



Microencapsulation par polymérisation interfaciale

Fabienne Piegay

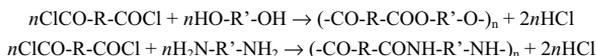
*E.I.3 Option MiDiFAB, Sujet bibliographique proposé par le Dr Isabelle Hénaout
Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, Av. Général Leclerc, 35700 Rennes*

Soumis le 27.1.2004 ; accepté le 16.2.2004

Résumé : La microencapsulation est présente dans tous les domaines, allant de l'agrochimie à la pharmacie en passant par la cosmétique. Différentes méthodes ont donc été mises en œuvre pour la fabrication des microcapsules, cet article présentant la technique de polymérisation interfaciale. Celle-ci dépend de l'émulsion à former préalablement, huile dans eau (O/W) ou eau dans huile (W/O), de la taille des gouttes, des tensioactifs utilisés, de la vitesse d'agitation, de la température... La morphologie et le comportement de la microcapsule sont influencés par les caractéristiques du polymère, le solvant organique, la vitesse de diffusion du monomère hydrophile et donc son coefficient de partage entre les phases organique et aqueuse... La taille, la perméabilité, la porosité de la microcapsule vont alors varier suivant la préparation.

Introduction

La polymérisation interfaciale est une réaction depuis longtemps connue et qui a été particulièrement étudiée par Morgan et Kwolec en 1959 [1]. C'est une méthode permettant d'obtenir des polymères classiques à température relativement faible, typiquement entre 0 et 50°C, car elle utilise des composés très réactifs tels que les chlorures d'acide. Ainsi on peut former des polyesters ou des polyamides, en utilisant du dichlorure d'acide, par les réactions suivantes :



La polycondensation des deux réactifs s'effectue à l'interface des deux liquides non miscibles, chacun contenant l'un des deux monomères réactifs. Les réactifs diffusent à l'interface où la réaction se déroule. Le polymère ainsi obtenu précipite et est récupéré sous la forme d'un film ou d'un filament continu s'il possède une résistance mécanique suffisante. Dans le cas contraire, il ne pourra pas être retiré de la sorte mais il va alors gêner la diffusion de réactifs vers le site réactionnel. La vitesse de polycondensation va donc décroître avec le temps, contrôlée en général par les vitesses de diffusion des réactifs les moins véloces.

Du point de vue du mécanisme, les molécules de monomères ne peuvent réagir qu'avec les extrémités des chaînes polymériques. On facilite donc l'obtention de polymères de fortes masses molaires. Mais il est important de noter que le solvant organique doit être un « mauvais » solvant pour le polymère de haute masse moléculaire. En effet, le solvant ne doit pas faire précipiter des fractions de polymère de faible masse molaire [1,8]. Cela est possible car les petits polymères sont stabilisés par

un gain entropique en bon solvant ce qui n'est pas le cas des polymères de plus fortes masses molaires (cours "Polymères en solution" en option MiDiFAB, ENSC-Rennes).

Aujourd'hui cette technique de polymérisation interfaciale a été étendue à de nombreuses polycondensations telles que celles des polyuréthanes, des polyurées... [1] et est employée dans le cadre de la microencapsulation. Le but de cet article est de démontrer son efficacité ainsi que d'observer les paramètres influençant les caractéristiques de la capsule formée.

La microencapsulation

Les microcapsules (ou réservoirs creux) avec des membranes semi-perméables ont été développées en 1960. Préparées par polymérisation interfaciale, elles sont largement utilisées pour encapsuler des cellules, des enzymes, des pesticides [3,4], des parfums [5,6]... Ainsi cette technique touche des domaines divers et variés [11,12]. Mais pour pouvoir employer cette méthode dans la libération de médicaments, les conditions de mise en œuvre doivent être très précises et drastiques.

Pour cela, une microcapsule se prépare à partir d'une goutte, c'est-à-dire d'une émulsion. C'est à l'interface de cette goutte qui contient le principe à encapsuler que la polymérisation se déroule [2]. On peut utiliser une émulsion directe ou indirecte, mais elle doit impérativement être stable. Différents paramètres doivent alors être pris en compte tels que la technique d'émulsification, les choix des tensioactifs et du solvant de la phase organique.

Emulsification par mélangeur statique

Cette technique a été utilisée afin d'obtenir un produit à double effet, en encapsulant un pesticide mis en suspension dans une solution désinfectante [4]. Pour cela, K. Hirech *et al.* font une dispersion liquide-liquide (O/W) dans un mélangeur statique. La phase aqueuse est une solution de polyvinyl alcool (PVA) et la phase organique contient le pesticide et le monomère hydrophobe, un diisocyanate. L'émulsion est ensuite placée dans un réacteur agité et le monomère hydrophile, une diamine, est ajouté dans une solution contenant du PVA. Après la polymérisation de 6h environ, le milieu est neutralisé par ajout de HCl. Les capsules de polyurée sont récupérées, lavées puis mises dans la solution désinfectante.

Dans ce cas, la taille des microcapsules ne devait pas dépasser 40 μm afin d'obtenir une dispersion stable. La distribution de taille doit donc être assez fine pour ne pas avoir de trop grosses capsules car lorsque le diamètre d'une capsule est multiplié par 10, sa vitesse de chute dans la solution est multipliée par 100. K. Hirech *et al.* ont donc fait varier le flux des phases dans le mélangeur statique. Cela fait ainsi varier le nombre de Reynolds, R_e , qui caractérise la turbulence des fluides. Leurs résultats montrent alors que lorsque R_e augmente, i.e., quand le flux des deux phases augmente, le diamètre des particules diminue. On passe de $R_e = 440$ à $R_e = 730$, avec pour conséquence des diamètres moyens passant de 36 μm à 11 μm . C'est ce qu'on retrouve dans les travaux de S.-J. Park *et al.* [5] puisque le fait d'augmenter la vitesse d'agitation lors de l'émulsification ($R_e \uparrow$) provoque une diminution de la taille des capsules et donc une augmentation de leur nombre. Cependant, S.-J. Park *et al.* utilisent une simple agitation pour créer leur émulsion mais font varier la nature de leur tensioactif pour homogénéiser la taille des microcapsules. Ils prouvent alors que le SDS aboutit à une distribution de taille plus fine que le Span 80. Cela paraît logique car les gouttelettes chargées négativement dans le cas du SDS ont moins tendance à coalescer puisqu'il existe des répulsions électrostatiques [5].

Emulsification par la technique SPG

La taille des microcapsules est généralement fixée par l'emploi que l'on veut en faire. Ainsi, lorsque le but est de délivrer des médicaments dans le corps humain, il est impératif que la taille des microcapsules soit uniforme (entre 4 et 10 μm), d'une part parce que les interactions avec les cellules biologiques sont très affectées par la taille et d'autre part car la cinétique de relargage est plus simple à suivre [11,12]. Ainsi, depuis les années 90, une nouvelle méthode d'émulsification a été mise en œuvre : " Shirasu-porous-glass (SPG)-membrane emulsification ".

Il est possible avec cette méthode de faire une émulsion directe ou inverse. Cependant, la membrane de la microcapsule se formant du côté de la phase organique par diffusion du monomère hydrophile dans la phase organique, il est préférable de faire une émulsion O/W afin de mieux contrôler la taille de la microcapsule. Le montage utilisé est donné en figure 1 [11,12]. Brièvement, la phase organique, contenant le monomère hydrophobe (terephthaloyl dichloride TDC), est placée dans un réservoir sous pression suffisante pour qu'elle puisse traverser la membrane dont les pores peuvent varier de 0,2 à 11,5 μm . La phase dispersée est donc poussée dans le récipient agité et thermostaté contenant la phase aqueuse *ainsi* que les tensioactifs et le stabilisant.

L-Y Chu *et al.* [11,12] ont travaillé avec des solvants organiques tels que le benzène et le xylène, ainsi que des tensioactifs tels que le SDS, le Tween 80 et le polyoxyéthylène(10) octylphényl ether (POE(10)). Ils ont fabriqué l'émulsion à 10°C afin de ne pas dépasser la température d'inversion de phase (cours formulation en tronc commun, 2^e année, ENSC-Rennes) des émulsifiants non ioniques, située à 21°C dans le benzène et 46°C dans le xylène.

Ensuite, l'émulsion est placée dans un réacteur agité puis une solution tampon de carbonate de sodium contenant le monomère hydrophile (ethylene diamine EDA) est ajoutée. Le tampon va

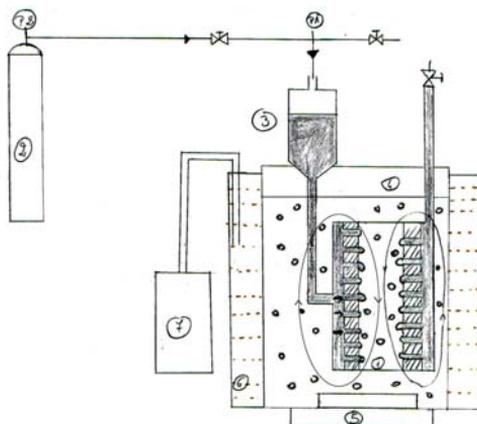


Figure 1 : Schéma du processus d'émulsification SPG-membrane inspiré de la figure 1 de [10] : (1) membrane SPG ; (2) azote sous pression ; (3) réservoir de la phase dispersée ; (4) réservoir de la phase continue et de l'émulsion ; (5) agitateur magnétique ; (6) bain d'eau thermostaté ; (7) thermostat.

neutraliser l'acide chlorhydrique qui se forme lors de la polymérisation. La réaction dure 10 minutes et peut être suivie par contrôle du pH. Lorsqu'il ne varie plus, la réaction est terminée [9]. Enfin, les capsules sont isolées par décantation et lavées à l'eau.

Différents paramètres tels que la nature de la phase dispersée ou des tensioactifs et la taille des pores de la membrane SPG, sont étudiés afin d'obtenir la meilleure distribution de taille et la meilleure stabilité possibles. Les résultats sont reportés dans le tableau 1. La plus faible polydispersité est obtenue pour la phase organique contenant de la paraffine liquide. En effet, cette dernière ayant une très forte viscosité, elle forme des gouttes plus uniformes à la sortie de la membrane SPG. De plus, sa diffusion étant plus lente et sa solubilité réduite dans la phase aqueuse, l'émulsion est plus stable. Or plus le solvant organique est soluble dans l'eau, plus la membrane de la microcapsule obtenue est poreuse. Ainsi, il est possible d'éliminer facilement le solvant restant par évaporation en le mettant sous faible pression. Le but étant ici de préparer une microcapsule sensible à son environnement en greffant un polymère fonctionnalisé dans les pores de la membrane, il est essentiel d'avoir une capsule poreuse. Donc si on utilise de la paraffine, quasiment insoluble dans l'eau, la capsule sera peu poreuse. Un mélange benzène/xylène paraît mieux adapté car il est plus soluble dans la phase aqueuse et il permet de conserver une émulsion monodisperse.

Quant aux stabilisant et émulsifiant, le polyvinyl alcool possède des chaînes polymériques qui vont d'une part stabiliser stériquement l'émulsion et d'autre part augmenter la viscosité de la phase aqueuse donc rendre plus difficile la diffusion des gouttelettes. Enfin, le tensioactif le plus adapté est le SDS. En effet, bien que la HLBr de la phase organique se situe vers 14 et que le SDS, tensioactif

Table 1 : paramètres influençant la polydispersité des microcapsules [11,12]

Nature de la phase organique	Nature de l'émulsifiant et stabilisant	Coefficient de dispersion de taille - taille des pores (μm)/pression transmembranaire (kPa)			
		11,1/4	2,5/20	1,2/40	0,6/80
Kérosène	SDS 0,5%wt	0,30	0,30	0,30	0,30
Benzène/xylène/paraffine liquide (1:1:2 v/v/v)	SDS 0,5%wt	0,32	0,32	0,32	*
Benzène/xylène (2:1 v/v)	SDS 0,5% wt PVA 0,5% wt	0,39	0,39	0,39 (60 min)	*
Benzène/xylène (2:1 v/v)	SDS 0,5% wt PVA 1% wt	0,39	0,39	0,39 (35 min)	-
Benzène/xylène (2:1 v/v)	SDS 1% wt	0,39	0,39 (15 min)	-	-
Benzène/xylène (2:1 v/v)	SDS 1% wt PVA 0,5% wt	0,39	0,39 (30 min)	*	*
Benzène/xylène (2:1 v/v)	Tween 80 0,5% wt	-	+	-	-

* pas d'émulsion ; - expérience non effectuée ; + émulsion polydisperse ; $d < 0,4$: monodisperse où $d = (D_{90}-D_{10})/D_{50}$, avec D_n représentant le pourcentage cumulé des particules ayant un diamètre allant jusqu'à D_n et n est le pourcentage.

anionique, possède une HBL de 40, c'est lui qui est le meilleur émulsifiant. Cela est probablement dû au fait que la membrane SPG possède des groupes silanols [11,12]. Le SDS va donc s'adsorber moins fortement sur la membrane que des tensioactifs tels que le Tween 80 ou un tensioactif polyéthoxylé.

Enfin, en ce qui concerne d'autres paramètres tels que la taille des pores de la membrane SPG, elle ne doit pas être inférieure à 1 µm car dans ce cas, il n'y a pas d'émulsion mais une forme solide de TDC qui se crée à la sortie des pores. Cela vient du fait que le mélange benzène/xylène est assez soluble dans la phase aqueuse. Il est solubilisé et il ne reste alors plus suffisamment de solvant pour solubiliser le monomère hydrophobe qui va donc précipiter. On constate également que le diamètre des gouttelettes diminue quand le temps d'émulsification augmente. Cela est dû au fait que la phase organique est un peu soluble dans la phase continue. Elle peut donc diffuser et s'évaporer. Toutes les gouttelettes ne se comportant pas de façon identique, l'émulsion devient polydispense. Il faut alors limiter le temps d'émulsification au minimum. Enfin, si on utilise une solution tampon contenant du NaOH et le monomère hydrophile, il se forme un complexe entre le PVA et NaOH. Le « stabilisant » va alors ponter les gouttes entre elles et après polymérisation, les capsules sont reliées par des ponts polymériques [12].

Morphologie et comportement de la microcapsule

Avant d'observer le comportement des microcapsules, il faut d'abord en vérifier le contenu. Pour cela, on utilise la thermogravimétrie et un spectre FT-IR. Par IR en effet, on peut observer que la réaction a bien eu lieu puisqu'on détecte l'apparition d'une liaison qui n'existait pas avant la polymérisation en présence du principe à encapsuler [5,6]. De plus, la thermogravimétrie permet de mesurer le taux d'encapsulation : basée sur la différence des points d'ébullition des composés, la variation de masse est suivie lors de l'augmentation progressive de la température [4,5]. Ainsi le taux d'encapsulation peut varier de 15 à 73%.

Paramètres influençant la morphologie des microcapsules

Nous avons vu précédemment que la taille des microcapsules est influencée par plusieurs facteurs lors de la fabrication de l'émulsion. Elle peut tout de même varier pendant la polymérisation. En effet, les capsules de polyuréthane, très employées pour leurs qualités de résistance et de biocompatibilité, voient leur diamètre changer lorsque la masse molaire du monomère hydrophile (ici un polyol tel qu'un PEG) varie [6]. D'après les résultats de K. Hong *et al.* [6], il apparaît que le diamètre des microcapsules diminue lorsque la masse molaire du PEG diminue. Cela s'explique par le fait que les plus petits PEG réagissent plus vite avec les monomères hydrophobes car ils ont plus d'extrémités réactives par unité de masse. De plus, la surface réactive par rapport à la surface totale du PEG est plus importante pour les grands PEG que pour les petits. Il y aura moins d'espace utilisé par des groupements non réactifs avec les petits PEG et les capsules seront donc plus petites.

De plus, la masse molaire du monomère hydrophile joue aussi un rôle sur la perméabilité, la porosité et l'épaisseur de la paroi de la microcapsule. En effet, K. Hong *et al.* [6] ont observé que les PEG de faible masse molaire produisent des microcapsules dont les parois sont poreuses et perméables alors que des PEG de plus grande masse molaire donnent des capsules dont les parois sont plus lisses, moins perméables et plus épaisses. Leur interprétation est que tous les groupes réactifs des PEG les

plus gros ne réagissent pas totalement. Il va donc rester des branches de polymère hydrophiles dans les pores qui vont servir de barrière aux endroits où la membrane de la capsule est fine.

Les facteurs influençant la densité et l'épaisseur des parois ont été particulièrement étudiés par Shulkin *et al.* [8]. En effet, ils forment des microcapsules à partir de polyamines (monomère hydrophile) et d'un copolymère de styrène-anhydride maléique (partie hydrophobe). La réaction donne un acide carboxylique qui va réagir avec l'amine pour donner un sel. La membrane polymérique sera donc un sel réticulé. Or, nous avons vu que pour former une membrane par polymérisation interfaciale, le solvant organique doit favoriser la précipitation du polymère au début de la réaction [1,8]. Mais il doit aussi permettre la diffusion continue du monomère soluble dans l'eau à travers la membrane polymérique existante vers la phase organique. Cette diffusion dépend de la perméabilité de la membrane. Des mélanges de bon et mauvais solvants sont typiquement utilisés [8], le choix du solvant organique devant être un facteur modifiant les propriétés de la paroi des capsules, tout comme la diffusion du monomère hydrophile et les différents types de monomères.

D'une part, le copolymère précurseur est relativement hydrophile donc il est soluble dans un solvant assez polaire comme l'acétate d'éthyle. Le mauvais solvant utilisé est alors l'acétate de dodécyle. Lorsque la polymérisation s'effectue avec pour phase organique le bon solvant, la capsule obtenue est très poreuse et sa paroi est difficile à définir. On obtient une sorte de matrice qui a beaucoup de parois (figure 2). Lorsqu'on augmente la proportion de mauvais solvant jusqu'à 60% en volume, on obtient une capsule à la paroi fine et dense (figure 3). On ne peut pas augmenter la teneur en mauvais solvant au delà de ces 60% sans entraîner la précipitation du copolymère. En ajoutant de l'acétate de dodécyle, on s'approche des conditions θ (cours polymères colloïdaux en 2^e année et cours polymères en solution de l'option MiDiFAB en 3^e année, ENSC-Rennes). La séparation de phase avec le sel polymérique en formation s'effectue alors rapidement et le fait diffuser à l'interface puis précipiter, avant qu'une réticulation significative puisse avoir lieu, capable de piéger des monomères. En effet, le polymère formé précipite car les interactions polymère-polymère sont plus favorables à l'interface que les interactions polymère-solvant aqueux.

Quant à la diffusion de la polyamine dans la phase organique, elle est due à la perméabilité de la membrane mais aussi au coefficient de partage de l'amine entre les deux phases. En effet, une amine pouvant aller facilement dans le noyau organique implique une forte possibilité de réticulation à l'intérieur de la goutte. Cela va donc ralentir la migration du sel polymérique ainsi que sa précipitation



Figure 2 : schéma inspiré de la figure 1.c de la référence [8] : matrice obtenue avec le mélange 60/40 (v/v) d'acétate d'éthyle et d'acétate de dodécyle.



Figure 3 : schéma inspiré de la figure 1.e de la référence [8] : capsule obtenue avec le mélange 40/60 (v/v) d'acétate d'éthyle et d'acétate de dodécyle.

pour aboutir à des matrices poreuses dont les parois sont gonflées de solvant. Il est donc nécessaire d'avoir le plus petit coefficient de diffusion pour l'amine. Or même en changeant d'amine et en utilisant des amines très hydrophiles le coefficient de partage est encore trop important. Une autre possibilité pourrait alors être de changer la vitesse d'ajout de l'amine. En effet, si on ajoute l'amine en 30 secondes, on obtient une matrice (figure 2) alors que si l'ajout de l'amine s'effectue en 3 heures, on obtient une capsule ayant une paroi fine et dense (figure 3). Si l'on veut une paroi plus épaisse, il suffira d'augmenter la concentration en monomères [8,11].

Enfin, le type de copolymère influence la morphologie de la microcapsule. En effet, Shulkin *et al.* ont utilisé deux copolymères différents, l'un de masse molaire 4000g/mol et possédant 50% en masse d'anhydride maléique (SMA50) et l'autre de masse molaire 1700g/mol à 32% en masse d'anhydride maléique (SMA32). Malgré le fait que le SMA50 soit plus hydrophobe, il contient plus de groupes anhydride pouvant réagir avec la diamine pour produire le polyélectrolyte. Or la présence d'une forte concentration de charges facilite la séparation de phase du polymère et donc sa diffusion vers l'interface. Les parois sont donc moins poreuses avec le SMA50.

Paramètres influençant le comportement des microcapsules

Lorsqu'on parle de comportement des microcapsules, on pense surtout au relargage du principe actif qu'elles contiennent, largement influencé par leur morphologie. En effet, concernant les travaux de Shulkin *et al.* [8], les matrices (figure 2) sont tellement réticulées qu'elles vont relarguer le principe actif moins rapidement que les capsules ayant des parois fines et denses. De même, les microcapsules préparées à partir de SMA32 relarguent leur contenu plus vite que celles préparées avec le SMA50. Cela est dû au fait que les copolymères SMA32 provoquent une plus faible réticulation de la paroi. Cette dernière est donc plus poreuse. Enfin, nous avons vu que lorsque l'amine était ajoutée lentement, les parois obtenues étaient fines et denses. Or les microcapsules qui ont été préparées par la méthode d'ajout rapide de l'amine et qui ont donc des parois plus poreuses et plus épaisses, relarguent leur contenu moins vite. Cela s'explique par le fait que les capsules sont laissées à l'air libre et sont donc exposées à l'humidité. Les pores de la membrane hydrophile vont donc absorber l'eau et empêcher la libération du produit organique [8].

De plus, d'autres études ont montré que le degré de cristallinité du polymère formant la membrane de la microcapsule de polyuréthane influence le relargage de son contenu [9]. Pour cela, deux facteurs ont été étudiés afin de faire varier la cristallinité du polymère final : le ratio de la quantité de monomère hydrophobe sur la quantité de monomère hydrophile et le ratio du volume de la phase organique sur le volume de la phase aqueuse, mais seul le second s'est avéré pertinent. En effet, lorsqu'on augmente le volume de la phase continue (aqueuse) par rapport à celui de la phase organique, sans changer les quantités de monomères (donc la concentration en monomère aqueux est plus faible), la cristallinité du polymère est plus élevée. Or plus le polymère est cristallin, plus le relargage est lent [9]. Cela peut s'expliquer par le fait qu'un polymère cristallin est bien organisé donc tous les pores de la membrane sont de la même taille. Au contraire, un polymère amorphe aura des pores de taille différente, certains étant plus gros que d'autres. En conséquence, le principe contenu dans les capsules peut fuir facilement par ces plus grosses ouvertures.

Enfin, l'avantage d'un relargage progressif mais continu peut être important. En effet, les pesticides sont utilisés dans le cadre d'un effet à long terme. Dans le cas de l'étude de K. Hirsch [4],

les microcapsules de polyuréthane sont pulvérisées sur les végétaux à traiter. Le solvant les recouvrant s'évapore, le principe actif peut alors diffuser à travers les parois de la capsule et couvrir à son tour la surface avec des petites quantités d'insecticide. C'est donc un avantage non négligeable pour les pratiques agricoles actuelles qui ont pour but de diminuer au maximum les quantités de pesticide.

Conclusion

La microencapsulation par polymérisation interfaciale a donc l'avantage de permettre de modifier facilement la morphologie des microcapsules, en jouant sur la nature des solvants, les quantités de monomères et leur vitesse d'ajout. Mais comme c'est le cas pour la microencapsulation par coacervation [2], elle dépend fortement de l'émulsion formée préalablement. On jouera alors essentiellement sur la nature des solvants et sur les tensioactifs. La polymérisation interfaciale permet aussi de faire des microcapsules à usage plus original. En effet, les capsules peuvent être thermosensibles [10] ou avoir la possibilité de gonfler selon leur environnement [7]. Enfin, elles peuvent aussi contenir un solide [3].

L'inconvénient majeur de cette technique est qu'elle génère des sous-produits qu'il faut neutraliser. Ainsi, elle laisse une large voie à la polyaddition interfaciale [6].

Remerciements : Je tiens à remercier le Pr Philippe Méléard, le Dr Tanja Pott ainsi que le Dr Isabelle Hénaut pour leur aide et leurs commentaires.

Références

- [1] Odian G. (1994) in Principles of Polymerization 3rd ed (Polytechnica ed.), pp. 104-107, John Wiley & Sons, Chichester, New York, Paris.
- [2] Argillier J-F., Bhattacharya A., Soto-Portas L., Zydowicz N. (2003) in Comparative encapsulation of paraffinic material by complex coacervation and interfacial polycondensation.
- [3] Scher H. B., Chen L. J. (US6015571 ; 18/01/00) Microcapsules containing suspensions of biologically active compounds.
- [4] Hirech K., Payan S., Carnelle G., Brujes L., Legrand J. (2003) Powder Technology 130, 324-330.
- [5] Park S-J., Shin Y-S., Lee J-R. (2001) Journal of Colloid and Interface Science 241, 502-508.
- [6] Hong K., Park S. (1999) Reactive and Functional Polymers 42, 193-200.
- [7] Yamazaki N., Du Y-Z., Nagai M., Omi S. (2003) Colloid and Surfaces B : Biointerfaces 29, 159-169.
- [8] Shulkin A., Stöver H.D.H. (2002) Journal of Membrane Science 209, 433-444
- [9] Yadav S.K., Khilar K.C., Suresh A.K. (1997) Journal of Membrane Science 125, 213-218.
- [10] Makino K., Fujita Y., Takao K-i., Kobayashi S., Ohshima H. (2001) Colloid and Surfaces B : Biointerfaces 21, 259-263.
- [11] Chu L-Y., Xie R., Zhu J-H., Chen W-M., Yamaguchi T., Nakao S-i. (2003) Journal of Colloid and Interface Science 265, 187-196.
- [12] Chu L-Y., Park S-H., Yamaguchi T., Nakao S-i. (2002) Langmuir 18, 1856-1864.