poli ϵ -caprolactona microcápsulas: caracterización y comportamiento de liberación de aceite. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 73(10), 875–884. <https://doi.org/10.1080/00914037.2023.2222332>
- Pereyra, A. M. (2015). Mejora de la resistencia a la biocorrosión del recubrimiento epoxi mediante la adición de una zeolita intercambiada con Ag/Zn. *Surface and Coatings Technology*, 284, 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2015.02.044>
- Sanchez Rexach, E. (2016). Antimicrobial poly(ϵ -caprolactone)/thymol blends: Phase behavior, interactions and drug release kinetics. *European Polymer Journal*, 83, 288–299. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.08.029>
- Trombetta, D. (2025). Mecanismos de acción antibacteriana de tres monoterpenos. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 2474–2478.
- Wang, C. (2024). Biocide-encapsulated core-shell polymer microspheres: A novel approach for preparing long-lasting antimicrobial coatings. *Progress in Organic Coatings*, 196, Artículo 108722. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2024.108722>