

UNIVERSIDAD DE CUENCA



**Facultad de Ciencias Químicas
Carrera de Ingeniería Química**

***Síntesis solvotermal de nanopartículas de cobre, su encapsulación en la matriz
quitosano/capsaicina y estudio de liberación***

Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Ingeniera
Química

Autora:

Erika Johanna Viñanzaca Martos

C.I. 0104381926

Director:

Lic. Christian Américo Cruzat Contreras. PhD

C.I. 0107985681

Cuenca - Ecuador

17/Mayo/2019



RESUMEN

En el presente trabajo se reporta la síntesis de nanopartículas de cobre (Cu-NPs) por el método solvotermal y su incorporación en matrices esféricas y fibras de quitosano/capsaicina, con su posterior estudio de liberación. Las Cu-NPs fueron sintetizadas por dos rutas, empleando etilenglicol como solvente y empleando oleilamina a diferentes condiciones de temperatura y tiempo de síntesis, además se caracterizaron por MET, UV-Vis e IRTF y presentaron un tamaño medio de 9 nm y morfología cúbica. En segunda instancia, se extrajo capsaicina del ají rocoto (*Capsicum Pubescens*) empleando el método Soxhlet. El extracto de capsaicina obtenido presentó un porcentaje de extraíbles de 30,64 % y una concentración de capsaicina de 2134 ppm a partir de las semillas del ají rocoto. Como tercera fase, se incorporó las Cu-NPs y la capsaicina en esferas y fibras por gelificación iónica y electrospinning, respectivamente. Las esferas y fibras fueron caracterizados por MEB e IRTF, y se obtuvieron esferas tamaño de 1,25 mm, con estructura porosa y con Cu-NPs incorporadas, así como estructuras fibrosas con aglomerados de Cu-NPs por electrospinning.

Por último, se realizaron ensayos de liberación de capsaicina y Cu-NPs a partir de las esferas y fibras, y se evaluó la cinética de liberación de cada componente. La cantidad liberada de capsaicina y Cu-NPs se cuantificó por UV-Vis empleando curvas de calibración de capsaicina y el método colorimétrico con formación del complejo tetraaminocobre (II) $[(\text{Cu}(\text{NH}_3)_4)]^{2+}$. Finalmente, la cantidad total de capsaicina añadida fue liberada más rápido de las fibras que de las esferas, mientras que las Cu-NPs fueron liberadas de manera más controlada a partir de las fibras. El modelo cinético de liberación al que mejor se ajustaron los perfiles de liberación, tanto de capsaicina y de Cu-NPs, fue el modelo de Korsmeyer y Peppas.

Palabras clave: Nanopartículas de cobre. Síntesis solvotermal. Gelificación iónica. Electrohilado. Cinética de liberación.



ABSTRACT

In the present work, the synthesis of copper nanoparticles (Cu-NPs) by a solvothermal method, and its incorporation in chitosan/capsaicin spheres and with its subsequent release studies, is reported. The Cu-NPs were synthesized by two routes, the first using ethylene glycol as solvent and the second using oleylamine at different conditions of temperature and time of synthesis. The obtained Cu-NPs were characterized by MET, UV-Vis, and IRTF and presented an average size of 9 nm and cubic morphology. In the second instance, capsaicin was extracted from chili pepper (*Capsicum Pubescens*) using the Soxhlet method. The extract of capsaicin obtained was a percentage of extraction of 30.64% and a concentration of capsaicin of 2134 ppm from the seeds of chili. As a third phase, Cu-NPs and capsaicin were incorporated into spheres and fibers by ionic gelation and electrospinning, respectively. Spheres and fibers were characterized by MEB and IRTF, and spheres with a size of 1.25 mm, with a porous structure and with Cu-NPs incorporated were obtained, also fibrous structures with particle agglomerates (Cu-NPs) interconnected by fibers were obtained by electrospinning.

Finally, tests were carried out on the release of capsaicin and Cu-NPs from (spheres and fibers) and the release kinetics of each component was evaluated. The released amount of capsaicin and Cu-NPs was quantified by UV-Vis using capsaicin calibration curves and the colorimetric method with the formation of the tetraamino-copper (II) complex $[(\text{Cu}(\text{NH}_3)_4)]^{2+}$. The total amount of capsaicin added It was released faster from the fibers than from the spheres, while the Cu-NPs were released in a more controlled manner from the fibers. The kinetic model of release to which the release profiles were best adjusted, both capsaicin and Cu-NPs, was the model of Korsmeyer and Peppas.

Keywords: Copper nanoparticles. Solvothermal synthesis. Ionic gelation. Electrospinning. Release kinetic.

**ÍNDICE DE CONTENIDOS**

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	11
OBJETIVOS	13
MARCO TEÓRICO	14
Nanotecnología	14
Síntesis de Nanopartículas	14
Nanopartículas de cobre y síntesis solvotermal	16
Factores clave en la síntesis solvotermal.....	16
Nanocompuestos	18
Quitosano	19
Capsaicina	21
Incorporación de compuestos activos en matrices de quitosano y liberación 22	
Gelificación iónica.....	22
Electrohilado	23
Liberación de compuestos activos a partir de una matriz polimérica	25
MATERIALES Y MÉTODOS	27
Materiales, Reactivos y Equipos	27
Métodos	28
Síntesis solvotermal de Cu-NPs	28
Extracción de capsaicina a partir de ají rocoto (<i>Capsicum Pubescens</i>)	29
Encapsulación de Cu-NPs en esferas capsaicina/quitosano.....	31
Encapsulación de Cu-NPs en nanofibras capsaicina/quitosano.....	33
Ensayos de liberación en vitro	34
Caracterización de nanopartículas y compuestos obtenidos.....	35
ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
Síntesis de Cu-NPs	38
Extracción de capsaicina a partir de ají rocoto (<i>Capsicum Pubescens</i>)	39
Propiedades organolépticas y fisicoquímicas.....	39
Determinación de % de Extraíbles	40
Encapsulación de Cu-NPs en esferas y nanofibras de quitosano/capsaicina ..	41
Determinación de solución de quitosano óptima para esferas	41
Componentes y porcentajes de esferas y nanofibras obtenidas	41
Caracterización de compuestos obtenidos	43
Espectroscopía UV-Vis	43
Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)	46
Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (IRTF).....	48



Microscopía Electrónica de Barrido.....	52
Ensayos de Liberación y modelos matemáticos	57
Curva de calibración de cobre	57
Liberación y modelos cinéticos de capsaicina a partir de esferas y nanofibras	57
Liberación de Cu-NPs a partir de esferas	60
Liberación de Cu-NPs a partir de nanofibras	62
Cinética de liberación de Cu-NPs a partir de nanofibras de quitosano.....	64
CONCLUSIONES	66
RECOMENDACIONES.....	67
BIBLIOGRAFÍA.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del Quitosano (a) y la Quitina (b).....	19
Figura 2. Estructura química de la capsaicina.....	21
Figura 3. Mecanismos de liberación de compuestos activos encapsulados en una matriz	25
Figura 4. Síntesis solvotermal de Nanopartículas de cobre (Cu-NPs).....	29
Figura 5. Diagrama del equipo Soxhlet y extracción de ají rocoto.....	31
Figura 6. Método de gelificación iónica para la formación de esferas de quitosano dopadas con Cu-NPs y/o capsaicina	32
Figura 7. Esquema del equipo de electrohilado.	33
Figura 8. Espectro UV-Vis de síntesis Cu-NPs (a) empleando etilenglicol como solvente. Condiciones: 120 °C y 48 h, (b) empleando oleilamina como solvente. Condiciones: 200 °C y 24 h.....	44
Figura 9. Curva de calibración de capsaicina.....	45
Figura 10. Micrografías MET de Cu-NPs. Síntesis Cu-NPs/Etilenglicol 48 h a 120 °C. (a) Cu-NPs aglomeradas formas largas (b) Cu-NPs distribuidas en la muestra aumento de 100 nm y (c) histograma de dispersión de tamaños de Cu-NPs.....	47
Figura 11. Micrografías MET de Cu-NPs. Síntesis Cu-NPs/Oleilamina 24 h 200 °C. (a) Cu-NPs aglomeradas formas largas (b) Cu-NPs distribuidas en la muestra aumento de 100 nm c) Patrón de difracción de Cu-NPs.	47
Figura 12. Espectro IRTF de Oleilamina (azul) vs espectro IRTF de Cu-NPs (rojo). Síntesis 24 h, 200 °C. Parte inferior se muestra la estructura de la molécula de Oleilamina.....	49
Figura 13. Espectro de infrarrojo de capsaicina P.A.....	50
Figura 14. Espectro de infrarrojo del extracto de ají rocoto obtenido a partir de semillas.	50
Figura 15. Espectro de Infrarrojo de esferas a) Quitosano/capsaicina, b) Quitosano/capsaicina/Cu-NPs-1%, c) Quitosano/capsaicina/Cu-NPs- 2%.....	51
Figura 16. Espectro de Infrarrojo de nanofibras a) Quitosano/capsaicina, b) Quitosano/capsaicina/Cu-NPs-1%, c) Quitosano/capsaicina/Cu-NPs-2%.....	52
Figura 17. Micrografía MEB de esferas quitosano/capsaicina.....	52
Figura 18. Micrografía MEB de esferas quitosano/Cu-NPs (1%).....	53
Figura 19. Micrografía MEB de esferas quitosano/Cu-NPs (2%).....	54
Figura 20. Micrografía MEB de esferas quitosano/capsaicina/Cu-NPs (2%)	54
Figura 21. MEB de nanofibras de matriz doble: quitosano/capsaicina.	55
Figura 22. MEB de nanofibras de quitosano de matriz doble: quitosano/Cu-NPs.....	55



Figura 23. MEB de nanofibras de matriz triple quitosano/capsaicina dopadas con (a) Cu-NPs (1% P/P) y (b) Cu-NPs (2%).....	56
Figura 24. Curva de calibración de complejo de cobre.....	57
Figura 25. Ensayo de liberación capsaicina. Esferas Matriz doble: Quitosano/Capsaicina.....	58
Figura 26. Liberación de capsaicina a partir de nanofibra: quitosano/capsaicina	58
Figura 27. Ajuste de datos de liberación de capsaicina desde esferas al modelo (izquierda) Higuchi y (derecha) Korsmeyer y Peppas	59
Figura 28. Ajuste de datos de liberación de capsaicina desde nanofibras al modelo (izquierda) Higuchi y (derecha) Korsmeyer y Peppas	60
Figura 29. Ensayo de liberación de Cu-NPs. Esferas Matriz doble: Quitosano/Cu-NPs (1 y 2%).	61
Figura 30. Ensayos de liberación de Cu-NPs. Esferas Matriz triple: Quitosano/Capsaicina/ Cu-NPs (1 y 2 %)	62
Figura 31. Liberación de cobre a partir de nanofibra quitosano/Cu-NPs	63
Figura 32. Ensayos de liberación de cobre. Nanofibra: Quitosano/Capsaicina/ Cu-NPs (1 y 2 %)	64
Figura 33. Ajuste de datos de liberación de Cu-NPs desde nanofibras dobles al modelo (izquierda) Higuchi y (derecha) Korsmeyer y Peppas.	65
Figura 34. Inhibición de Fusarium por quitosano/capsaicina	65

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Materiales, reactivos y equipos empleados en síntesis de Cu-NPs, extracción de capsaicina, incorporación de Cu-NPs a matriz Quitosano/capsaicina y ensayos de liberación.	27
Tabla 2. Pruebas realizadas en extracción de ají rocoto	30
Tabla 3. Parámetros empleados en la elaboración de nanofibras de matriz doble y triple.	34
Tabla 4. Condiciones y resultados de síntesis Cu-NPs con etilenglicol y Cu-NPs con oleilamina.	38
Tabla 5. Porcentaje de humedad de fruto entero, pedúnculos y semillas del ají rocoto (Capsicum Pubescens).....	39
Tabla 6. Propiedades organolépticas y fisicoquímicas de los extractos de ají rocoto por método Soxhlet.....	40
Tabla 7. Porcentaje de extraíbles de diferentes extractos de ají rocoto (Capsicum Pubescens).....	40
Tabla 8. Ensayos para determinar solución polimérica óptima para formar esferas....	41
Tabla 9. Peso y pH de esferas de matriz doble y triple.	42
Tabla 10. Nanofibras obtenidas por método de electrohilado.....	42
Tabla 11. Técnicas analíticas empleadas en caracterización de compuestos.....	43
Tabla 12. Cuantificación de capsaicina en diferentes extractos de ají rocoto, antes de ser concentrados.	45
Tabla 13. Capsaicina contenida en extracto de ají rocoto a partir de semillas, luego de concentrar.....	46
Tabla 14. Parámetros cinéticos del ajuste de la liberación de Capsaicina desde esferas y nanofibras a modelos Higuchi y Korsmeyer y Peppas.....	59
Tabla 15. Parámetros cinéticos del ajuste de la liberación de Cu-NPs desde nanofibras a modelos Higuchi y Korsmeyer y Peppas.....	64



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Erika Johanna Viñanzaca Martos, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Síntesis solvotermal de nanopartículas de cobre, su encapsulación en la matriz quitosano/capsaicina y estudio de liberación", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 17 de mayo de 2019

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Erika Johanna Viñanzaca", written over a horizontal line.

Erika Johanna Viñanzaca Martos

C.I: 0104381926



Cláusula de Propiedad Intelectual

Erika Johanna Viñanzaca Martos, autora del trabajo de titulación "Síntesis solvotermal de nanopartículas de cobre, su encapsulación en la matriz quitosano/capsaicina y estudio de liberación", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 17 de mayo de 2019

A handwritten signature in blue ink, reading "Erika Johanna Viñanzaca", written over a horizontal line.

Erika Johanna Viñanzaca Martos

C.I: 0104381926



DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a mis padres, Rocío y Noé, por brindarme su completo apoyo en todos los momentos importantes de mi vida y durante la realización de este proyecto, gracias por todo el cariño y el amor que me han brindado y por nunca soltar mi mano. A mi hermano Patricio, quién pese a no estar presente, siempre se ha preocupado por mi bienestar.

Erika V.



AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera sincera a mi tutor el Dr. Christian Cruzat, quién me dio la oportunidad de realizar tan interesante proyecto otorgándome los recursos necesarios y aportando con sus conocimientos y motivación. Además, a la Dra. María Eulalia Vanegas, por formar parte del mismo como asesora y colaboradora.

A la Ingeniera Dianita Brazales quién me apoyó completamente en cada etapa de este trabajo y supo brindarme sus conocimientos y sobretodo su valiosa amistad. A Daniel Bermejo que también colaboró en la realización del presente trabajo.

Además, de manera especial agradezco a los Doctores Ramón Arrúe y Néstor Novoa, cuerpo docente de la Universidad de Concepción en la Facultad de Ciencias Químicas, quienes colaboraron con los análisis de microscopía respectivos.

Finalmente, a todos mis amigos quienes de una u otra manera formaron parte de este proyecto y mostraron su interés por el avance del mismo, mil gracias a todos.



INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas más críticos que enfrenta la agricultura es la búsqueda de soluciones en la lucha contra los microorganismos patógenos (Choudhary et al., 2017). Los hongos patógenos de plantas causan enfermedades a los cultivos de mayor importancia económica y generan pérdidas cuantitativas y cualitativas en la agricultura (Chhipa, 2017). Además, debido al uso excesivo de fungicidas químicos, han planteado preocupaciones importantes a lo largo de los años, los peligros ambientales para los seres humanos, la flora y la fauna, ya que este uso no controlado de agentes químicos puede provocar el desarrollo de resistencia en hongos fitopatógenos contra los fungicidas tradicionales (Rubina et al., 2017), envenenamiento y deterioro del suelo, acumulación en plantas y cultivos, así como afección a organismos no objetivos y beneficiosos para el suelo y cultivos (Choudhary et al., 2017).

Recientemente, se han realizado esfuerzos para desarrollar métodos de manejo seguros que representen menos peligro para humanos y animales y que se hayan enfocado en superar las deficiencias de los fungicidas sintéticos (Ouda, 2014). Entre las numerosas estrategias, las invenciones asistidas por nanotecnología han generado datos cuantificables (Duhan et al., 2017) contra las enfermedades fúngicas de las plantas, principalmente por las aplicaciones de nanopartículas metálicas (Saharan et al., 2013), debido a su área superficial, la cual entra en contacto con los microorganismos y su elevada relación superficie/volumen mejora la interacción del fúngico frente a los microorganismos patógenos (Ouda, 2014). La síntesis, específicamente de nanopartículas de cobre (Cu-NPs), ha tenido un fuerte interés en comparación con la síntesis de otras nanopartículas, debido a sus propiedades fisicoquímicas que pueden utilizarse en un amplio espectro de aplicaciones a un costo mucho menor que el oro y la plata (Usman, Ibrahim, Shameli, Zainuddin, & Yunus, 2012).

Generalmente, el uso de biopolímeros como estabilizadores para la síntesis de Cu-NPs está ganando impulso a causa de su disponibilidad, biocompatibilidad y baja toxicidad (Usman et al., 2012), mientras que las nanopartículas basadas en quitosano (Ch-NPs) se usan preferiblemente para diversas aplicaciones debido a su biodegradabilidad, alta permeabilidad hacia las membranas biológicas, no toxicidad en el ser humano, rentabilidad y amplia actividad antifúngica (Saharan et al., 2015). De igual manera, uno de los controles que ha adquirido mayor importancia en los últimos años, es aquel que basa su acción en el uso de sustancias de origen natural, estos son los extractos obtenidos de plantas con actividades fúngicas, herbicidas bactericidas e insecticidas. Moreno y colaboradores mencionan entre algunos de los componentes: la capsaicina, la capsicina, el capsidol, los capsianósidos y la capsicodendrina, como compuestos



que además de muchas otras propiedades, han demostrado ser antibacteriales e incluso fúngicos (Moreno-Limón, Salcedo-Martínez, Cárdenas-Ávila, Hernández-Piñero, & Núñez-González, 2012).

La presente investigación pretende utilizar las propiedades de los metales nanoparticulados y sumar a estas, las propiedades del quitosano y la capsaicina, mediante la síntesis de Cu-NPs, cuya eficacia de inhibición de hongos es mejor que otras nanopartículas metálicas, como el Aluminio, Hierro, Manganeso, Níquel, Zinc e incluso partículas de Cobre de mayor tamaño (Viet, Nguyen, Cao, & Hieu, 2016). Luego, se caracterizarán por métodos espectroscópicos como: UV-Vis, IRTF y MEB, que ayudarán a entregar una mayor comprensión de la actividad de estos compuestos. Continuando con la encapsulación de las Cu-NPs en esferas y nanofibras de capsaicina/quitosano, y se evaluará la liberación de los componentes de la matriz para estudiar las capacidades de soporte que entrega el quitosano (Lugo, García, & Ruelas, 2010).

Cabe mencionar que se realizará una continuación de esta investigación, en la cual se evaluará la acción biocida y la inhibición de los compuestos obtenidos frente a distintos microorganismos. Esta investigación será realizada por miembros de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Cuenca como parte de una tesis de continuación. Todo esto, para responder a la preocupación por el daño ambiental causado por los fungicidas sintéticos, ayudando a la conservación del medio ambiente y sus recursos.



OBJETIVOS

Objetivos Generales

Síntetizar Cu-NPs por el método solvotermal y encapsularlas en esferas de capsaicina/quitosano, así como fibras de la misma composición y realizar estudios de liberación de las Cu-NPs a partir de la matriz.

Objetivos específicos

- Sintetizar las Cu-NPs mediante la técnica solvotermal y caracterizarlas por MET, UV-Vis e IRTF.
- Extraer capsaicina a partir del ají rocoto, mediante la técnica de Soxhlet y caracterizarla mediante IRTF y UV-vis.
- Encapsular las Cu-NPs y la capsaicina, en esferas de quitosano y mediante la técnica de electrohilado, y caracterizar la matriz obtenida mediante MEB e IRTF.
- Determinar la capacidad estabilizante de la matriz Cu-NPs/capsaicina/quitosano, tomando en cuenta parámetros como concentración de nanopartículas, a través de ensayos de liberación de las Cu-NPs desde la matriz capsaicina/quitosano, en medio acuoso.



MARCO TEÓRICO

Nanotecnología

La nanotecnología ha sido definida como toda aquella tecnología que se relaciona con nuevos materiales, sistemas y procesos que cambia sus propiedades fisicoquímicas a una escala de 100 nanómetros (nm) o menos, supone la manipulación de materiales y la creación de estructuras y sistemas a escala de átomos y moléculas, esto es, a nano escala (Lugo et al., 2010). La nanotecnología ha sido empleada en varios campos de la ciencia como en la física, química, farmacéutica, ciencia de los materiales, medicina y agricultura (Duhan et al., 2017).

Generalmente, la nanotecnología en aplicaciones agropecuarias desarrolla nanopartículas con el objetivo de brindar un sistema de liberación controlada para agroquímicos, mejorando la solubilidad de los productos o protegiendo los componentes bioactivos de la degradación prematura (Perez & Francois, 2016). Entonces, las nanopartículas pueden incrementar la eficacia de los agroquímicos, ofreciendo mejores resultados con dosis y números de aplicación más bajas, también pueden disminuir el riesgo de contaminación ambiental y así mismo, la toxicidad para humanos y otros organismos no objetivo (Chhipa, 2017) (Choudhary et al., 2017).

Recientemente, se han realizado esfuerzos para desarrollar métodos de manejo seguros que representen menos peligro para los seres humanos y animales y que se hayan enfocado en superar las deficiencias de los fungicidas sintéticos (Ouda, 2014). Entre las numerosas estrategias, las invenciones asistidas por nanotecnología han generado datos cuantificables contra las enfermedades fúngicas de las plantas, principalmente por las aplicaciones de nanopartículas metálicas (Saharan et al., 2013), debido a su área superficial, la cual entra en contacto con los microorganismos y su elevada relación superficie/volumen mejora la interacción del fúngico frente a los microorganismos patógenos (Ouda, 2014). La nanotecnología tiene el potencial de revolucionar la industria agrícola y alimentaria con nuevas herramientas para el desarrollo de tratamiento molecular de enfermedades, la detección rápida de enfermedades, la mejora de la capacidad de las plantas para absorber nutrientes, etc. (Duhan et al., 2017). Sensores inteligentes y sistemas de liberación inteligentes ayudarán a la industria agrícola a combatir virus y otros patógenos de cultivos, incluso se enfocarán en que dichos materiales aumentarán la eficacia de los componentes al utilizar dosis cada vez más bajas (Tiju & Morrison, 2006).

Síntesis de Nanopartículas

La manipulación de las condiciones de síntesis permite el control racional de la morfología de las partículas y provee los medios para adaptar las propiedades de los



materiales durante el proceso de síntesis. Otro aspecto fundamental de la síntesis de nanopartículas es su estabilización, de tal manera que su tamaño y su forma esté acotada y no cambie en función del tiempo (Zanella, 2012).

Los avances en los procesos de síntesis han permitido un control preciso sobre los parámetros estructurales que gobiernan la formación de las nanopartículas lo que ha posibilitado adaptar las propiedades de estos átomos de acuerdo con su uso específico. Una de las principales características de las nanopartículas es su tamaño, esto tiene relación con el área superficial la cual es mayor en las nanopartículas que en los compuestos macroscópicos de la misma composición química. Las nanopartículas al tener mayor área superficial, tienen mayor cantidad de átomos superficiales para interactuar con otros átomos de otro sistema, este fenómeno es de vital importancia en la síntesis de compuestos y además influyen en la velocidad de reacción, aumentando la conversión de los reactantes a productos (A. G. Hernandez, 2010). Es así, que se conoce que diversos sistemas físicos (gases nobles, núcleos y metales como agregados y núcleos, etc.) tienen “números mágicos”, aquellos en donde su estructura es muy compacta, provocando que cada uno de los átomos dentro del agregado atómico tenga un número maximizado de átomos circundantes (Rao, Kulkarni, Thomas, & Edwards, 2000), haciendo que al aumentar dicho número el compuesto se vuelva más estable y reactivo y tenga propiedades físico químicas muy diferentes a las de los tamaños contiguos (Guadalupe, 2007). Por ejemplo, se encontró que tales números en el caso de partículas de oro tenían un efecto a tamaños de 10 nm. En este caso, la densidad de defectos en la superficie de los grupos con números de átomos "mágicos" es mínima, mientras que puede ser bastante significativa para otros (Redel', Gafner, & Gafner, 2015).

Los métodos de síntesis de nanopartículas se agrupan en dos categorías, la síntesis top-down y bottom-up (Cruzat, 2010). La síntesis top-down se basa en la división de sólidos en partes más pequeñas. Dentro de esto tenemos: molienda o desgaste, métodos químicos y la volatilización de un sólido con la consiguiente condensación de los componentes que se han llevado a estado gaseoso. Mientras que, la síntesis bottom-up, se considera la más empleada, esta se basa en sintetizar nanopartículas mediante la condensación de átomos en solución en una fase gaseosa, los métodos químicos son los más empleados dentro de esta síntesis y consiste en la reducción de iones metálicos a átomos metálicos, seguida de su agregación, además existen ventajas como el método químico en donde se obtienen nanopartículas uniformes y pequeñas. (Zanella, 2012). Entre los métodos químicos podemos mencionar:



- Método coloidal
- Reducción fotoquímica y radioquímica
- Irradiación con microondas
- Utilización de dendrímeros
- Síntesis solvotermal
- Método sol-gel.

Nanopartículas de cobre y síntesis solvotermal

La síntesis de nanopartículas metálicas, específicamente de Cu-NPs, ha tenido un fuerte interés en comparación con la síntesis de otras nanopartículas, debido a sus propiedades, las cuales pueden utilizarse en un amplio espectro de aplicaciones a un costo mucho menor que la plata y el oro (Usman et al., 2012). Existen muchos métodos para la síntesis de Cu-NPs como el método hidrotermal, fotorreducción, método empleando polioles como reductores y descomposición térmica.

La descomposición térmica o síntesis solvotermal de precursores metálicos en presencia de surfactantes orgánicos a alta temperatura es un método ampliamente utilizado debido a su facilidad para producir nanopartículas cristalinas con una distribución de tamaño controlado (Betancourt-Galindo et al., 2014). Este método ha avanzado significativamente en las últimas décadas y ahora se encuentra entre los protocolos más confiables y reproducibles logrando un control morfológico bien definido (Lai, Niu, Luque, & Xu, 2015). La síntesis de nanocristales de alta pureza con alta cristalinidad y bajo tamaño de grano son las principales ventajas del proceso solvotermal. Este proceso puede llevarse a cabo para obtener varias geometrías, incluyendo películas delgadas, polvos a granel, monocristales y nanocristales (Michael Rajamathi & Seshadri, 2002). El método consiste en usar un recipiente sellado (reactor, bomba, autoclave, etc.) para colocar los compuestos metálicos y el disolvente, pudiendo llevarlos a temperaturas muy superiores a sus puntos de ebullición y aumentando la presión mediante calentamiento (Tamilvanan, Balamurugan, Ponappa, & Kumar, 2014).

Factores clave en la síntesis solvotermal

Es de vital importancia controlar aspectos como morfología, tamaño de partícula y la forma ya que las propiedades de estos materiales pueden ser estudiados mediante el manejo de estos parámetros (Parveen, Sannakki, Mandke, & Pathan, 2016). Estos aspectos, en la síntesis solvotermal pueden controlarse bien mediante una selección cuidadosa de solventes, precursores metálicos, agentes de recubrimiento, reductores, temperatura, tiempo de reacción, etc. (Lai et al., 2015).

- a) Temperatura de reacción



La temperatura es un factor importante, dado que el solvente empleado cambia sus propiedades a medida que la temperatura aumenta. Por ejemplo, la viscosidad del solvente disminuye a medida que la temperatura de reacción se incrementa, así mismo, la movilidad de los iones disueltos y las moléculas es mayor con el aumento de la temperatura. La constante dieléctrica del solvente es menor a altas temperaturas lo cual favorece la solubilidad de los reactantes, aumenta la velocidad de reducción de los precursores metálicos que son empleados y da como resultado una cantidad elevada de núcleos de crecimiento y una disminución en los tamaños finales de las nanopartículas obtenidas (Lai et al., 2015).

b) Tiempo de reacción

En relación al tiempo de reacción, en la primera etapa de síntesis o nucleación, la concentración de átomos metálicos es mayor a la concentración de saturación, pero ningún núcleo se forma. A medida que se alcanza la concentración de nucleación, se van formando más núcleos y la concentración de átomos del metal disminuye. Como segunda etapa, se presenta el crecimiento de las nanopartículas, al inicio se reportan formas no regulares o definidas, pero a medida que aumenta el tiempo, se logra obtener formas más homogéneas llegando al proceso de maduración de Ostwald en donde las nanopartículas adquieren estructuras y morfologías bien definidas. Es decir, que tiempos prolongados de reacción contribuyen a una obtención de formas más homogéneas y bien distribuidas (Xia, Xiong, Lim, & Skrabalak, 2009).

c) Solvente empleado

Los efectos del solvente dependen de sus propiedades, como, por ejemplo, la viscosidad, la constante dieléctrica y su polaridad. Solventes como la oleilamina (OAm), agua, polioles como el etilenglicol (EG), el dietilen glicol (DEG), el tetraetilen glicol (TEG), la dimetilformida (DMF) y una mezcla de solventes se han empleado en la síntesis solvotermal a razón de su alta compatibilidad con los reactantes (Lai et al., 2015).

Los polioles actúan como solventes y reductores debido a su contenido de grupos hidroxilo (OH) los cuales presentan propiedades reductoras (Xia et al., 2009). Por otro lado, la OAm desempeña varios papeles en la síntesis solvotermal, como ejemplo; surfactante, ligando e incluso como agente reductor suave, teniendo, además un punto de ebullición alto (aproximadamente 350 °C), lo cual permite variar la temperatura de síntesis para obtener diferentes formas de nanopartículas. Este solvente, que contiene un doble enlace (C=C) en la mitad de la cadena molecular, podría llevar a la interacción



del metal que se emplee y/o favorecer la reducción de los precursores metálicos, a causa de este doble enlace (Mourdikoudis & Liz-Marzán, 2013).

Además, se ha estudiado la actividad antimicrobiana de las nanopartículas, mostrando en células microbianas y sus colonias una sensibilidad a las nanopartículas de metales como Zn, Ag, Cu y Mg. El crecimiento de la población bacteriana es inhibido por la interacción específica de estas nanopartículas metálicas con cepas bacterianas. Entre estas nanopartículas metálicas, las nanopartículas de óxido de cobre (I) y (II) y de cobre (Cu-NPs) han adquirido una considerable atención porque el cobre es fácilmente disponible y uno de los metales más utilizados en el mundo de la investigación moderna (Haider, Kwak, Gupta, & Kang, 2015).

Nanocompuestos

Los nanocompuestos se refieren a materiales que están formados de dos o más componentes en donde se denomina matriz al que se presenta en mayor porcentaje o cantidad y carga al de menor porcentaje; a su vez la carga se encuentra dispersa en tamaño nanométrico dentro de la matriz de soporte (Molina Sepúlveda, 2006). De acuerdo a esto, tanto la matriz y carga pueden ser de distinta naturaleza, ya sea metálica, orgánica, polimérica o inorgánica (compuestos de óxidos metálicos). Es así que se puede tener un nanocompuesto matriz/carga: metal-metal, metal-polímero, metal-óxido, polímero-metal, polímero-óxido, entre otras combinaciones (Zanella, 2012).

Los nanocompuestos polímero/metal representan una combinación de las diferentes propiedades de cada componente y pueden formar un material con propiedades ópticas, electrónicas, mecánicas y antimicrobianas mejoradas comparadas a las propiedades por separado (Xia et al., 2009). Además, los recubrimientos poliméricos nanoestructurados son materiales atractivos, ya que son capaces de controlar la liberación de especies metálicas y poseen propiedades bioestáticas que se pueden adaptar fácilmente a distintas aplicaciones como medicina, agricultura, farmacéutica, etc. (Cioffi et al., 2005).

De manera importante, los nanocompuestos con propiedades antibacterianas se pueden obtener incorporando nanopartículas con actividad biocida conocida, o mejorando las propiedades antibacterianas que ya tiene la matriz polimérica. En este último caso, la mejora sustancial de la capacidad biocida se ha asociado con un efecto sinérgico de los dos componentes presentes en el compuesto (Tamayo, Azócar, Kogan, Riveros, & Páez, 2016). Algunos informes han demostrado que el uso potencial de nanopartículas y nanocompuestos metálicos basados en conjunto con compuestos naturales y biodegradables como el quitosano, han mejorado el manejo de

enfermedades de plantas, especialmente contra patógenos fúngicos (Dananjaya et al., 2017). No solamente se incorporan compuestos nanométricos como nanopartículas que tienen efectos bioestáticos, sino que también se emplean compuestos activos como extractos de plantas.

Por esta razón, los nanomateriales de la misma composición, que tienen diferente tamaño y formas pueden tener amplia diferencia de toxicidad. Estas propiedades son las que se aprovechan en la formulación de fertilizantes, productos de crecimiento vegetal y en el diseño de plaguicidas más potentes que respondan a condiciones climáticas o insecto blanco específicos (Lugo et al., 2010). Entre las matrices poliméricas comúnmente empleadas en la preparación de nanocompuestos con carga de nanopartículas metálicas y componentes activos, se encuentran los polímeros naturales como celulosa, quitosano y poliolefinas como el polietileno y polipropileno (Cioffi et al., 2005).

Quitosano

El quitosano es un polisacárido lineal compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente de β -(1-4) D-glucosamina (unidades desacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada) (Figura 1a). Es el producto N-desacetilado de la quitina (Figura 1b), el segundo polímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa y se encuentra como exoesqueleto de crustáceos, cutículas de insectos y paredes celulares de hongos (Piras et al., 2014)

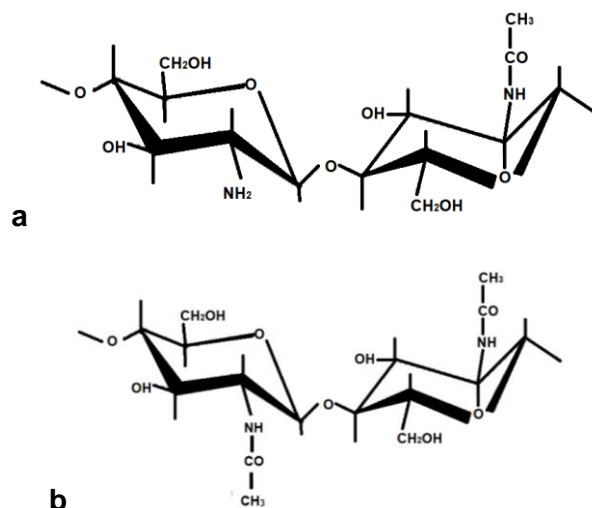


Figura 1. Estructura química del Quitosano (a) y la Quitina (b)

La diferencia entre el quitosano y la quitina es el grupo funcional situado en el carbono 2 de la unidad monomérica. Además, debido a la presencia de grupos amino libres en el quitosano, la solubilidad y reactividad de este polímero son mayores que las de la



quitina. El quitosano tiene algunas propiedades biológicas y químicas importantes: es biodegradable, biocompatible, bioactivo y policatiónico, además de ser económicamente atractivo (Tang, Qian, & Shi, 2007). Por esto, ha sido ampliamente usado en algunos aspectos biomédicos e industriales, incluyendo el tratamiento de aguas residuales, como soporte cromatográfico, en la movilización de enzimas, compuesto bioestático y como soporte para liberación controlada de fármacos (Mi, Kuan, Shyu, Lee, & Chang, 2000) (Alves & Mano, 2008). En algunos hongos, el quitosano puede producir alteraciones en las funciones de la membrana, mediante su fuerte interacción con esta superficie de carga electronegativa, guiando cambios en la permeabilidad, disturbios metabólicos y eventualmente la muerte (Quintero Cerón, Falguera Pascual, & Muñoz Hernández, 2010)

El uso de polímeros en la encapsulación de nanopartículas y su posterior liberación es la técnica más prometedora para la estabilización de partículas. Una matriz semicristalina permite una mejor dispersión del material sintetizado (Cruzat Contreras, Peña, Meléndrez, Díaz-Visurraga, & Cárdenas, 2011)

En un medio de ácido débil, el quitosano reacciona con los iones H^+ para producir quitosano protonado con grupos funcionales $-NH_3^+$. El potencial zeta de las nanopartículas incorporadas en los polímeros aumenta con la concentración de quitosano debido a la mayor disponibilidad de protones $-NH_3^+$ en las superficies de las nanopartículas, lo que aumenta la repulsión electrostática entre las partículas y, por lo tanto, reduce la incidencia de aglomeración, lo que resulta en una dispersión de nanopartículas más estable (Zain, Stapley, & Shama, 2014). Es decir, el quitosano es un polímero con una alta densidad de grupos amino en su estructura, que es una característica importante para soportar y estabilizar nanopartículas (Cruzat Contreras et al., 2011) y compuestos activos de interés.

Por ejemplo, los nanocompuestos a base de cobre y quitosano pueden ser herramientas claves en la prevención y el tratamiento de enfermedades en una gran variedad de plantas. Es así que, los fungicidas a base de cobre son adecuados para la agricultura orgánica y aún se encuentran entre los agentes más efectivos para el control de muchas enfermedades que perjudican a la agricultura (Brunel, El Gueddari, & Moerschbacher, 2013).

Por otro lado, la microencapsulación de extractos de plantas eficaces contra microorganismos proporciona un método prometedor que tiene aplicaciones efectivas en muchos campos, incluyendo farmacia, agricultura y medio ambiente (Xing, Cheng, & Yi, 2006) debido a su actividad como fungicidas, herbicidas, bactericidas e insecticidas.

Es así que se ha empleado quitosano como matriz para estabilizar nanoemulsiones de capsaicina y aprovecharlos como sistemas de liberación controlada generalmente como nanoemulsiones cargadas de capsaicina y estabilizadas con dicho polímero (Choi, Kim, & Cho, 2011).

Capsaicina

La capsaicina es un alcaloide de fórmula $C_{18}H_{27}O_3N$ (Figura 2), es sólido a temperatura ambiente. Su nombre IUPAC es (E)-N-(4-hidroxi-3-metoxibencil)-8-metilnon-6-enamida. La capsaicina es el principal compuesto bioactivo del ají, detiene el crecimiento de algunos patógenos que se presentan en algunos cultivos, por esta razón es importante el estudio tanto de la extracción del metabolito como de la evaluación de su actividad antimicrobiana (Chipantiza Quinatoa, 2017). De manera conjunta, la capsaicina y la dihidrocapsaicina (capsaicina que ha perdido el doble enlace por hidrogenación), forman el 90% de todos los compuestos (capsaicinoides) responsables del picor del ají (*Capsicum* sp.) y los pimientos (Cedrón, 2013).

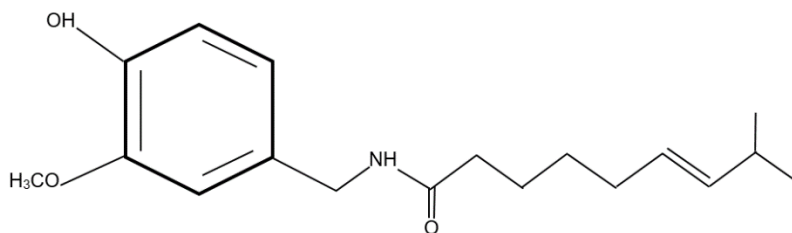


Figura 2. Estructura química de la capsaicina.

La capsaicina es de gran utilidad en industrias como en la alimentaria por su sabor pungente, se puede aplicar en la medicina para disminuir dolores musculares, además también presenta una importante capacidad inhibitoria del crecimiento de hongos y bacterias (Chipantiza Quinatoa, 2017). Sin embargo, la administración de capsaicina no siempre es factible debido a su pungencia, citotoxicidad en altas concentraciones y escasa solubilidad en agua. Es por eso que se han realizado varios estudios para incorporar la capsaicina en las nanoformulaciones o nanocompuestos, en un intento por hacerla más compatible con los ambientes fisiológicos acuosos (Pohl et al., 2015).

La extracción de capsaicina se realiza por diferentes métodos, por ejemplo: maceración, extracción Soxhlet y una serie de nuevas técnicas. Cada uno de los diferentes métodos de extracción presentan ventajas e inconvenientes dependiendo de la matriz o el analito a extraer, además se basan en la rapidez y eficacia que requiera la extracción (Barbero, 2007). Generalmente, la extracción por cualquier método antes mencionado, se realiza empleando solventes como metanol, etanol, acetonitrilo, acetona, cloroformo, etc. (Jumonville, 2017)(Fernando et al., 2011)(Baldeón & Hernández, 2017)(Mejía Yanez,



2013), siendo etanol el más empleado por ser económico y no tóxico. De manera importante, la extracción por método Soxhlet presenta varias ventajas y es una de las técnicas más empleadas en la extracción de capsaicina, debido a la rápida solubilización de los compuestos, así como su punto de ebullición que permite disminuir los tiempos de extracción y, además, se emplean cantidades pequeñas de muestra (p.ej. de 10 a 30 g), no es necesaria una filtración finalizada la extracción y algunos Soxhlet, es posible utilizarlos sin necesidad de controlarnos continuamente (Barbero, 2007).

Incorporación de compuestos activos en matrices de quitosano

El quitosano tiene la característica de presentar distintas formas dependiendo el área de aplicación, así podemos tener: geles, perlas o esferas, tabletas, películas, nanofibras y recubrimientos, además, puede ser empleado como un sistema de administración o liberación de fármacos o componentes activos usando diferentes técnicas como secado por aspersion, gelificación iónica, compresión directa, electrohilado y procesos convencionales de granulación (Elgueta et al., 2017).

Gelificación iónica

En la microencapsulación por gelificación iónica se obtienen esferas de tamaño micrométrico, es un proceso que ha sido empleado para retener sustancias bioactivas dentro de una matriz, en especial polimérica, con lo cual se logra encapsular dicho compuesto y además protegerlo de las condiciones ambientales perjudiciales. Las esferas obtenidas por microencapsulación varían su tamaño de unas micras a 1 mm y generalmente se basa en una membrana externa semipermeable y esférica, que rodea y mantiene en su núcleo al principio activo de interés (González, Tarón, & Morón, 2015).

En el proceso de la microencapsulación se empleaban solventes orgánicos, pero esto no resultaba factible para aplicaciones biológicas, por su alta toxicidad, por esta razón se empezaron a emplear sustancias naturales como proteínas y polisacáridos como alginato, quitosano, carragenato, etc.). Estos polisacáridos resultan de importancia dado que presentan buena compatibilidad y además de una rápida incorporación los principios activos (López., Calero, Torrez, Hernann, & Sánchez, 2014).

En la actualidad, diversas técnicas son empleadas para la elaboración de microesferas para encapsulación de compuestos en su interior, dentro de estas técnicas se tienen: secado por aspersion, extrusión, lecho fluidizado, coacervación simple o compleja, liposomas, inclusión en complejos, recubrimiento por aspersion, polimerización interfacial (Arriola et al., 2017)(Jampílek & Kráľová, 2017) , y la gelación iónica que es un proceso efectivo dado que, no requiere altas temperaturas y tampoco emplea



solventes orgánicos (Menin et al., 2018) La elección de un método depende principalmente de las propiedades del fármaco y los tipos de portadores poliméricos.

Los productos resultantes de la técnica de gelificación iónica se han utilizado ampliamente en medicina y farmacología como dispositivos de administración controlada en diversos materiales activos. La incorporación y el suministro de materiales bioactivos (por ejemplo, medicamentos, anticuerpos o enzimas) se puede lograr mediante el hinchamiento/desintegración de la matriz como resultado de los cambios ambientales del medio. Los polímeros hidrófilos reticulados proporcionan una red macromolecular temporal o permanente a través de la cual se produce la liberación por difusión de los ingredientes activos (Menin et al., 2018) . Las compañías agroquímicas han reducido el tamaño de las partículas de las emulsiones químicas existentes, llevándolas a dimensiones nanoscópicas, o han encapsulado los ingredientes activos en nanocápsulas diseñadas para abrirse bajo ciertas condiciones, como una respuesta a la luz solar, el calor o condiciones alcalinas del medio en que son aplicadas (Lugo et al., 2010). Algunas empresas elaboran formulaciones a las que se les incorpora nanopartículas en el rango de tamaño de 100 a 250 nm y que se disuelven en agua de manera más efectiva que las formulaciones existentes, lo cual mejora su actividad, mientras que otras compañías emplean nanoformulaciones que contienen algún pesticida, fungicida o herbicida nanoparticulados en el rango de 200 a 400 nm (Suganya & Anuradha, 2017). Estas formulaciones de liberación controlada preparadas utilizando la tecnología de encapsulación, protegen la droga o carga, mantienen la concentración de la droga dentro de un rango óptimo mediante el ajuste de la liberación de los componentes activos y brindan la sostenibilidad o duración del efecto del componente liberado. En tales preparaciones, materiales hidrófobos o hidrófilos pueden ser atrapados, por ejemplo, las liposomas formados por lecitina (un sistema portador y surfactante consistente en una mezcla de fosfolípidos) (Jampilek & Kráľová, 2017).

Electrohilado

Hoy en día, las nanofibras poliméricas tienen interés debido a que se aplican en una amplia variedad de campos industriales y presentan un futuro prometedor (Kohsari, Shariatnia, & Pourmortazavi, 2015) ya que pueden emplearse desde la industria textil hasta la industria biomédica, siendo una de las principales aplicaciones la encapsulación de compuestos bioactivos como enzimas, antioxidantes, antimicrobianos, sabores y aromas, sistemas de administración/liberación de fármacos o compuestos (Sill & von Recum, 2008)(Asmatulu & Khan, 2019)(Song, Wu, Qi, & Kärki, 2016)



Existen diferentes procesos para preparar nanofibras, pero el electrohilado es la técnica más empleada por ser simple, directa, de bajo costo y escalable. Con este método se pueden obtener nanofibras de polímero con alta porosidad y gran área de superficie específica, con un tamaño que varíe desde un submicrón (μm) hasta un nanómetro (nm). El electrospinning se utiliza para producir nanofibras multifuncionales a partir de polímeros naturales y artificiales, mezclas de polímeros y compuestos (Haider et al., 2015). Generalmente, y como ya se ha mencionado, el quitosano es el polímero por excelencia en la elaboración de nanocompuestos y en la técnica de electrohilado no es la excepción, ya que, a partir del quitosano se pueden producir nanofibras individuales con diámetros menores a 100 nm, provocando que su cristalinidad, la densidad de carga superficial y el potencial antimicrobiano aumenten (Almasi, Jafarzadeh, & Mehryar, 2018). Las nanofibras son una plataforma adecuada para fabricar nuevos materiales antimicrobianos, debido a sus características, las que incluyen pequeñas dimensiones, alta área de superficie específica, porosidad y alta flexibilidad funcional de la superficie. Además, distintas nanopartículas metálicas se pueden incluir en las nanofibras de quitosano para potenciar su acción biocida, como por ejemplo: plata, zinc, cobre, magnesio, titanio y oro (Song et al., 2016)(Kohsari et al., 2015).

El principio del proceso de electrohilado se basa en aplicar una corriente directa, entre 10 y 25 kV DC, a una solución polimérica para superar la tensión superficial del polímero que se pretende electrohilar. Cuando la tensión eléctrica aplicada se amplifica por encima del límite de tensión crítica, también conocida como intensidad de umbral, el perfil semicircular de la solución polimérica en la punta capilar, comienza a alargarse en una forma llamada cono de Taylor (Asmatulu & Khan, 2019). El chorro polimérico se desplaza en una trayectoria recta, conocida como la longitud del chorro, donde tiene lugar la inestabilidad de la fibra, este chorro comienza a dividirse en múltiples corrientes a medida que encuentra la repulsión de la carga debido al voltaje aplicado en el colector o tambor cargado de forma negativa, lo que resulta en la producción de fibras poliméricas (Willerth, 2018). El proceso se ve afectado por diferentes variables, clasificadas en parámetros de solución, parámetros de proceso y parámetros ambientales. Entre los parámetros de solución se tiene el peso molecular del polímero, concentración, viscosidad, tensión superficial, conductividad de la solución y las propiedades del solvente. Los parámetros del proceso se refieren al voltaje aplicado, flujo de inyección de la solución polimérica y la distancia entre el colector y la aguja. Finalmente, están los parámetros ambientales que son la temperatura y humedad, cabe mencionar que estos parámetros son de menor importancia (Salas, 2016).

Liberación de compuestos activos a partir de una matriz polimérica

Una acertada definición del concepto de liberación controlada de un compuesto activo en una matriz polimérica es la aportada por Roy y colaboradores que cita lo siguiente: "La liberación controlada es la transferencia regulada por permeación de un ingrediente activo desde un reservorio a una superficie específica para mantener un nivel de concentración predeterminado durante un período de tiempo específico." (Roy, Singh, Bajpai, & Bajpai, 2014)

Una de las nanotecnologías más prometedoras es la liberación de componentes a partir de nanocompuestos como nanoemulsiones, se utiliza para mejorar la estabilidad y la biodisponibilidad de los agentes funcionales. El ingrediente bioactivo se puede encapsular en estructuras nanométricas o nanocompuestos, que funcionan como sistemas de transporte. Estas estructuras de tamaño nanométrico tienen tamaños que varían de 20 a 500 nm y proporcionan las propiedades físicas necesarias, como solubilidad, estabilidad y biodisponibilidad (Choi et al., 2011). Algunas de las ventajas de los nanocompuestos de liberación controlada son el: nivel constante de agente activo durante un período prolongado, dosis más pequeñas, reducción de las pérdidas por evaporación, reducción de la fitotoxicidad, disminución de la contaminación ambiental y facilidad de manejo (Roy et al., 2014).

Algunos de los mecanismos conocidos para la liberación controlada a partir de matrices son la disolución, la ósmosis, la difusión, la hinchazón y la erosión (Figura 3). Estos mecanismos imponen la transformación física de los componentes presentes en la matriz cuando se ubican en un entorno biológico (Jafari, Katouzian, Rajabi, & Ganje, 2017).

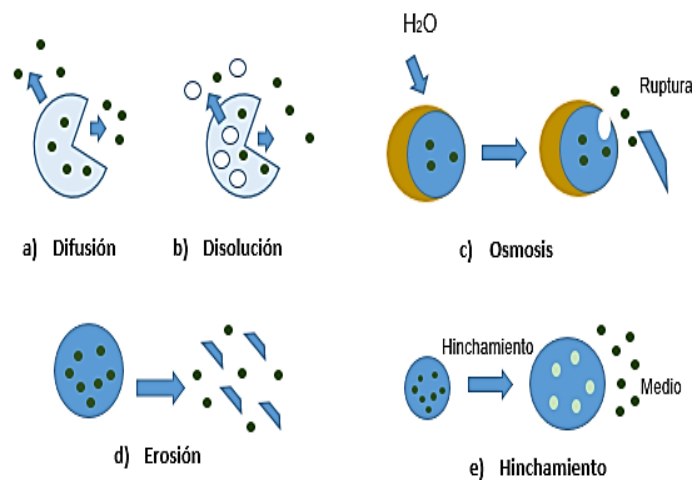


Figura 3. Mecanismos de liberación de compuestos activos encapsulados en una matriz



En general, la difusión es el mecanismo predominantemente y está presente en todos los sistemas de liberación. De manera general, la liberación de la sustancia o compuesto de interés parte por la difusión del compuesto que se encuentra en la superficie de la matriz y es liberado al medio que lo rodea. Luego, la cantidad de producto bioactivo se controla mediante un fenómeno de difusión del compuesto: directamente a través de la estructura molecular del polímero o a través de macro o microporos. Sin embargo, el caso más frecuente es una combinación de ambos mecanismos (Sáez, Hernández, & Sanz, 2004):

- a) Sistemas con depósito (núcleo interno conteniendo droga): Consisten en un núcleo de agente activo rodeado por una membrana delgada, homogénea y no porosa. El polímero puede o no hincharse y el transporte se da por la disolución del soluto en la interfase soluto/polímero y su difusión hacia el exterior por segmentos macromoleculares, bajo la influencia de un gradiente de concentración.
- b) Sistemas matrices o dispositivos monolíticos: El compuesto bioactivo está distribuido de manera uniforme en la matriz polimérica. El transporte se produce por difusión molecular a través del soporte o por difusión a través de microporos existentes en la matriz polimérica. Además, se genera una disminución de la velocidad de migración del fármaco con el tiempo ya que la difusión aumenta de forma continua.

Es así que factores diversos influyen en la velocidad de difusión del componente activo desde el interior de la matriz hacia el exterior, tanto la permeabilidad a través de la matriz y la solubilidad del componente que conforma la matriz influyen en esta (Xing et al., 2006). Además, la naturaleza química de la matriz polimérica, la morfología, la temperatura de transición y el grado de hinchamiento al momento del contacto con el medio de liberación también influyen en la difusión del componente a través de la matriz y algunas veces aumentan o disminuyen la velocidad de liberación de la carga (Yañez, Salazar Montoya, Chaires Martínez, Jiménez-Hernández, & Ramos-Ramírez, 2005)

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales, Reactivos y Equipos

Los materiales, la caracterización y equipos empleados en la síntesis de Cu-NPs por el método solvotermal, extracción de capsaicina a partir de ají rocoto e incorporación de nanopartículas de cobre en la matriz Quitosano/capsaicina (esferas y nanofibras) y sus correspondientes ensayos de liberación, son enunciados a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1. Materiales, reactivos y equipos empleados en síntesis de Cu-NPs, extracción de capsaicina, incorporación de Cu-NPs a matriz Quitosano/capsaicina y ensayos de liberación.

Materiales	Reactivos	Equipos
Crisoles	Oleilamina (C ₁₈ H ₃₅ NH ₂) (ALDRICH)	Balanza analítica (AND HM-200)
	Etilenglicol (≥ 95 - EMSURE)	
Varilla de vidrio	Nitrato de Cobre- Cu(NO ₃) ₂ ·2.5H ₂ O (98% - SIGMA)	Reactor químico de acero inoxidable forrado con teflón (PARR 4744)
Tubos de ensayo	Etanol (99% pureza - EMSURE)	Estufa (SHEL LAB- SVAC 1)
Cajas Petri	Acetona	Centrifuga
Vasos de precipitación	Capsaicina (≥ 95% - SIGMA)	Espectrómetro UV-Vis (Thermo Scientific - Genesis 10S)
Jeringa de plástico (10 mL)	Ají rocoto	Espectrómetro infrarrojo (Thermo Scientific- Nicolet iS5)
Colador metálico	Quitosano (≥75% desacetilado- SIGMA)	Microscopio Electrónico de Transmisión (JEOL/JEM 1200 EXII)
Papeles filtro	Ácido acético	Microscopio Electrónico de Barrido (JEOL/JEM 6380 LV)
Embudos de filtración	NaOH (5N)	Equipo de extracción Soxhlet (BLASSCO)
Papel aluminio	Agua desionizada	Rotaevaporador (BOECO-RVO 400 SD)
Pipetas	CuSO ₄ ·5H ₂ O	Agitador magnético (TOPO-HS150)
Probetas	Amonio en solución (25%)	pH metro (Hanna Instruments HI 2221)



Métodos

Síntesis solvotermal de Cu-NPs

Se realizaron dos tipos de síntesis cuya nomenclatura se diferencia en el solvente empleado: Cu-NPs/Etilenglicol y Cu-NPs/Oleilamina, en ambos casos se empleó $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5 \text{H}_2\text{O}$ como precursor metálico y se varió la temperatura de reacción, el tiempo de reacción y el solvente empleado (Giannousi, Sarafidis, Mourdikoudis, Pantazaki, & Dendrinou-Samara, 2014).

Para la síntesis Cu-NPs/Etilenglicol, se disolvió 4,13 mmol (1 g) de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ en 4 mL de agua desionizada y luego se agregó 10 mL de etilenglicol (EG). La mezcla resultante se transfirió a un reactor químico de acero inoxidable forrado con teflón, de 45 ml de capacidad. La síntesis se llevó a cabo a 120 °C, durante 48 h.

Para la síntesis Cu-NPs/Oleilamina, se disolvió 4,13 mmol (1 g) de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ en 10 mL de oleilamina (OAm). La mezcla resultante se transfirió a un reactor químico de acero inoxidable revestido de teflón, y la reacción se dejó continuar durante 24 horas a 200 °C.

Después, para ambas síntesis, el reactor químico se enfrió de forma natural a temperatura ambiente y el producto resultante se centrifugó a 3100 rpm durante 50 minutos, los líquidos sobrenadantes se descartaron y los precipitados obtenidos se lavaron con etanol y acetona, varias veces, para eliminar interferentes y agentes sin reaccionar. Finalmente, las muestras se secaron a temperatura ambiente y se guardaron para su posterior caracterización. Un esquema de la síntesis llevada a cabo en este trabajo, se muestra a continuación en la Figura 4:

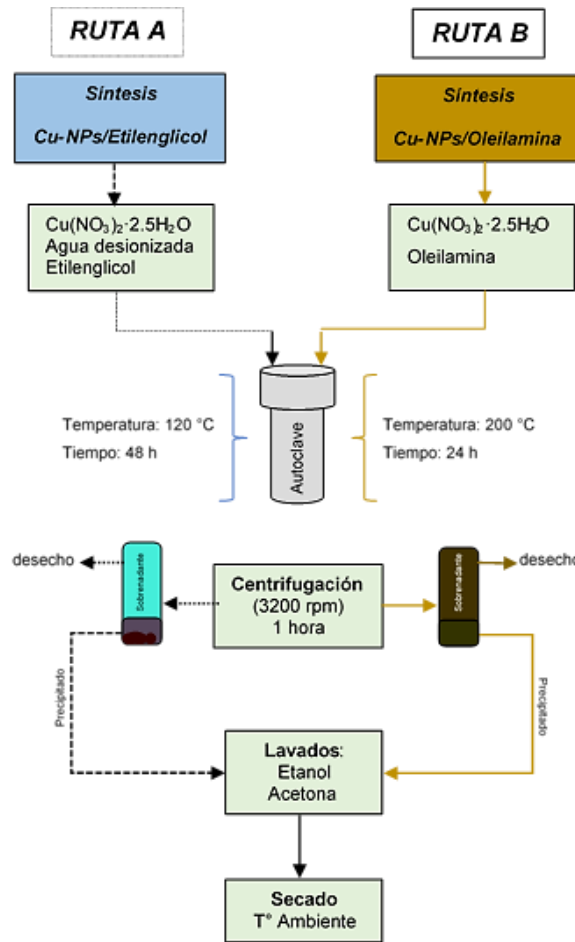


Figura 4. Síntesis solvotermal de Nanopartículas de cobre (Cu-NPs)

Extracción de capsaicina a partir de ají rocoto (*Capsicum Pubescens*)

Pre Tratamiento de muestra

El pretratamiento de las muestras consistió en lavar y secar las muestras que fueron extraídas del ají rocoto, los lavados fueron para eliminar todas las impurezas presentes en la superficie. El tratamiento de lavado consistió en remojar los ajíes durante 10 minutos, luego con un cepillo suave se restregó la superficie de los ajíes empleando agua destilada. Finalmente, se dejó escurrir los ajíes durante 24 horas a temperatura ambiente.

Previo al secado de las muestras los pedúnculos y semillas del ají fueron retirados con un cuchillo plástico para evitar la contaminación de la muestra. El proceso de secado se desarrolló a una temperatura de 40°C en estufa durante 24 horas. Adicionalmente, se determinó el % humedad de la muestra, para ello los ajíes fueron pesados antes y después del proceso de secado hasta llegar a peso constante. La humedad de cada muestra se determinó con la siguiente fórmula.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Peso muestra húmeda} - \text{Peso muestra seca}}{\text{Peso muestra seca}} * 100 \quad (1)$$



Extracción por Método Soxhlet

Para extraer el principio activo de las muestras de ají, se utilizó el método de extracción Soxhlet; el cual consiste en el lavado sucesivo de una mezcla sólida, con un determinado solvente que va “lavando o extrayendo” de la mezcla los componentes más solubles en él (Kim et al., 2011).

En el proceso de extracción, se empleó como solvente etanol. Para el desarrollo del mismo, primero se pesó una determinada cantidad de muestra y se colocó en un dedal de celulosa, luego se armó el equipo de extracción colocando la manta calefactora, el balón de fondo redondo, la camisa de extracción y el refrigerante (Figura 5). En el balón de fondo redondo se colocó 300 mL de alcohol potable (etanol 96%), se colocó la camisa junto con el dedal y finalmente se ensambló el refrigerante el cual va conectado a la llave de agua. Una vez ensamblado el equipo, se procedió a regular el flujo de agua del refrigerante y en la manta calefactora se reguló la temperatura de trabajo, hasta que el solvente alcanzó la temperatura de ebullición (71 °C). La extracción se llevó a cabo durante 6 horas a una temperatura de 71 °C. Finalizado el proceso, se almacenó la muestra en refrigeración a una temperatura de 4°C y protegida de la luz para evitar su degradación. Para este procedimiento se desarrollaron tres pruebas (P1, P2 y P3), las mismas se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Pruebas realizadas en extracción de ají rocoto

Código	Descripción
P1	cáscaras
P2	Fruto entero
P3	semillas

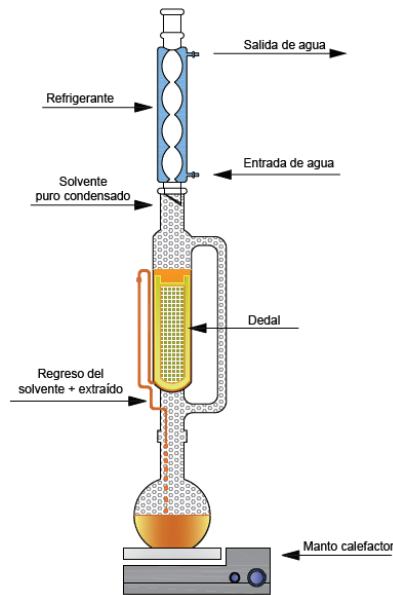


Figura 5. Diagrama del equipo Soxhlet y extracción de ají rocoto.

Determinación de % Extraíbles

Una vez realizada la extracción de la muestra, se pesó el compuesto procesado de ají rocoto, registrando este peso como peso de muestra libre de extracto. A partir de estos datos, se registró el % de extraíbles de cada prueba mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ extraíbles} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso muestra libre de extracto}}{\text{Peso inicial}} * 100 \quad (2)$$

Concentración en rotaevaporador

Para concentrar la muestra extraída del ají rocoto, se empleó un rotaevaporador. El proceso se llevó a cabo durante 6 horas a una temperatura de 70 °C y baño maría. Este procedimiento se desarrolló con el objetivo de reducir y concentrar el volumen extraído inicial que fue de 300 mL y llevarlo a 50 mL, para evaporar el etanol contenido en la muestra. La muestra concentrada reducida se almacenó en un recipiente ámbar para evitar la degradación y fue colocada en refrigeración a una temperatura de 4°C para posteriores análisis.

Encapsulación de Cu-NPs en esferas capsaicina/quitosano

Método de gelificación iónica

Consiste en disolver el quitosano para luego mediante goteo sobre una solución alcalina solidificar el polímero. Generalmente, sustancias o compuestos de interés son encapsuladas en el interior de las esferas, hilos, láminas, etc. Para el proceso se empleó como polímero quitosano (≥ 75 % desacetilación). Primero, quitosano al 1, 2 y 3 % P/V se disolvió empleando una solución de ácido acético al 1 y 2 % V/V, respectivamente. Luego, la solución polimérica se mezcló con un agitador magnético durante 2 horas, a

1500 rpm y una temperatura de 30 °C. Las esferas de matriz doble (quitosano/capsaicina y quitosano/Cu-NPs) y triple (quitosano/capsaicina/Cu-NPs) fueron preparadas a partir de la mejor proporción de ácido acético/quitosano, de la siguiente manera:

- Matriz Quitosano/Capsaicina: Se preparó añadiendo 2% V/V del extracto de ají rocoto concentrado a la solución polimérica de quitosano. Luego, la solución se agitó a 600 rpm y temperatura ambiente durante 1 hora.
- Matriz Quitosano/Cu-NPs: Se preparó añadiendo Cu-NPs en polvo al 1 % y 2% P/P a la solución polimérica de quitosano. Luego, la solución se agitó a 600 rpm a una temperatura de 25 °C durante 3 horas.
- Matriz Quitosano/Capsaicina/Cu-NPs: Se preparó añadiendo 2% V/V de extracto de ají rocoto a la solución de quitosano disuelta y se agitó a 600 rpm a temperatura ambiente. Luego, se añadieron Cu-NPs en polvo al 1% y 2% P/P (por peso de quitosano) y se continuó la agitación a 600 rpm y a una temperatura de 25 °C.

El proceso de formación consistió en colocar la solución polimérica (matriz doble o triple) en una jeringa de plástico de 10 mL, y gotear sobre una solución de NaOH (5 N) a 10 cm de altura, mediante agitación a 400 rpm y a temperatura ambiente (Figura 6). Las esferas formadas fueron separadas de la solución alcalina con un colador metálico y se realizaron varios lavados de las mismas con agua desionizada hasta obtener un pH cercano 7. El pH se verificó con un pH. Finalmente, las esferas fueron secadas a temperatura ambiente y guardadas para posteriores caracterizaciones.

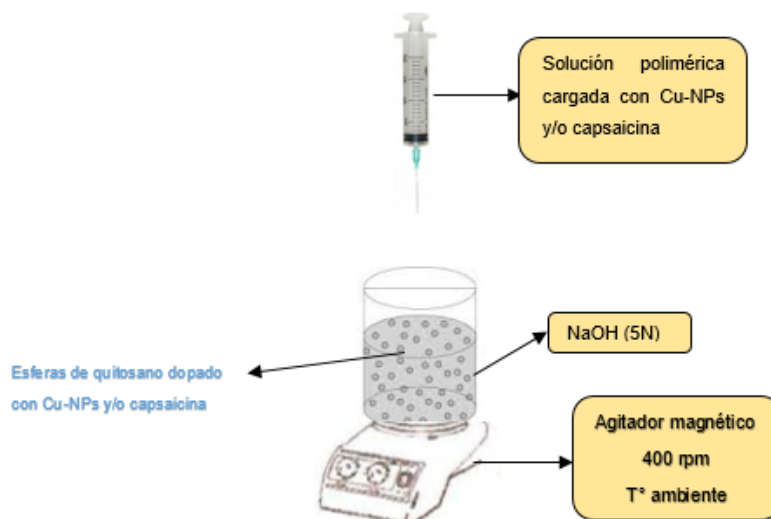


Figura 6. Método de gelificación iónica para la formación de esferas de quitosano dopadas con Cu-NPs y/o capsaicina

Encapsulación de Cu-NPs en nanofibras capsaicina/quitosano

Método de electrohilado

El método consiste en aplicar un voltaje eléctrico el cual es amplificado por encima del límite de voltaje crítico conocido como intensidad de umbral. Generalmente se aplican voltajes entre 20 y 25 kV, una vez aplicado el voltaje, la solución polimérica forma un perfil semicircular en la punta de la aguja y comienza a alargarse en una forma llamada cono de Taylor (Asmatulu & Khan, 2019). En la figura 7 se muestra el esquema del equipo de electrohilado empleado.

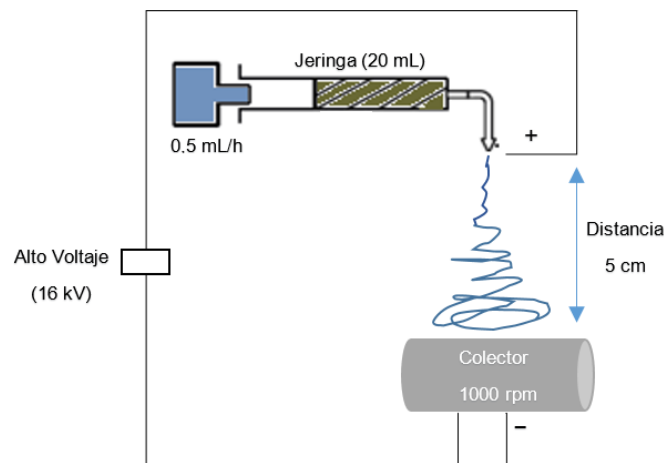


Figura 7. Esquema del equipo de electrohilado.

Para el proceso de formación de nanofibras se utilizó quitosano (≥ 75 % desacetilación) al 1% P/V el cual fue diluido con 20 mL ácido acético al 80% V/V. La solución se mezcló con la ayuda de un agitador magnético durante 3 horas, a 1500 rpm y a una temperatura de 30 °C. Las nanofibras de matriz doble (quitosano/capsaicina) y triple (quitosano/capsaicina/Cu-NPs) fueron preparadas como se describe a continuación:

- Matriz Cu-NPs/quitosano: A la solución polimérica de quitosano disuelta se añadió Cu-NPs en polvo al 1 % P/P (por peso de quitosano) y se agitó la solución a 600 rpm a una temperatura de 25 °C durante 3 horas.
- Matriz capsaicina/quitosano: A la solución de quitosano disuelta se añadió 2% V/V del extracto de ají rocoto concentrado, se agitó a 600 rpm, a temperatura ambiente, durante 1 hora.
- Matriz Cu-NPs/capsaicina/quitosano: Se añadió 2% V/V de extracto de ají rocoto a la solución de quitosano disuelta y se agitó a 600 rpm, a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego, se añadió Cu-NPs en polvo al 1% y 2% P/P (por peso de quitosano) y se agitó la solución a 600 rpm y a temperatura de 25 °C.



Finalmente, para formar todas las nanofibras se empleó un electro spinning en donde la solución polimérica de quitosano dopado con Cu-NPs y/o capsaicina se colocó en una jeringa desechable de 20 mL de capacidad y las nanofibras formadas se recolectaron en papel aluminio. El proceso se llevó a cabo a las condiciones de la Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros empleados en la elaboración de nanofibras de matriz doble y triple.

Parámetro	Valor
Distancia de la aguja	5 cm
Distancia del brazo	5 cm
Número de aguja	22
Velocidad de rotación del tambor	1000 rpm
Voltaje aplicado	16 kV
Purga	2 mL
Flujo	0,5 mL/h

Ensayos de liberación en vitro

Liberación a partir de esferas

Primero, se pesaron 200 mg de esferas y se dispersaron en 100 mL de agua desionizada. Se agitaron las muestras a 500 rpm y se trabajó a temperatura ambiente protegiendo las soluciones con papel parafilm para evitar cualquier cambio en las condiciones de liberación. Luego, a diferentes intervalos de tiempo (2,4,8,24,48,72 y 96 h) se tomó una alícuota de 2 mL para determinar la concentración de capsaicina y Cu-NPS liberada mediante UV-Vis.

Liberación a partir de nanofibras

Los ensayos de liberación se llevaron a cabo siguiendo la metodología empleada por Almasi, Jafarzadeh & Mehryar con algunas modificaciones (Almasi et al., 2018). Primero se pesaron 30 mg de nanofibras de matriz doble y triple y se dispersaron en 100 mL de agua desionizada. Las suspensiones se agitaron a temperatura ambiente a 400 rpm. Luego, a diferentes intervalos de tiempo (1, 5, 10, 15, 30 y 45 minutos) se tomó una alícuota de 2 mL para cuantificar la capsaicina y las Cu-NPs liberadas, empleando un UV-Vis.

Modelos cinéticos de liberación

El proceso de liberación se puede llevar a cabo por difusión o hinchamiento y relajación (Roy et al., 2014). Se aplicaron dos modelos cinéticos el de Higuchi y Korsmeyer y Peppas para ajustar los datos obtenidos de los ensayos de liberación de Cu-NPs.



En los sistemas matriciales, el modelo de Higuchi es la ecuación matemática común para la descripción de la liberación de nutrientes a través de una de las caras de la matriz tratada y, por lo general, se ajusta a las diferentes geometrías y sistemas porosos y cumple la Ley de Fick por difusión (Jafari et al., 2017). Esta ecuación se expresa así:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^{1/2} \quad (3)$$

Donde M_t/M_∞ es la fracción de soluto liberado al medio en tiempo t y k es la constante de velocidad.

El modelo de Korsmeyer y Peppas describe la liberación de moléculas centrales de una red polimérica con una relación simple a través de erosión o disolución de la matriz. Es una forma generalizada de la ecuación de Higuchi y se expresa de la siguiente forma:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (4)$$

En donde M_t/M_∞ es la fracción de soluto liberado al medio en tiempo t , k es una constante que representa la matriz y n representa el mecanismo de liberación del compuesto de interés. Si el valor de n es igual a 0,5 se dice que se sigue un mecanismo Fickiano y la liberación se da por difusión y si $0,5 < n < 1$ tendrá un comportamiento no Fickiano (Jafari et al., 2017)

Caracterización de nanopartículas y compuestos obtenidos

Todos los compuestos obtenidos anteriormente: Cu-NPs por método solvotermal, capsaicina a partir del ají rocoto por Soxhlet, esferas y nanofibras de quitosano elaboradas por método de gelificación iónica y electrospinning, respectivamente y dopadas con Cu-NPs y con capsaicina, fueron caracterizados mediante técnicas analíticas como MET, MEB, IRTF y UV-Vis.

Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Las micrográficas de transmisión electrónica se realizaron solamente para las Cu-NPs con el objetivo de determinar el tamaño y forma de las mismas. Se utilizó un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1,200 EX II que emplea una etapa de goniómetro eucéntrico de entrada lateral para facilitar el intercambio de muestras, con 4 Å de resolución y operado a 120 KV y a temperatura ambiente. El equipo consta de una rejilla de cobre cubierta de carbón de tamaño 200 mesh, en donde se colocaron las muestras de nanopartículas en polvo mediante dispersión en una resina epoxi.

Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

La MEB se realizó en nanofibras y esferas de doble matriz (capsaicina/quitosano), (Cu-NPs/quitosano) y de matriz triple (Cu-NPs/capsaicina/quitosano), para ello se empleó



un microscopio electrónico de barrido JEOL-JEM 63 80 LV que está adaptado con un analizador INCA de Oxford Instrument© con acelerador de voltaje de 20 kV. La caracterización se llevó a cabo cortando cada muestra que se colocó en un porta muestra de cobre y finalmente se realizó un recubrimiento de oro (sputtering), finalmente fue medida y se determinó la morfología de las nanofibras y esferas, además de la existencia o distribución de Cu-NPs incluidas en las mismas.

Espectroscopía de Infrarrojo (IRTF)

Se realizaron espectros de infrarrojo para todos los compuestos (Cu-NPs, extracto de capsaicina a partir del ají rocoto y esferas y nanofibras de quitosano/capsaicina, con o sin contenido de Cu-NPs). Dichos espectros, fueron obtenidos con un espectrómetro infrarrojo Thermo Scientific- Nicolet iS5. Este equipo está constituido por una celda de ZnSe en donde se coloca la muestra y a través de la celda atraviesa luz infrarroja, que, para este equipo, comprende longitudes de onda entre 4000 cm^{-1} y 400 cm^{-1} . Con los espectros obtenidos, se pudo determinar los grupos funcionales presentes en la muestra y si se encontraban absorbidas o adsorbidas en la superficie de cada compuesto.

Espectroscopía UV-Vis (UV-Vis)

Se empleó un espectrómetro UV-Vis (Thermo Scientific - Genesis 10S) para caracterizar las Cu-NPs, la capsaicina obtenida a partir del ají rocoto y para cuantificar la liberación de cobre y capsaicina a partir de las esferas y nanofibras de quitosano.

En el caso de las Cu-NPs, se disolvieron en etanol y en acetona y se realizaron barridos de longitud de onda para identificar la aparición de picos a longitudes de onda comprendidas entre 300 y 400 nm, que es el rango en el cual absorben las Cu-NPs (Cárdenas, Díaz V., Meléndrez, Cruzat C., & García Cancino, 2009; Elgueta et al., 2017).

Para cuantificar la capsaicina se construyó una curva de calibración partiendo de capsaicina de grado analítico. Una vez construida la curva, se tomó una alícuota de 10 mL del extracto de capsaicina, divididos en dos partes (5 mL previo a la concentración y 5 mL después de la concentración del extracto en el rotaevaporador) y la cantidad de capsaicina fue determinada a una longitud de onda de 281 nm, misma que está asociada a la capsaicina P.A.

Para la cuantificación del cobre liberado se construyó una curva a partir de un complejo amoniacal de cobre, el complejo tetraaminocobre (II) $[(\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$, empleando amoníaco en solución al 25 %. Una vez construida la curva se cuantificó el cobre contenido en las alícuotas provenientes de los ensayos de liberación tanto para esferas como para nanofibras a una longitud de onda de 605 nm.



La construcción de las curvas de calibración mencionadas, se describen a continuación.

- Construcción de curva de calibración de capsaicina

En la construcción de la curva de calibración de capsaicina, se empleó una solución patrón de capsaicina ($C_{18}H_{27}NO_3$) de grado analítico $\geq 95\%$, marca Sigma Aldrich. Primero, se preparó una solución madre de 400 mg/L de capsaicina disuelta en etanol ($\geq 99\%$ pureza). A partir de esta solución, se prepararon patrones de 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 200, 300 y 400 mg/L, con los cuales se construyó la curva de calibración en UV-Vis tomando en cuenta el coeficiente de correlación y la verificación visual de la linealidad.

- Construcción de curva de calibración de cobre

En la construcción de la curva de calibración de cobre, se empleó sulfato de cobre pentahidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) y amoníaco en solución (NH_4OH) como acomplejante del cobre el cual al unirse a él muestra una coloración azul, indicando la presencia del complejo. Primero, se preparó una solución madre de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ de 3930 mg/L a la cual se le añadió 5 gotas de H_2SO_4 . A partir de esta solución, se tomaron alícuotas de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 18 mL y se colocaron en balones de 50 mL, luego, a cada uno se añadió 3 mL de acomplejante NH_4OH al 25% y se completó el aforo con agua destilada. De esta manera se obtuvieron patrones de 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320, 360 mg/L de cobre. Finalmente, se empleó UV-Vis y se construyó la curva tomando en cuenta el coeficiente de correlación y la verificación visual de la linealidad.

ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis de Cu-NPs

En la Tabla 4. se describen los experimentos realizados para las síntesis Cu-NPs/Etilenglicol y Cu-NPs/Oleilamina, condiciones de temperatura, tiempo de reacción, el solvente empleado para los lavados y el color antes y después de la síntesis.

Tabla 4. Condiciones y resultados de síntesis Cu-NPs con etilenglicol y Cu-NPs con oleilamina.

Síntesis	N° experimento	Condiciones de síntesis	Color pre-síntesis	Color post-síntesis	Lavados
Cu-NPs/Etilenglicol	1	T= 120 °C t= 2 h	Azul claro	Azul claro	Etanol
	2	T= 120 °C t= 6 h		Azul claro	Etanol
	3	T= 120 °C t= 24 h		Azul claro-gris	Etanol
	4	T= 120 °C t= 48 h		Azul claro con precipitado gris-rojizo	Etanol
Cu-NPs/Oleilamina	1	T= 200 °C t= 24 h	Azul oscuro	Café/verdoso	Etanol
	2	T= 200 °C t= 12 h			Etanol
	3	T=200 °C t=24 h			Acetona
	4	T= 200 °C t= 12 h			Acetona

Los experimentos realizados en la síntesis Cu-NPs/Etilenglicol no fueron del todo satisfactorios, especialmente los experimentos N° 1, 2, y 3, debido al tiempo de síntesis de cada uno de los experimentos, en el cual no se obtuvo cambio en la coloración del producto final por lo que se anticipó que no se haya producido la reacción. El cambio en la coloración es importante, dado que es una reseña de la reducción del cobre y la posible formación de nanopartículas (Cruzat Contreras et al., 2011). Al contrario, el experimento 4 de esta síntesis, mostró cambio de coloración y aparición de tonos grises en la solución, suponiendo la formación de nanopartículas. Luego del lavado con etanol se obtuvo un polvo de color verde-azulado con un peso de aproximadamente 0,3 g/g de



$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$. Probablemente debido a la falta de un reductor fuerte, como la hidracina propuesta en el caso de la metodología seguida por Giannousy y colaboradores (Giannousi et al., 2014)

En cuanto a la síntesis Cu-NPs/Oleilamina se emplearon dos tiempos diferentes, el primero de 12 horas y el segundo de 24 horas de síntesis solvotermal. En los dos casos existió un cambio de color de azul oscuro a café/verde lo cual puede indicar la formación de nanopartículas. A las muestras centrifugadas se las lavó con etanol, mientras que otras fueron lavadas con acetona, esto se realizó para comparar con cuál de los dos solventes se logra eliminar la oleilamina o compuestos interferentes y obtener un compuesto con mayor pureza. Así, se observó que en las muestras lavadas con etanol no se logró eliminar totalmente la oleilamina empleada, otorgando una textura aceitosa de color verde al producto final, dificultando la obtención de un polvo que supone la mayor presencia de nanopartículas. Por otro lado, en las muestras lavadas con acetona se logró obtener un polvo de color verde con un peso de 0,5 g/g de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ empleado, suponiendo que se pudo remover con mayor eficiencia la oleilamina con este tratamiento (Giannousi et al., 2014)(Nogueira, Giroto, Neto, & Ribeiro, 2016).

En resumen, la síntesis óptima con la que se obtuvieron nanopartículas en polvo fue el experimento N° 3 Cu-NPs/Oleilamina con las siguientes condiciones: tiempo de reacción de 24 horas, temperatura de 200° C y lavado con acetona. Es así que se empleó este polvo nanoparticulado y se prosiguió en la elaboración de esferas y nanofibras de quitosano. Además, se realizó la caracterización de las muestras por las técnicas descritas anteriormente.

Extracción de capsaicina a partir de ají rocoto (*Capsicum Pubescens*)

Propiedades organolépticas y fisicoquímicas

La Tabla 5 presenta el porcentaje de humedad del ají rocoto. Como se observa, el ají rocoto presenta un contenido de humedad elevado (98,99 %), mayor al teórico reportado por Mejía (91 %) (Pozo & Mejía, 2014).

*Tabla 5. Porcentaje de humedad de fruto entero, pedúnculos y semillas del ají rocoto (*Capsicum Pubescens*).*

Componente	Peso húmedo (g)	Peso seco (g)	% Humedad
Cáscaras	20,8466	12,9410	61,09
Pedúnculos	51,1427	39,1574	30,61
Semillas	53,9585	50,2927	7,29
			98,99



En la Tabla 6 se presentan las propiedades organolépticas y físico químicas de los extractos obtenidos del ají rocoto.

Tabla 6. Propiedades organolépticas y fisicoquímicas de los extractos de ají rocoto por método Soxhlet

Propiedad	Fruto entero	Cáscaras	Semillas
Olor	Característico del ají		
Textura	Aceitosa	Aceitosa	Aceitosa
Color	Naranja	Rojo	Naranja
pH	6,3	6	6,1
Solubilidad	Etanol	Etanol	Etanol

Determinación de % de Extraíbles

El % extraíbles obtenido corresponde al porcentaje donde se reporta la mayor cantidad de capsaicinoides extraído por el método Soxhlet y para cada prueba se reporta en la Tabla 7. Aquí podemos observar que el menor % extraíbles correspondió a P1 (extracto de todo el fruto), mientras que el mayor % extraíbles correspondió a P3 realizada a partir de las semillas del ají rocoto, correspondiente a 30,64 %. El mayor % de extraíbles encontrado en la semillas puede justificarse por la cercanía de estas a la placenta a lo largo del fruto que es donde se producen en mayor cantidad los capsaicinoides, entre ellos la capsaicina (Estrada, Bernal, Díaz, Pomar, & Merino, 2002)

Supalkova y colaboradores mencionan que al comparar el contenido de capsaicina en la placenta (constituida por las venas del ají), parte inferior de la cascara, parte superior de la cáscara y en las semillas; el contenido de capsaicina no era uniforme en todo el fruto y el contenido más bajo recuperado por extracción se encontraba en las semillas (Supalkova et al., 2007). Sin embargo, Estrada encontró que la capacidad de producir capsaicinoides es 20 veces mayor en la placenta y sus alrededores que en la cáscara, además que el contacto entre la placenta y semillas mediante los tejidos circundantes puede causar que exista mayor absorción de capsaicinoides a través de partes del fruto (semillas) que no producen capsaicinoides activos (Estrada et al., 2002)

Tabla 7. Porcentaje de extraíbles de diferentes extractos de ají rocoto (*Capsicum Pubescens*).

Código	Peso inicial (g)	Peso muestra libre de extracto (g)	% Extraíbles
P1	10,0072	7,7281	22,77
P2	10,0055	8,5849	14,19

Encapsulación de Cu-NPs en esferas y nanofibras de quitosano/capsaicina

Determinación de solución de quitosano óptima para esferas

Se determinó la proporción óptima ácido acético/quitosano con la que se formaron las esferas de matriz doble y triple, para ello se realizaron 4 ensayos (E1, E2, E3 y E4) variando el porcentaje de quitosano y ácido acético. En cada prueba se analizó la fluidez, la morfología de las esferas que se obtienen y la resistencia de las esferas. Tanto la fluidez de la solución y la forma de las esferas formadas, se evaluó de manera visual, mientras que para evaluar la resistencia de las esferas formadas se aplicó presión manual y se designó una escala del 1 al 5, en donde 5 representa una resistencia máxima y 1 representa la resistencia mínima donde la esfera presionada se rompe fácilmente. A continuación, en la Tabla 8 se presentan los resultados para cada ensayo

Tabla 8. Ensayos para determinar solución polimérica óptima para formar esferas.

N° Ensayo	Concentración Ácido acético	Concentración Quitosano	Fluidez	Morfología de esferas	Resistencia
E1	1 % V/V	3 % P/V	No se mezcla.	Irregular	3
E2	2 % V/V	3 % P/V	Se mezcla. Viscoso	Irregular	3
E3	1 % V/V	1 % P/V	Mezcla bien. Muy fluida	Esferas	1
E4	1 % V/V	2 % P/V	Mezcla bien. Fluida	Esferas	5

Como se observa en la Tabla 8, las mejores condiciones se obtienen a partir de la prueba 4, con la cual se obtienen esferas bien formadas y con una resistencia excelente, además de brindar una fluidez adecuada para que al momento de desarrollar el método de gelación iónica se pueda tener un flujo de solución continuo que permita la formación de esferas en una tasa constante y así disminuir el desfase morfológico existente entre las esferas obtenidas. Es así que la solución que se empleó para obtener todas las esferas de matriz doble y triple consistió en ácido acético (1 % V/V) y quitosano (2 % P/V)

Componentes y porcentajes de esferas y nanofibras obtenidas

Para la formación de esferas de matriz doble conteniendo Cu-NPs, se varió la concentración de Cu-NPs entre 1 y 2 % P/P (por peso de quitosano), esto para analizar cómo afecta la concentración de Cu-NPs en los ensayos de liberación realizados



posteriormente. El color de las esferas matriz doble fue naranja (quitosano/capsaicina) y de matriz triple de color verde (Cu-NPs/capsaicina/quitosano), presentaron morfología uniforme y resistencia adecuada, además se obtuvieron a un pH cercano a 7, luego de los respectivos lavados con agua desionizada. La Tabla 9 muestra el porcentaje de cada componente, pH y peso de las esferas obtenidas.

Tabla 9. Peso y pH de esferas de matriz doble y triple.

Matriz	Componentes	Porcentaje	Peso (g)	pH
Doble	Quitosano	2 % P/V	0,4267	7,83
	Cu-NPs	1 % P/P		
Doble	Quitosano	2 % P/V	0,4931	7,86
	Cu-NPs	2 % P/P		
Doble	Quitosano	2 % P/V	0,5443	7,74
	Capsaicina	2 % V/V		
Triple	Quitosano	2 % P/V	0,4193	7,2
	Capsaicina	2 % V/V		
	Cu-NPs	1 % P/P		
Triple	Quitosano	2% P/V	0,4717	7,62
	Capsaicina	2% V/V		
	Cu-NPs	2 % P/P		

En relación a las nanofibras, se obtuvieron películas de color blanco y con superficie poco homogénea, ya que se encontraban gotas más grandes formadas debido a variaciones en la inyección del flujo mediante la aguja del electrospinning, ya que a momentos se observaba que la gota formada en la punta era grande y caía directamente sin ser esprayada. En la Tabla 10 se resumen los componentes y porcentajes de las nanofibras obtenidas.

Tabla 10. Nanofibras obtenidas por método de electrohilado.

Matriz	Componentes	Porcentaje
Triple	Quitosano	1 % P/V
	Capsaicina	2 % V/V
	Cu-NPs	1 % P/P



Triple	Quitosano	1 % P/V
	Capsaicina	2% V/V
	Cu-NPs	2 % P/P
Doble	Quitosano	1 % P/V
	Capsaicina	2 % V/V
Doble	Quitosano	1 % P/V
	Cu-NPs	1 % P/P

Caracterización de compuestos obtenidos

A continuación, en la Tabla 11 se muestra un cuadro resumen de cada compuesto obtenido junto con la respectiva técnica analítica empleada para su caracterización

Tabla 11. Técnicas analíticas empleadas en caracterización de compuestos

Compuesto	Técnica analítica			
	UV-Vis	MET	MEB	IRTF
Cu-NPs sintetizadas por método solvotermal	X	X		X
Capsaicina extraída a partir de ají rocoto	X			X
Esferas y nanofibras de quitosano dopadas con Cu-NPs y capsaicina elaboradas por gelificación iónica y electrohilado, respectivamente			X	X

Espectroscopía UV-Vis

- Nanopartículas de Cobre (Cu-NPs)

Para la lectura de la muestra en el equipo, el polvo obtenido de cada síntesis se dispersó en etanol previamente por sonicación, durante 15 minutos. En la Figura 8a, se presenta el espectro UV-Vis de las Cu-NPs obtenidas por la síntesis Cu-NPs/Etilenglicol durante un tiempo de reacción de 48 h y a 120 °C. El espectro muestra un pico de absorbancia a 206 nm, este valor es cercano a la absorbancia reportada para aglomeración de Cu-NPs dispersadas en propanol, en donde se observa un pico correspondiente a 230 nm (Cárdenas et al., 2009), por lo cual se puede aseverar la formación de Cu-NPs ya que esta absorción se asocia al plasmón producido entre nanopartículas. Por otro lado, la

muestra obtenida por la síntesis Cu-NPs/Oleilamina a 200 °C por un tiempo de 24 h, se dispersó en acetona, el espectro de esta síntesis (Figura 8 b) muestra una banda de absorción desde 342 nm hasta 400 nm en donde la absorbancia es máxima, esta longitud de onda es cercana a lo reportado por Cárdenas y colaboradores que mencionan una absorbancia máxima de 300 nm que corresponde a una aglomeración de las Cu-NPs (Cárdenas et al., 2009).

La posición exacta de la banda de absorción varía en ambas síntesis lo cual tiene sentido, ya que esta depende de las propiedades individuales de las partículas como el tamaño, forma, solvente y reductor empleado. Por lo tanto, esto se puede justificar por la diferencia del solvente empleado en cada una. Además, la posible diferencia en forma y tamaño se corrobora con el análisis MET.

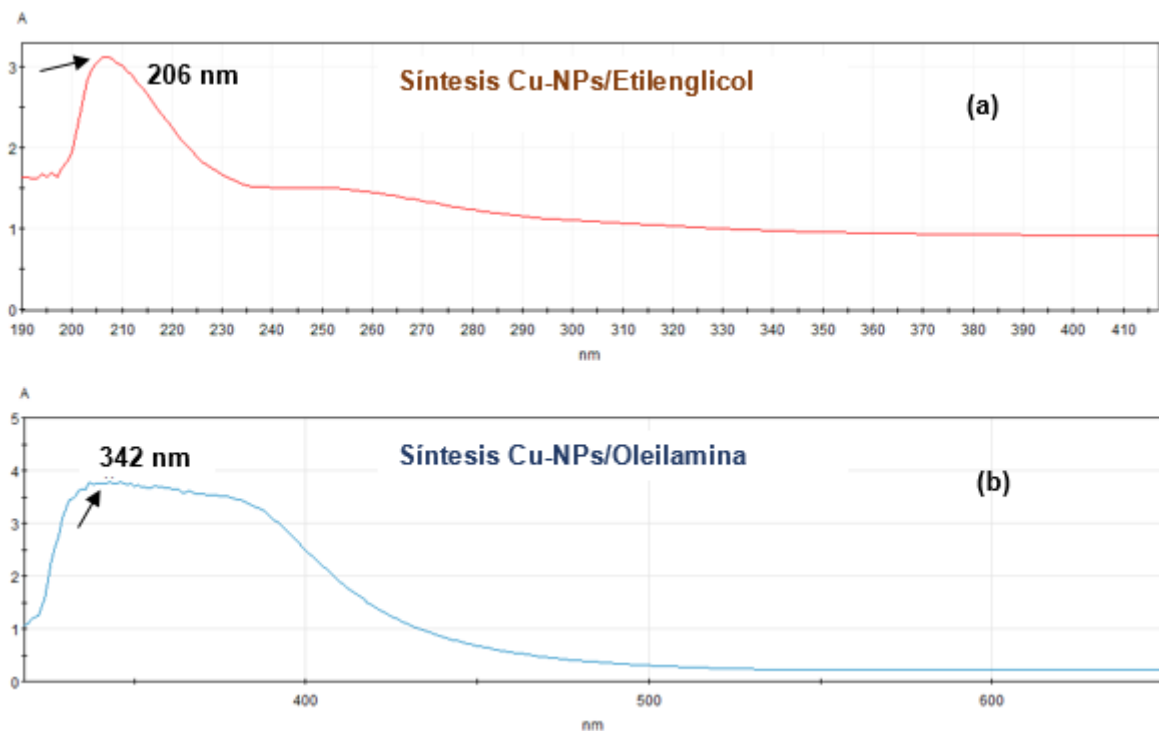


Figura 8. Espectro UV-Vis de síntesis Cu-NPs (a) empleando etilenglicol como solvente. Condiciones: 120 °C y 48 h, (b) empleando oleilamina como solvente. Condiciones: 200 °C y 24 h

- Capsaicina extraída a partir del ají rocoto

Curva de calibración de capsaicina

Con los patrones de 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 200, 300 y 400 mg/L se identificaron dos variables: la longitud de onda a la que la capsaicina absorbe la luz en la región ultravioleta y el rango de trabajo. La longitud de onda para los distintos patrones resultó ser de 281 nm, tal como reporta Solis, esta longitud de onda se asocia a la presencia de

un anillo bencénico en la estructura de la capsaicina (Solis Elizalde, 2008). El límite de sensibilidad de la técnica, es decir la mínima y máxima concentración en la cuales se pueden obtener valores verídicos en las pruebas del analito fueron de 5 mg/L para la concentración mínima y de 120 mg/L para la máxima concentración, dado que valores superiores resultaban en una pérdida de la linealidad de la curva de calibración. La linealidad se puede verificar mediante el coeficiente de correlación (R^2) obtenido de la construcción de la curva de calibración, el cual fue de $R^2=0,9999$. La curva de calibración de capsaicina se muestra en la Figura 9.

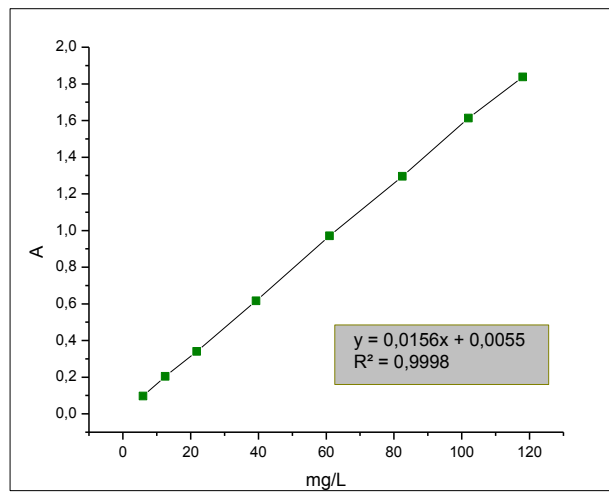


Figura 9. Curva de calibración de capsaicina.

Quantificación de capsaicina extraída a partir de ají rocoto

En la Tabla 12 se muestra la cantidad de capsaicina existente en cada prueba (P1 a P3), la mayor cantidad de capsaicina se registró en P3 correspondiente a las semillas del ají rocoto. Probablemente, el hecho de tratar semillas frescas, sin secar para el proceso de extracción, favorece al aumento en la concentración de capsaicina, dado que sin el tratamiento térmico se evita la degradación de los compuestos termolábiles del ají rocoto (Ahmed, Shivhare, & Debnath, 2002). Esto resultó útil para justificar la utilización del ají rocoto en la extracción, dado que las semillas son un residuo y se les está dando un valor agregado que puede emplearse con fines fúngicos.

Tabla 12. Quantificación de capsaicina en diferentes extractos de ají rocoto, antes de ser concentrados.

N° Prueba	Parte del ají	Concentración capsaicina (mg/L)
-----------	---------------	---------------------------------

1	Cáscaras	378,933
2	Fruto entero	266,592
3	Semillas	872,753

De la tabla 12 podemos concluir que el extracto a partir de las semillas del ají rocoto (P3) es el precursor que mayor cantidad de capsaicina presentó, además de entregar mayor % de extraíbles; por lo tanto, se realizó la concentración de dicho extracto mediante un rotaevaporador y luego se cuantificó la cantidad de capsaicina. De esta manera se obtuvo una concentración de 2134,65 mg/L (Tabla 13), empleando un factor de dilución $FD=30$ para lo cual se diluyó 1 mL del extracto de capsaicina con 29 mL de etanol. Este factor de dilución fue empleado debido a que la lectura de la concentración según la curva de calibración de capsaicina P.A. era muy alta y no se encontraba en límite de sensibilidad, por esto, se empleó dicho volumen de etanol hasta poder encajar la lectura a este límite. El extracto se empleó en las etapas posteriores del proyecto, que son la encapsulación de la capsaicina en nanofibras y en esferas de quitosano.

Tabla 13. Capsaicina contenida en extracto de ají rocoto a partir de semillas, luego de concentrar.

N° Prueba	Parte del ají	Concentración capsaicina (mg/L)
3	semillas	2134,65

Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

- Nanopartículas de Cobre

Síntesis Cu-NPs/Etilenglicol

En la Figura 10 se observan las micrográficas MET de las nanopartículas obtenidas en la síntesis de Cu-NPs/Etilenglicol. Aquí se puede apreciar que se aglomeran en formas largas (Figura 10a) y hay sectores de la muestra que están libres (color negro). De manera general, se observa una aglomeración de nanopartículas de forma esférica (Figura 10b), con un tamaño promedio de partículas, más o menos uniforme, de aproximadamente 12 nm y con un tamaño inferior de 8 nm y mayor de 24 nm (Figura 10 c).

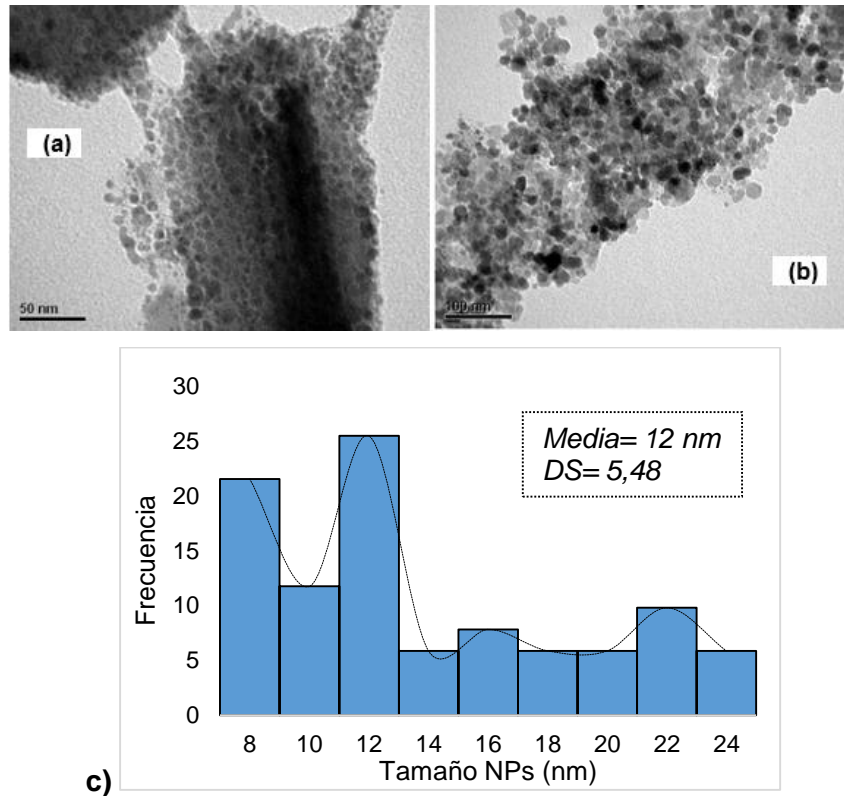


Figura 10. Micrografías MET de Cu-NPs. Síntesis Cu-NPs/Etilenglicol 48 h a 120 °C. (a) Cu-NPs aglomeradas formas largas (b) Cu-NPs distribuidas en la muestra aumento de 100 nm y (c) histograma de dispersión de tamaños de Cu-NPs

Síntesis Cu-NPs/Oleilamina

La micrografía MET (Figura 11 a y b) muestra nanopartículas aglomeradas que presentan una morfología cúbica y una distribución de tamaño con un tamaño promedio de 9 nm. Además, el patrón de difracción realizado muestra alta cristalinidad, lo que supone existencia de Cu-NPs (Figura 11 c).

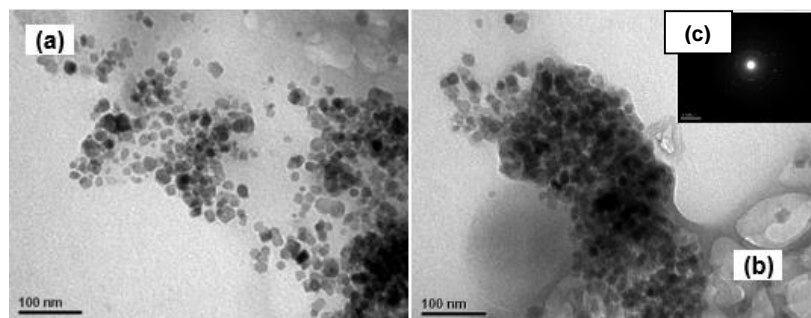


Figura 11. Micrografías MET de Cu-NPs. Síntesis Cu-NPs/Oleilamina 24 h 200 °C. (a) Cu-NPs aglomeradas (b) Cu-NPs distribuidas en la muestra aumento de 100 nm (c) Patrón de difracción de Cu-NPs.



Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (IRTF)

- Nanopartículas de Cobre

Se realizó el espectro de IRTF en Cu-NPs/Oleilamina debido a que esta síntesis presentó mayor porcentaje de Cu-NPs que la síntesis Cu-NPs/Etilenglicol y se emplearon estas nanopartículas (Cu-NPs/Oleilamina) para la inclusión en esferas y nanofibras de quitosano. En la Figura 12 se presenta el espectro de infrarrojo de Oleilamina (OAm) v/s espectro de Cu-NPs. El espectro de OAm sirvió para comparar las vibraciones que aparecen en el espectro de la OAm y asociarla con presencia de Cu-NPs.

Así se tiene que de acuerdo al espectro de Cu-NPs, se presenta un pico de absorbancia de aproximadamente a 1630 cm^{-1} , este pico corresponde al doble enlace C=C situado en la mitad de la molécula OAm (Figura 12). Los picos obtenidos a 1500 y 1300 cm^{-1} representan vibraciones de los enlaces C-H, CH_2 en el plano y CH_3 , el pico a 3000 y 3500 cm^{-1} quizás puede deberse a la interacción de los grupos amonio e hidroxilo y oxígeno, el cual es un centro rico en densidad electrónica debido a la presencia de dos pares de electrones sin aparear (Kanhed et al., 2014). En 1114 cm^{-1} aparece un pico estrecho que muestra la presencia de vibraciones debidas al grupo O-H. Además, existe un pico característico fuerte, ubicado en aproximadamente 625 cm^{-1} , este pico es referido a vibraciones del enlace Cu(I)-O, lo que indica presencia de Cu-NPs como lo reporta Khan (Khan, 2016). Un análisis en la región lejana de IR sería conveniente para determinar la interacción de la OAm y la presencia de las Cu-NPs (Cruzat Contreras et al., 2011).

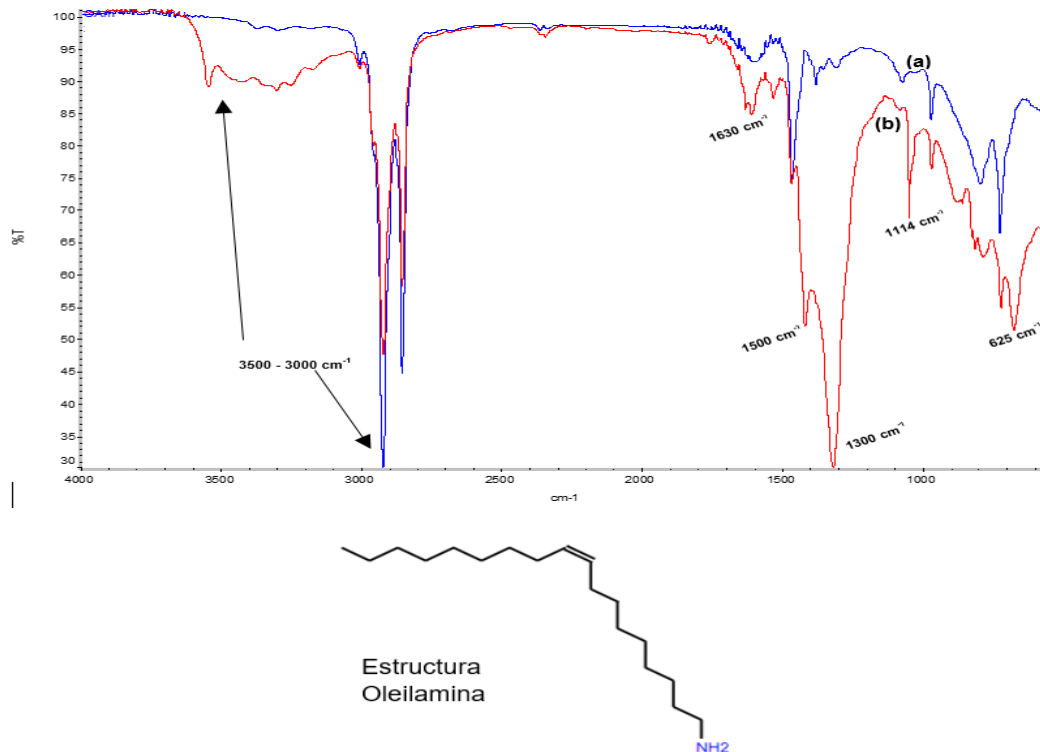


Figura 12. Espectro IRTF de Oleilamina (a) vs espectro IRTF de Cu-NPs (b). Síntesis 24 h, 200 °C. Parte inferior se muestra la estructura de la molécula de Oleilamina

- Capsaicina extraída a partir de ají rocoto

La caracterización de los grupos funcionales del extracto de ají rocoto se realizó en la muestra con mayor porcentaje de extraíbles y de mayor cantidad de capsaicina mediante la cuantificación por UV-Vis presentado anteriormente; es decir en la prueba P3 (extracto concentrado a partir de semillas de ají rocoto). En la Figura 13 se muestra el espectro IRTF para la capsaicina P.A., el cual fue empleado para comparar con el espectro infrarrojo del extracto de ají rocoto a partir de semillas obtenido por extracción Soxhlet.

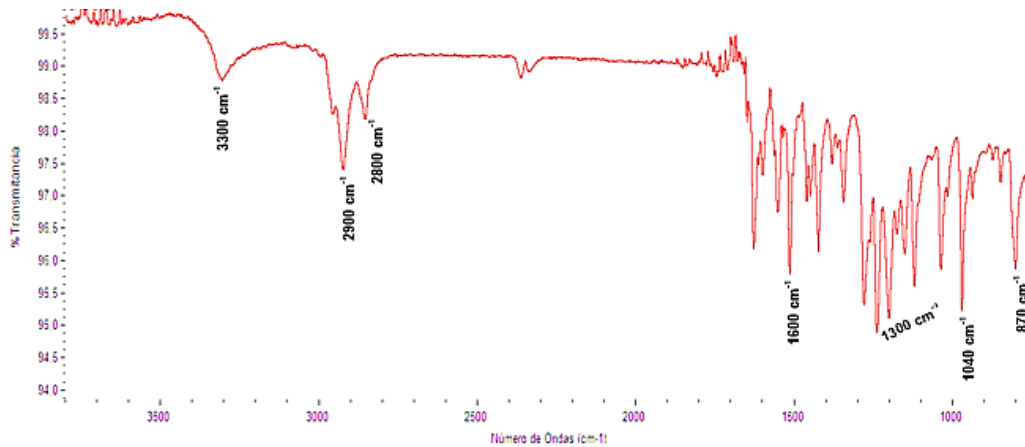


Figura 13. Espectro de infrarrojo de capsaicina P.A.

El espectro de infrarrojo del extracto a partir de semillas se presenta en la Figura 14. A $3333,34\text{ cm}^{-1}$ se observa una banda ancha provocada por el enlace -NH en el grupo amida, dicho grupo está compuesto de derivados de la capsaicina (Mejía Yanez, 2013)(Baldeón & Hernández, 2017); además, corresponde a la vibración del grupo -OH el cual absorbe en el rango de $3200\text{ a }3600\text{ cm}^{-1}$. El pico estrecho observado a $2973,48\text{ cm}^{-1}$ corresponde a la vibración del grupo -CH_2 de la cadena alifática (Baldeón & Hernández, 2017). La banda a $2888,45\text{ cm}^{-1}$ corresponde a vibraciones del enlace C-H en alquenos. La banda observada a $1657,45\text{ cm}^{-1}$ pertenece a la vibración del grupo C=O y N-H en amida secundaria (Chipantiza Quinatoa, 2017). Entre $1280,35$ y $1326,74\text{ cm}^{-1}$ se asocia a la tensión de C=C en compuestos aromáticos. Además, entre $1086,63$ y $1044,64\text{ cm}^{-1}$ se observan bandas angostas y de absorción intensa de grupos C-O, C-N (Barbero, 2007). Por último, el pico a $878,91\text{ cm}^{-1}$ se relaciona con los del grupo metoxilo que se encuentra como sustituyente en el anillo bencénico (Mejía Yanez, 2013).

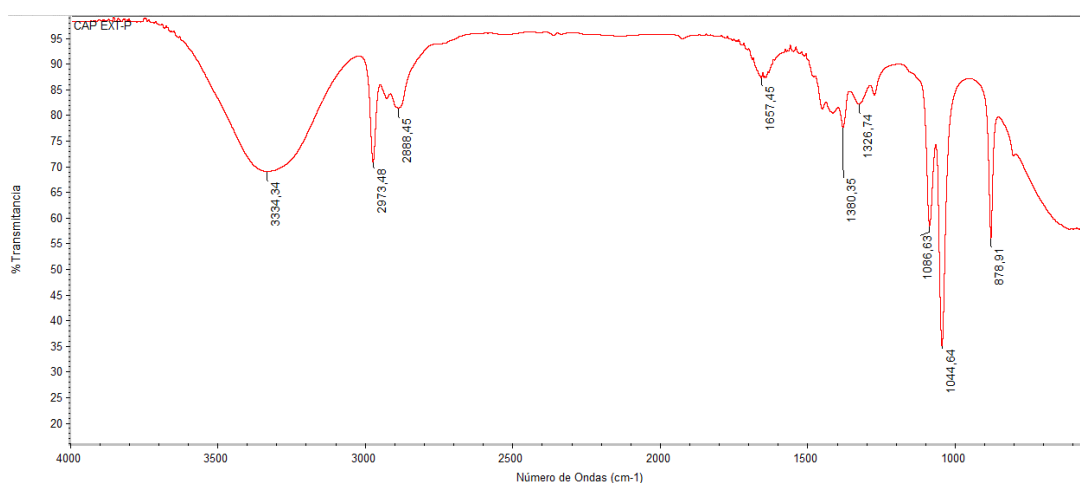


Figura 14. Espectro de infrarrojo del extracto de ají rocoto obtenido a partir de semillas.

- Esferas y nanofibras de quitosano dopadas con Cu-NPs/capsaicina

Los espectros IRTF de las esferas y nanofibras conteniendo Cu-NPs se realizaron para analizar las posibles interacciones entre las Cu-NPs y el quitosano.

En las Figuras 15 y 16 se muestran los espectros IRTF de las esferas y nanofibras puras de quitosano/capsaicina (Figura 15a y 16 a, respectivamente) y de las esferas y nanofibras dopadas con Cu-NPs al 1% P/P y 2% P/P (Figura 15b-15c y 16b-16c, respectivamente). Para el quitosano se observa una banda en 3784 cm^{-1} debido a la vibración combinada de los grupos amina primaria ($-\text{NH}_2$) y $-\text{OH}$ (Saharan et al., 2013), mientras que otro pico ubicado a 1582 cm^{-1} se relaciona con la acetamida ($-\text{CONH}_2$). Además, un pico ubicado a 1025 cm^{-1} se relaciona con el grupo OH (Figura 15 a) (K. Hernandez, 2014).

Por otro lado, las esferas y nanofibras dopadas con Cu-NPs (Figura 15b-15c y 16b-16c) mostraron picos similares, pero más agudos y desplazados a 1572 cm^{-1} y 1640 cm^{-1} , así como el pico correspondiente al OH a 3272 cm^{-1} , lo cual asume la quelación del cobre con el grupo OH y NH_2 (Prasad, Kumar, & Kumar, 2017) al inducir la redistribución de las frecuencias de vibración (Saharan et al., 2013) y asume la interacción entre ambos compuestos.

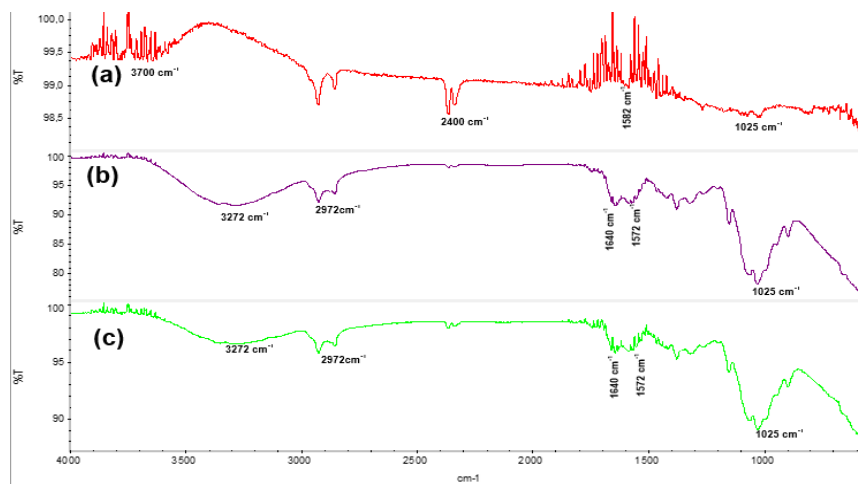


Figura 15. Espectro de Infrarrojo de esferas a) Quitosano/capsaicina, b) Quitosano/capsaicina/Cu-NPs-1%, c) Quitosano/capsaicina/Cu-NPs- 2%.

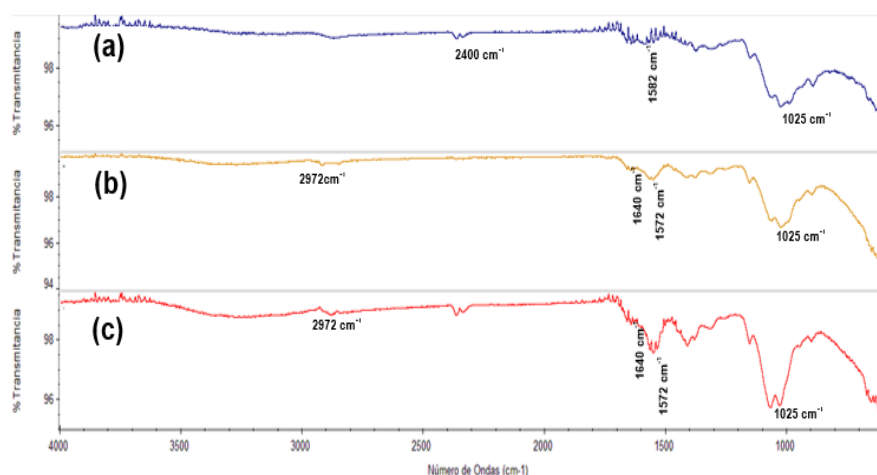


Figura 16. Espectro de Infrarrojo de nanofibras a) Quitosano/capsaicina, b) Quitosano/capsaicina/Cu-NPs-1%, c) Quitosano/capsaicina/Cu-NPs-2%

Microscopía Electrónica de Barrido

- Esferas

Esferas Quitosano/Capsaicina

En la Figura 17, se muestra la micrografía MEB de las esferas de quitosano incorporada con la capsaicina extraída de las semillas de ají rocoto. En la micrografía del lado izquierdo se puede apreciar que las esferas resultaron compactas, un tanto esféricas y de un tamaño aproximado a 1,25 mm, además en el lado derecho se observa la superficie de las esferas en donde se aprecia alta porosidad en la superficie, esta es comparable con lo obtenido por Chipantiza Quinatoa (Chipantiza Quinatoa, 2017).

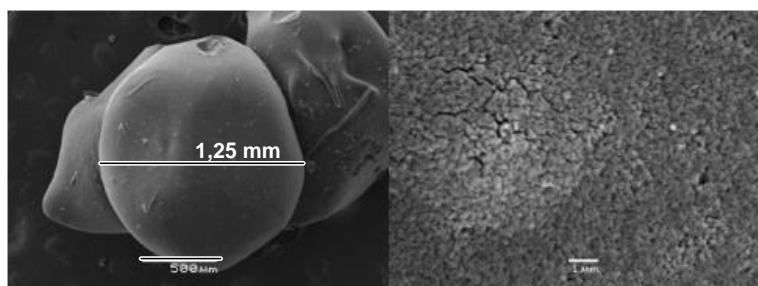


Figura 17. Micrografía MEB de esferas quitosano/capsaicina.

Esferas Quitosano/Cu-NPs

Las esferas obtenidas de quitosano dopadas con nanopartículas de cobre al 1% se observan en la Figura 18. Estas esferas muestran una superficie lisa con pocos poros (Prasad et al., 2017) y son de morfología irregular (Figura 18 a), no son esferas bien formadas, además el tamaño de las mismas corresponde a 1,2 mm como en el caso de las esferas cargadas con capsaicina. Adicionalmente, en la Figura 18 b, se presenta un

análisis elemental de Espectroscopia de Dispersión de Rayos X (EDX) de la superficie de las esferas (recuadro violeta) con el que se puede confirmar la presencia de cobre en dicha superficie; sin embargo, con este análisis elemental no se cuantifica la cantidad real de las Cu-NPs en las esferas, ya que es un análisis superficial (Cárdenas et al., 2009) (Cruzat, 2010).

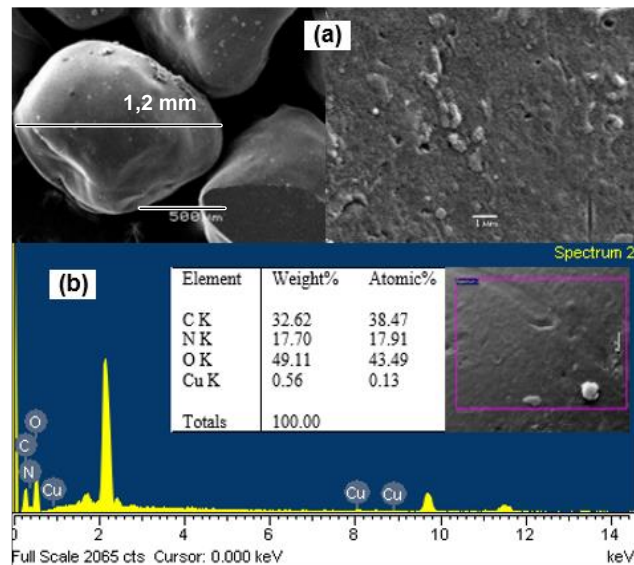


Figura 18. Micrografía MEB de esferas quitosano/Cu-NPs (1%).

Las esferas de quitosano dopadas con Cu-NPs al 2% se observan en la Figura 19, estas presentan una morfología no uniforme de forma ovalada, pero con una superficie ligeramente más porosa (Figura 19a) que las esferas dopadas con las Cu-NPs al 1%. El análisis elemental EDX de la muestra (Figura 19b), confirma la existencia de cobre en la superficie (recuadro violeta).

Se puede decir que tanto para la matriz con 1% y 2% de Cu-NPs, las nanopartículas se incorporaron fácilmente en la solución de quitosano, posiblemente debido a las interacciones electrostáticas, producidas por la naturaleza catiónica del quitosano en solución y los electrones libres de las nanopartículas de cobre. Además, el enlace de hidrógeno y la hidrofiliidad del quitosano es una característica apropiada para la incorporación y dispersión de Cu-NPs dentro de la matriz (Cárdenas et al., 2009).

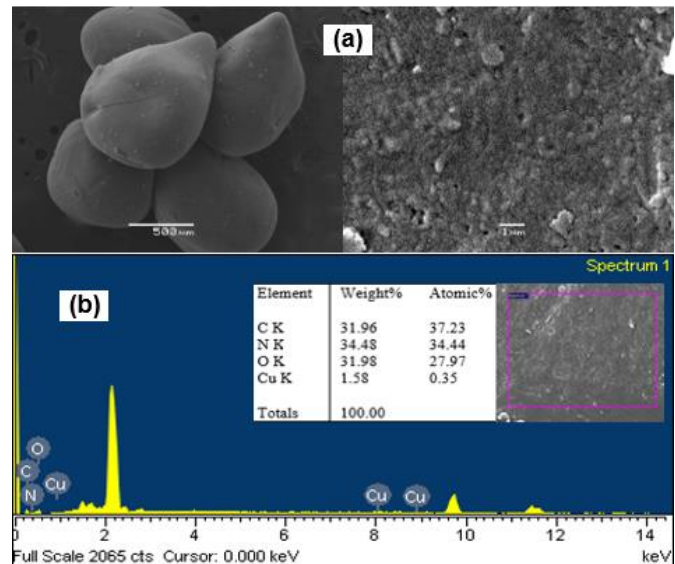


Figura 19. Micrografía MEB de esferas quitosano/Cu-NPs (2%)

Esferas Quitosano/Capsaicina/Cu-NPs

En la Figura 20 a, se muestra la micrografía de las esferas de quitosano al incorporar capsaicina y Cu-NPs, se puede apreciar que tienen una morfología casi esférica y una superficie porosa, la cual comparada a la superficie de las esferas de matriz doble (quitosano/Cu-NPs) tienden a formar más poros de manera similar que las esferas quitosano/capsaicina. En la Figura 20 b se presenta el análisis elemental de las esferas, que muestra la existencia de cobre en la superficie de las esferas (recuadro violeta), con lo cual se puede afirmar la incorporación de cobre en el quitosano a través de este método de encapsulación.

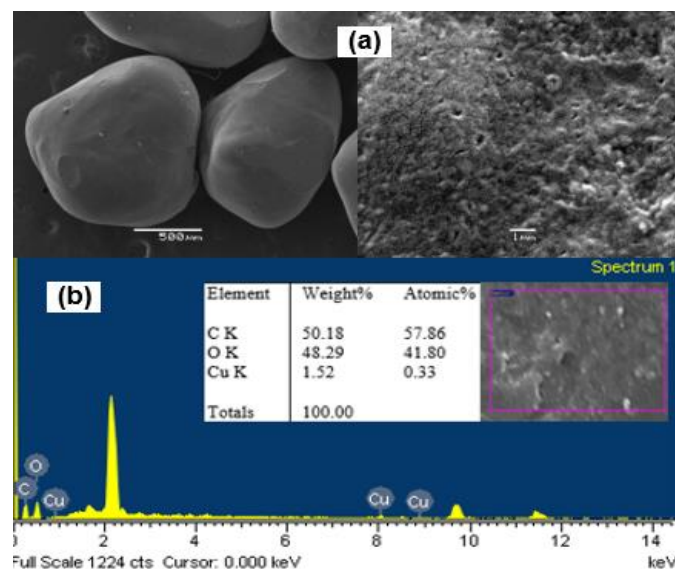


Figura 20. Micrografía MEB de esferas quitosano/capsaicina/Cu-NPs (2%)

- Nanofibras

Nanofibras de matriz doble

En las Figuras 21 y 22 se observan las imágenes MEB de las muestras de solución polimérica de quitosano/ capsaicina (2% V/V) y quitosano/Cu-NPs (1 % P/P), luego de ser electrohiladas. Para ambos casos, se observan partículas aglomeradas de forma esférica en su mayoría, mismas que se encuentran formando aglomeraciones que se conectan por fibras. Sin embargo, no se pudo obtener nanofibras, al contrario, lo que se obtuvo fueron mezclas de gotas con algunas estructuras fibrosas.

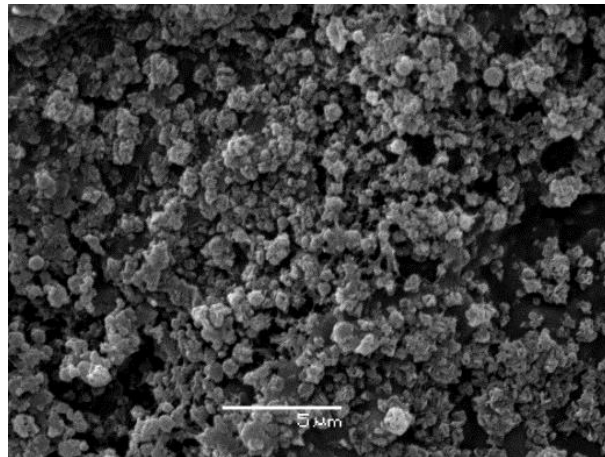


Figura 21. MEB de nanofibras de matriz doble: quitosano/capsaicina.

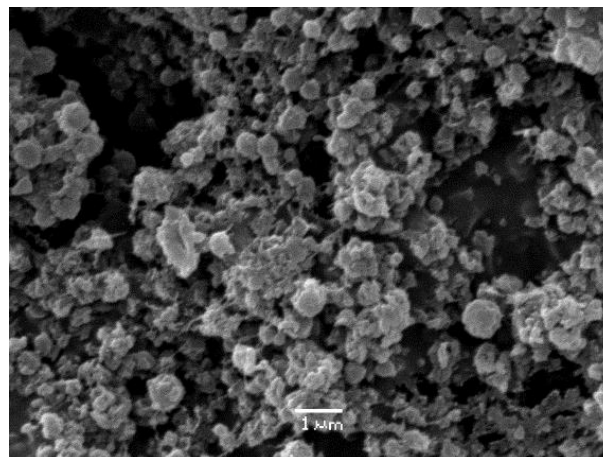


Figura 22. MEB de nanofibras de quitosano de matriz doble: quitosano/Cu-NPs.

Nanofibras de matriz triple

En la Figura 23, se observan los análisis MEB de las nanofibras de matriz triple, Quitosano/Capsaicina/Cu-NPs (1% P/P) y Quitosano/Capsaicina/Cu-NPs (1% P/P). De igual manera que las nanofibras de matriz dobles presentadas previamente, se observan que no se logró formar nanofibras, sin embargo, sí se formaron aglomeraciones de

partículas de la matriz triple interconectadas mediante estructuras fibrosas que se reparten a lo largo de toda la composición, aunque dichas aglomeraciones son menos regulares que las de la matriz doble. En ambos casos se observan que las partículas son de forma esférica y si comparamos el tamaño de las aglomeraciones en ambas Figuras (Figura 23 a y 23 b), se puede concluir que en ambas matrices el tamaño es relativamente similar.

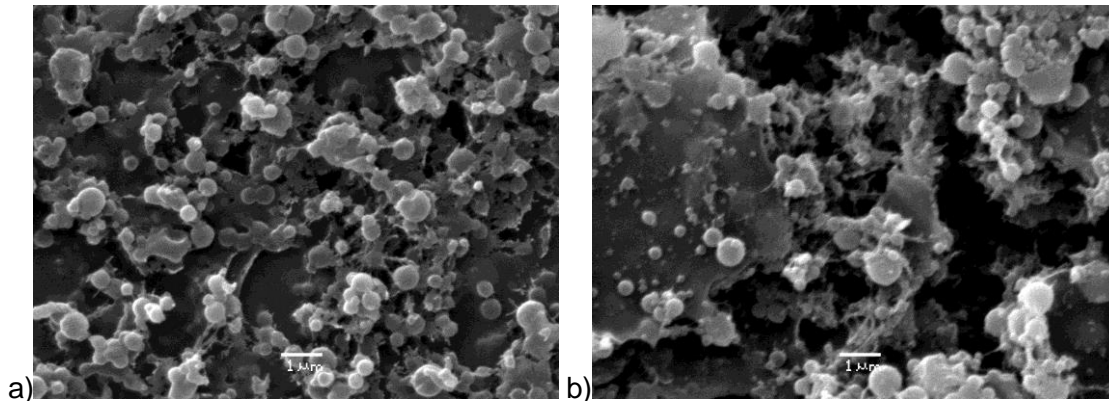


Figura 23. MEB de nanofibras de matriz triple quitosano/capsaicina dopadas con (a) Cu-NPs (1% P/P) y (b) Cu-NPs (2%).

La viscosidad es un factor importante, dado que el diámetro de la fibra aumenta con la viscosidad de la solución (Matthew G. McKee, Garth L. Wilkes, Ralph. H. Colby, & Timothy E. Long*, 2004). La variación en la viscosidad de una a otra solución polimérica cuando se incorporó Cu-NPs del 1 % al 2 % no provocó cambios significativos en cuanto a morfología y tamaño, lo que sí provocó fue una menor cantidad de estructuras fibrosas que conectan las aglomeraciones, lo cual puede explicarse al aumento de la carga de nanopartículas en la solución polimérica afectando la viscosidad de la solución, la cual fue muy alta para generar fibras continuas afectando al chorro que fue esprayado en el momento del proceso de electrospinning (Okutan, Terzi, & Altay, 2014).

En el proceso de electrospinning, también influye en la morfología y el diámetro de las fibras factores como el voltaje aplicado, la velocidad de la bomba y la distancia de la jeringa a la pantalla del colector, que dependiendo de su control adecuado, van a formar estructuras de nanofibras en mayor o menor cantidad (Asmatulu & Khan, 2019). Según Deitzel y colaboradores, es evidente que existe un rango óptimo de intensidades de campo eléctrico para un determinado sistema de polímero/solvente, ya que un campo demasiado débil o demasiado fuerte conducirá a la formación de fibras moldeadas (Deitzel, Kleinmeyer, Harris, & Beck Tan, 2001), es así que voltaje aplicado en nuestro proceso quizás pudo incidir en la formación de los aglomerados, ya que a medida que se incrementó el voltaje aplicado, el volumen de la caída disminuyó hasta que se formó

el cono de Taylor en la punta del capilar, lo que se asoció con un aumento en los defectos de las aglomeraciones observadas entre las fibras electrohiladas (Sill & von Recum, 2008). Por último, la distancia del capilar hacia el colector pudo ser otro factor importante, dado que a medida que esta distancia es menor, se obtienen fibras defectuosas con partículas aglomeradas lo que puede atribuirse a un secado inadecuado de la fibra polimérica antes de alcanzar el colector (Sill & von Recum, 2008) (Megelski, Stephens, Bruce Chase, & Rabolt, 2002).

Ensayos de Liberación y modelos matemáticos

Para todos los ensayos de liberación se cuantificó la cantidad de capsaicina o de Cu-NPs liberadas a partir de las esferas y nanofibras empleando la curva de calibración de capsaicina y cobre elaboradas (Figura 24) y analizando las alícuotas tomadas a diferentes intervalos de tiempo durante el ensayo.

Curva de calibración de cobre

Con los patrones de 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320, 360 mg/L se determinó la longitud de onda del complejo tetraaminocobre (II) $[(\text{Cu}(\text{NH}_3)_4)]^{2+}$ (cuya formación se explicó en la metodología), esta longitud de onda fue de 605 nm. A partir de esta longitud de onda se construyó la curva de calibración de cobre. La linealidad se puede verificar mediante el coeficiente de correlación (R^2) obtenido de la construcción de la curva, el cual fue de $R^2=0,9987$. La curva de calibración de cobre obtenida se muestra en la Figura 24.

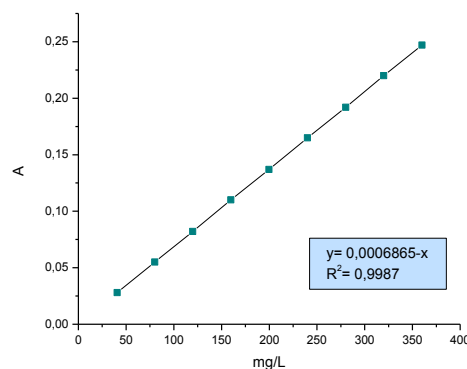


Figura 24. Curva de calibración de complejo de cobre.

Liberación y modelos cinéticos de capsaicina a partir de esferas y nanofibras

- Matriz Quitosano/capsaicina

Esferas

La liberación de capsaicina a partir de esferas quitosano/capsaicina se puede apreciar en la Figura 25. La liberación de pequeñas concentraciones de capsaicina empieza a las 4 horas de iniciado el ensayo y a medida que transcurre el tiempo se observa un incremento en la concentración de capsaicina liberada, llegando a tener un máximo de 5 mg/L (100 % de liberación) en el tiempo de 96 horas (5 días).

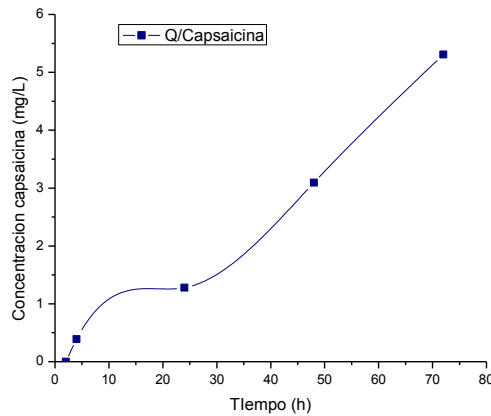


Figura 25. Ensayo de liberación capsaicina. Esferas Matriz doble: Quitosano/Capsaicina

Nanofibras

La liberación de capsaicina a partir de nanofibras se muestra en la Figura 26, aquí se puede observar una liberación controlada y gradual de la capsaicina a partir de la matriz, llegando a una concentración máxima de 4 ppm (90 % de liberación) de capsaicina en 45 minutos. Al igual que en las esferas de quitosano, se tuvo un mecanismo de difusión que permitió a la capsaicina migrar desde el interior de las fibras hacia el medio acuoso.

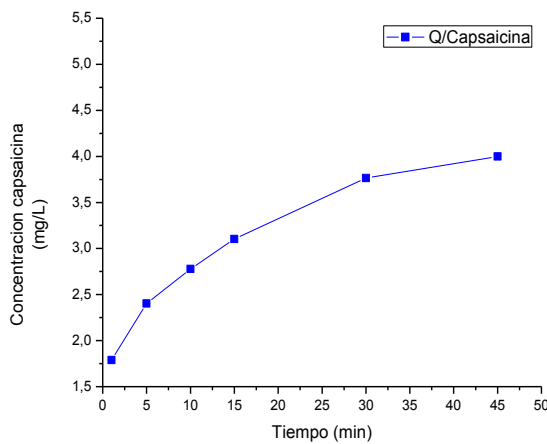


Figura 26. Liberación de capsaicina a partir de nanofibra: quitosano/capsaicina

Los perfiles de liberación de capsaicina a partir de esferas y nanofibras de quitosano son similares, en ambos casos se pudo liberar controladamente y cuantificar casi la totalidad de la capsaicina incorporada teóricamente, lo que sugiere que tanto esferas como nanofibras de quitosano son aptas para una liberación controlada de capsaicina. La diferencia radical en los experimentos fue que la liberación total de la cantidad de capsaicina en las nanofibras se efectuó en un tiempo de 45 minutos, mientras que para las esferas de quitosano/capsaicina se efectuó la liberación en 5 días aproximadamente, por esta razón, se decidió ajustar los datos experimentales obtenidos en los dos modelos aplicados, a la liberación de componentes a partir de una matriz polimérica (modelo de Higuchi y de Korsmeyer y Peppas) para aproximar cuál sería la cinética que sigue proceso de liberación de capsaicina. Los resultados que se obtuvieron se presentan en la Tabla 14 y las gráficas cinéticas ajustadas de esferas y nanofibras en la Figuras 27 y 28, respectivamente.

Tabla 14. Parámetros cinéticos del ajuste de la liberación de Capsaicina desde esferas y nanofibras a modelos Higuchi y Korsmeyer y Peppas

	Higuchi		Korsmeyer y Peppas	
	K	R ²	R ²	n
Esferas Quitosano/Capsaicina	0,1389	0,9015	0,9733	0,8017
Nanofibras Quitosano/Capsaicina	0,0986	0,9854	0,9949	0,1995

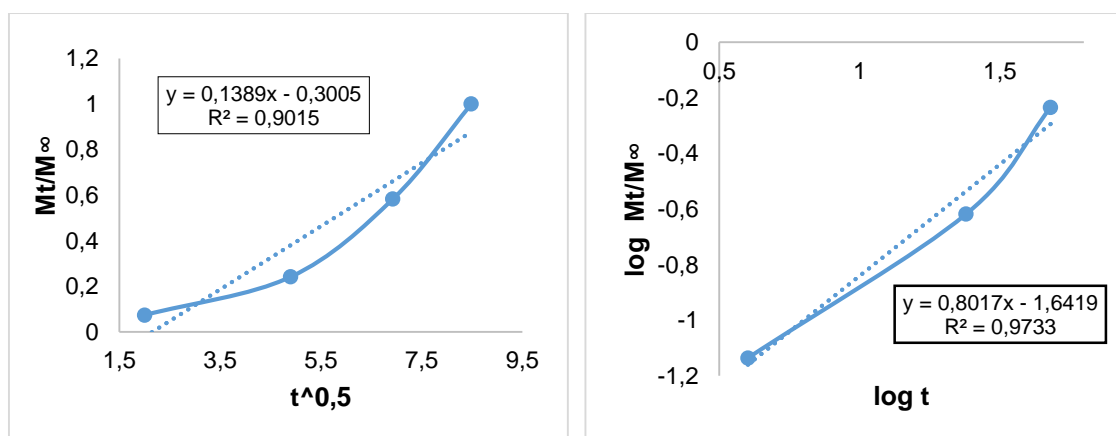


Figura 27. Ajuste de datos de liberación de capsaicina desde esferas al modelo (izquierda) Higuchi y (derecha) Korsmeyer y Peppas

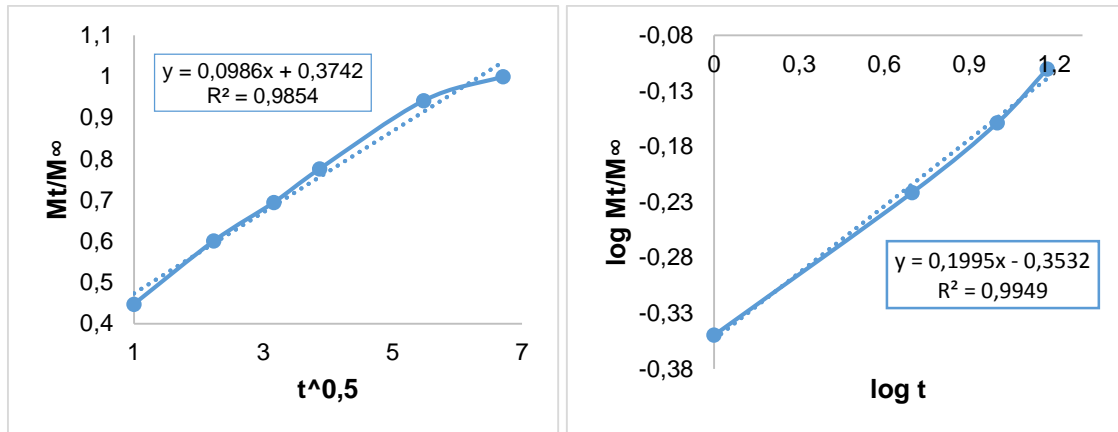


Figura 28. Ajuste de datos de liberación de capsaicina desde nanofibras al modelo (izquierda) Higuchi y (derecha) Korsmeyer y Peppas

Se evidencia en los perfiles de liberación, tanto que para esferas y nanofibras, se ajustan mejor al modelo de Korsmeyer y Peppas ($R^2= 0,9733$ y $R^2= 0,9916$ para esferas y nanofibras, respectivamente) (Tabla 14). Además, para el caso de las esferas de quitosano, se obtuvo un $n= 0,8017$, lo que significa que la liberación fue controlada por un mecanismo de tipo no Fickiano; es decir se presentó una erosión (hinchamiento de la matriz) de las esferas, lo cual hace que la liberación sea menos controlada que en las nanofibras, debido a un fenómeno de relajación de las cadenas poliméricas a causa del hinchamiento de la matriz polimérica (Kim et al., 2011) (Certuche, 2017).

El valor de n correspondiente a nanofibras es menor ($n= 0,1995$) que las esferas, esto indica que, procesos simultáneos al de difusión ocurrieron, como en el trabajo de Aragón y colaboradores, en donde al tratarse de materiales porosos, se combina un mecanismo de difusión parcial seguido de la degradación de la matriz por el ingreso de agua a los poros existentes (Sáez et al., 2004)(Aragón-Fernández, González-Santos, & Fuentes Esteves, 2010).

Liberación de Cu-NPs a partir de esferas

- Matriz doble: Quitosano/Cu-NPs (1 y 2 %)

En la Figura 29 se puede observar la cantidad de Cu-NPs liberadas en función del tiempo. La liberación en medio acuoso de esferas de quitosano conteniendo 1% P/P de Cu-NPs no arrojó cantidad liberada de Cu-NPs, lo que se puede explicar por la superficie poco porosa observada en el MEB, mientras que para las esferas con 2% P/P de Cu-NPs se observó que en el tiempo inicial (8h) se liberó una gran cantidad de nanopartículas (12,5 ppm - 40 % de la cantidad inicial), pero luego de esta liberación, la cantidad de Cu-NPs disminuyó drásticamente siendo estable y constante.

Con respecto a la matriz conteniendo 2% P/P de Cu-NPs se puede mencionar que se trata de un mecanismo cinético bifásico, en donde la liberación fue primero por un efecto de explosión inicial, en donde la muestra libera grandes cargas del componente, principalmente de la superficie de las esferas, que probablemente se debió a la liberación de las Cu-NPs no incorporadas y luego, se presentó un comportamiento de adaptación y difusión, en donde la matriz luego de tener contacto con el medio acuoso resultó en un ligero hinchamiento, permitiendo la difusión de las Cu-NPs hacia el medio acuoso (Dini, Alexandridou, & Kiparissides, 2003).

Mientras que la nula liberación de la matriz conteniendo 1 % P/P de Cu-NPs se puede explicar por el tratamiento post sintético de lavado que se le realizó a las esferas para neutralizar su pH, ya que posiblemente la cantidad añadida de Cu-NPs no pudo incorporarse a la matriz, quedando aglomeradas en gran parte en la superficie, las cuales fueron lavadas y se perdieron (Cruzat, 2010).

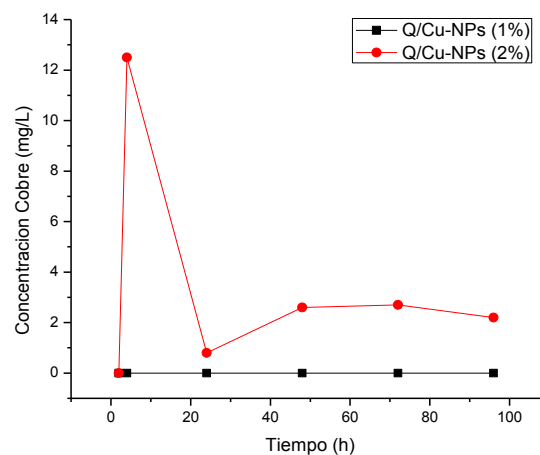


Figura 29. Ensayo de liberación de Cu-NPs. Esferas Matriz doble: Quitosano/Cu-NPs (1 y 2%).

- Matriz Triple: Quitosano/capsaicina/Cu-NPs (1 y 2%)

La liberación de Cu-NPs a partir de esferas de matriz triple se puede observar en la Figura 30. En las esferas dopadas con el 1% P/P de Cu-NPs se observó liberación solo a las 96 horas (5 días), correspondiente a 4,44 ppm; mientras que para las esferas con un 2 % P/P de Cu-NPs la liberación se dio a las 2 horas, pero la cantidad final liberada es pequeña (0,36 ppm) y luego de este tiempo la liberación fue completamente nula.

Este tipo de liberación es similar al comportamiento del perfil de liberación de Cu-NPs desde nanocompuestos con aplicaciones biocida obtenido en los trabajos de Tamayo

y Mallick, quienes determinaron que la liberación de Cu-NPs es muy lenta y que apenas a los 5 días se observó una cantidad de Cu-NPs presentes en el medio de liberación acuoso la cual fue de 46 ppm a partir de una concentración de 130,84 $\mu\text{g/mL}$ (Tamayo et al., 2016) (Mallick et al., 2012).

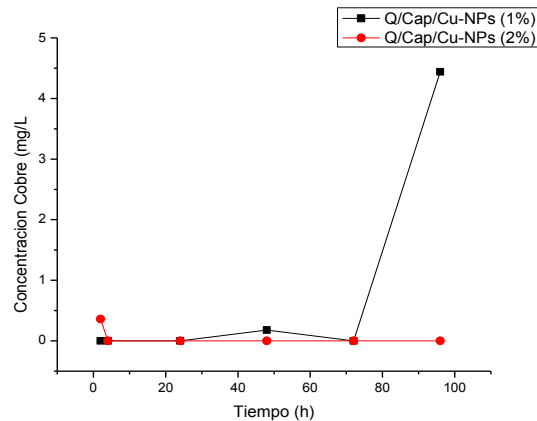


Figura 30. Ensayos de liberación de Cu-NPs. Esferas Matriz triple: Quitosano/Capsaicina/ Cu-NPs (1 y 2 %)

Liberación de Cu-NPs a partir de nanofibras

- Matriz quitosano/Cu-NPs

A continuación, en la Figura 31 se presenta la curva de liberación de Cu-NPs a partir de nanofibras de quitosano en función del tiempo. Se observa que las Cu-NPs fueron liberadas gradualmente, resultado similar al comportamiento reportado por Almasi en donde asume el comportamiento asociado a la capacidad del quitosano como matriz estable y a su fuerte interacción con las Cu-NPs (Almasi et al., 2018).

Este comportamiento se puede explicar, como menciona Tamayo en su estudio, por la eficacia de los nanocompuestos de polímero-metal que mejora con una alta relación superficie-volumen, lo que aumenta los números de iones liberados de las nanopartículas en el polímero (Tamayo et al., 2016). Además, estudios realizados por Damm & Münstedt, indican que la concentración de Cu-NPs liberada a partir de nanocompuestos basados en quitosano es el triple en comparación a otros nanocompuestos debido a la estructura y polaridad del quitosano para incorporar de mejor manera metales y además el quitosano al ser un polímero hidrofóbico permite que el mecanismo que gobierna la liberación sea la difusión desde la matriz (Damm & Münstedt, 2008). La curva de liberación obtenida es similar a las reportadas por Hahn, en donde se asevera que la liberación también se debe a un proceso de difusión y se acomoda a una liberación de primer orden en donde la concentración de cobre aumenta

con el tiempo, pero de una manera no lineal, salvo en el primer tramo de liberación. (Hahn, Brandes, Wagener, & Barcikowski, 2011).

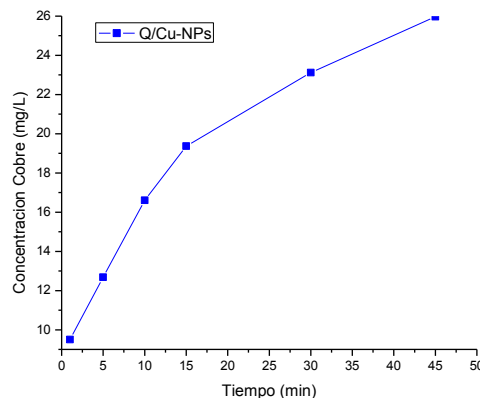


Figura 31. Liberación de cobre a partir de nanofibra quitosano/Cu-NPs

- Matriz Quitosano/Capsaicina/Cu-NPs (1 y 2 % P/P)

Las curvas de liberación de Cu-NPs a partir de nanofibras de matriz triple con 1 y 2 % P/P de Cu-NPs se presenta en la Figura 32, en ambas curvas se puede observar que, al iniciar el ensayo, la cantidad de Cu-NPs incrementa rápidamente hasta un valor de 11 ppm para el 1% P/P de Cu-NPs y 6 ppm para el 2% de Cu-NPs, respectivamente y luego estas cantidades disminuyen notablemente a partir de los 10 minutos en ambas curvas aproximadamente hasta la mitad de la concentración máxima, desde donde la cantidad liberada se vuelve más o menos estable. También se observa que la liberación es rápida en las nanofibras dopadas al 2 % de Cu-NPs.

Estos dos comportamientos obedecen lo siguiente, a la mayor inclusión de Cu-NPs, mayor será la liberación del compuesto activo en cada matriz, que si bien, en este caso no es grande, (del 1 al 2% P/P), pero sí influye en la cantidad liberada. Además, podría tener relación a que la razón para una liberación máxima al inicio del ensayo en ambas matrices es debido a la disolución de las Cu-NPs presentes, en su mayoría, en la superficie de las nanofibras en lugar de encontrarse al interior de la matriz (Sill & von Recum, 2008) quizás asociado a que en el proceso de electrohilado el solvente no se evaporó totalmente, da lugar a aglomeraciones de Cu-NPs, lo cual hace que a tiempos iniciales se libere la mayor cantidad de estas nanopartículas al medio de liberación (Cioffi et al., 2004)

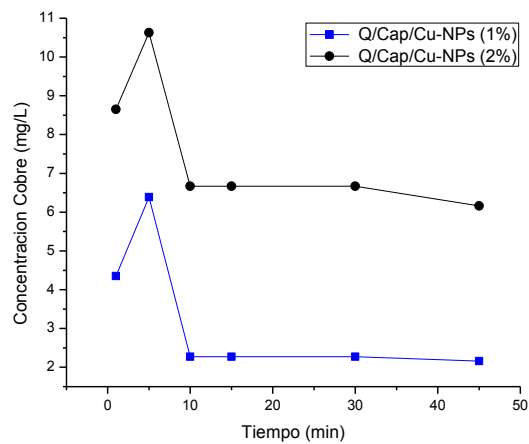


Figura 32. Ensayos de liberación de cobre. Nanofibra: Quitosano/Capsaicina/ Cu-NPs (1 y 2 %)

Cinética de liberación de Cu-NPs a partir de nanofibras de quitosano

Dado que se obtuvieron datos más congruentes y una mejor tendencia de liberación controlada de las Cu-NPs a partir de las nanofibras, se decidió ajustar los datos experimentales obtenidos a los dos modelos aplicados a la liberación de componentes a partir de una matriz polimérica (modelo de Higuchi y de Korsmeyer y Peppas) para aproximar cuál sería la cinética que sigue el proceso de liberación. Los resultados que se obtuvieron se presentan en la Tabla 15 y las gráficas cinéticas correspondientes a nanofibras en la Figura 33.

Tabla 15. Parámetros cinéticos del ajuste de la liberación de Cu-NPs desde nanofibras a modelos Higuchi y Korsmeyer y Peppas

	Higuchi		Korsmeyer y Peppas	
	k	R ²	R ²	n
Nanofibras Q/Cu-NPs	0,0915	0,9368	0,9544	0,214

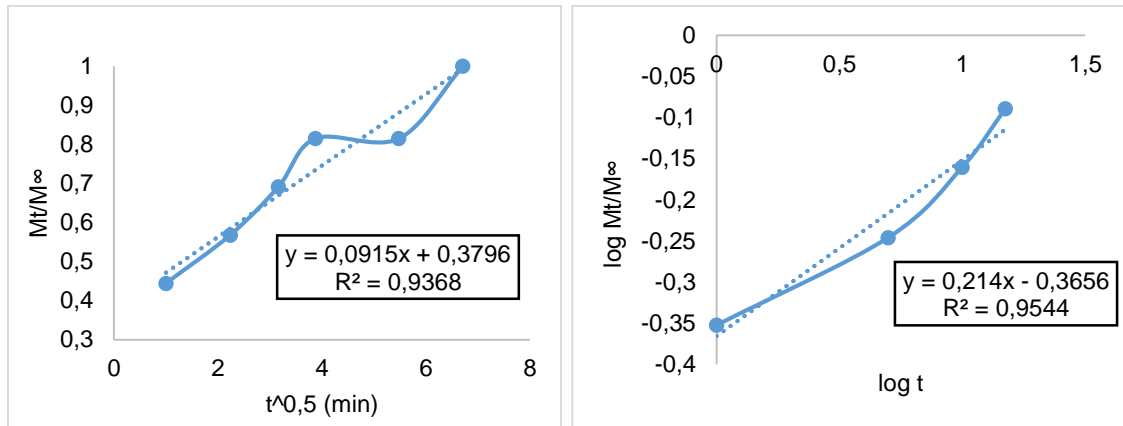


Figura 33. Ajuste de datos de liberación de Cu-NPs desde nanofibras dobles al modelo (izquierda) Higuchi y (derecha) Korsmeyer y Peppas.

Se observa que la liberación de Cu-NPs se ajusta mejor al modelo de Korsmeyer y Peppas ($R^2= 0,9544$), además se presenta un $n= 0,214$, esto indica que se combinó un mecanismo de difusión parcial seguido de la degradación de la matriz por el ingreso de agua a los poros existentes, al igual a lo ocurrido con la liberación de capsaicina a partir de nanofibras (Sáez et al., 2004)(Aragón-Fernández et al., 2010).

Finalmente, como continuación de este trabajo, se han realizado ensayos preliminares de inhibición contra ciertos microorganismos empleando las matrices obtenidas en este trabajo. Estos ensayos han sido llevados a cabo por miembros de la Facultad de Agronomía, quienes son los responsables de dar continuación y potenciar el trabajo aquí presentado. A continuación, en la Figura 34, se muestra una prueba de la eficacia de las matrices quitosano/capsaicina y quitosano/capsaicina/Cu-NPs, para inhibir ciertos microorganismos y ser empleados a futuro como posibles fungicidas y se demuestra que los resultados son prometedores.

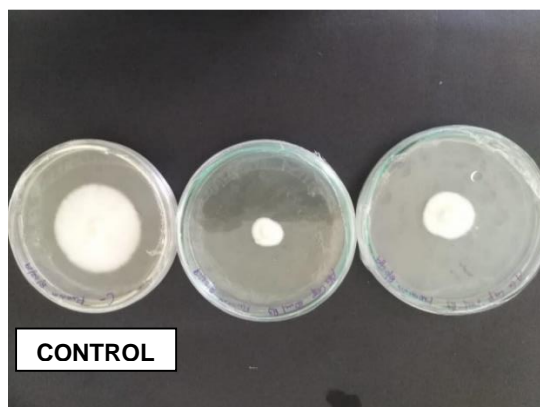


Figura 34. Inhibición de *Fusarium* por quitosano/capsaicina



CONCLUSIONES

Se obtuvieron Cu-NPs a través de las dos síntesis solvotermal planteadas, la síntesis óptima con la que se obtuvieron nanopartículas en polvo (0,4 g) fue el experimento N° 3, Cu-NPs/Oleilamina con las siguientes condiciones: tiempo de reacción de 24 horas, temperatura de 200° C y lavado con acetona. Las nanopartículas presentaron un tamaño de 9 nm y morfología cúbica.

Se extrajo la capsaicina a partir del ají rocoto (*Capsicum Pubescens*) mediante el método Soxhlet. El mejor % de extraíbles resultó de las semillas del ají, con un % de extraíbles de 30,64 % y el volumen obtenido fue 50 mL con una concentración de 2134 ppm.

Se incorporaron las Cu-NPs sintetizadas, en esferas y nanofibras mediante el método de gelificación iónica y electrospinning, respectivamente. Las esferas presentaron un tamaño de 1,25 mm y estructura porosa con Cu-NPs presentes en su estructura, mientras que las nanofibras resultaron en aglomerados de partículas interconectadas por fibras de tamaño inferior.

Los ensayos de liberación de capsaicina a partir de esferas y estructuras fibrosas fueron similares en cuanto a tendencia, pero la principal diferencia radicó en que la liberación de la cantidad de capsaicina incorporada se liberó más rápido desde las nanofibras (45 min) que desde las esferas (5 días). Además, la cinética de liberación de capsaicina de estas matrices (esferas y nanofibras), se ajustó al modelo de Korsmeyer y Peppas con un $R^2=0,9733$ y $R^2= 0,9949$, indicando que en las esferas siguieron un mecanismo de tipo no Fickiano; (hinchamiento de la matriz) y, en las nanofibras ocurrió una difusión parcial seguida de la degradación de la matriz de quitosano. Por último, los ensayos de liberación de las Cu-NPs fueron más controlados a partir de las estructuras fibrosas. Es así que, se obtuvo un perfil de liberación ajustado al modelo de Korsmeyer y Peppas con un $R^2= 0,9544$, lo cual indicó que el mecanismo de liberación también se dio por difusión parcial seguido de la degradación de la matriz de quitosano.

Finalmente, se concluye que los objetivos planteados en este trabajo se cumplieron a cabalidad y generaron buenos resultados que serán potencializados a futuro mediante los estudios de inhibición correspondientes a la continuación del proyecto.



RECOMENDACIONES

Mejorar el lavado y purificación de las Cu-NPs para su mejor incorporación y dispersión en las matrices, tanto en esferas como estructuras fibrosas.

Evaluar la influencia de factores como viscosidad de solución polimérica, distancia de la aguja al colector y voltaje en la formación de nanofibras mediante electrospinning, para obtener mejor estructura y superficie.

Realizar los ensayos de liberación a partir de nanofibras y esferas, modificando parámetros como pH y agitación, para determinar el cambio en la cinética de liberación que sigue dicha modificación.

Evaluar las propiedades fúngicas de los compuestos obtenidos, esto es, Cu-NPs, así como las distintas matrices y soluciones obtenidas (esferas y estructuras fibrosas).

**BIBLIOGRAFÍA**

- Ahmed, J., Shivhare, U. S., & Debnath, S. (2002). Colour degradation and rheology of green chilli puree during thermal processing. *International Journal of Food Science and Technology*, 37(1), 57–63. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00532.x>
- Almasi, H., Jafarzadeh, P., & Mehryar, L. (2018). Fabrication of novel nanohybrids by impregnation of CuO nanoparticles into bacterial cellulose and chitosan nanofibers: Characterization, antimicrobial and release properties. *Carbohydrate Polymers*, 186, 273–281. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.01.067>
- Alves, N. M., & Mano, J. F. (2008). Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43(5), 401–414. <https://doi.org/10.1016/j.jat.2018.05.004>
- Aragón-Fernández, J., González-Santos, R., & Fuentes Esteves, G. (2010). Estudio in vitro de liberación de fármacos desde un biomaterial compuesto Study in vitro of delivery drug from a compound biomaterial Centro Nacional de Investigaciones Científicas , Ave 25 , Esq . 58 , Apartado Postal Centro de Biomateriales , Universida. *Revista CENIC. Ciencias Químicas ISSN.:*, 41, 1–8.
- Arriola, E., Román, A., Soto, K., Rincón, J., Mendoza, S., García, N., ... Rodríguez, A. (2017). *Tecnologías De Nano/Microencapsulación De Compuestos Bioactivos*. Retrieved from http://ciatej.mx/libros_ciatej/TECNOLOGÍAS_DE_NANO-MICROENCAPSULACIÓN_DE_COMPUESTOS_BIOACTIVOS.pdf#page=176
- Asmatulu, R., & Khan, W. S. (2019). Electrospun nanofibers for agriculture and food industries. *Synthesis and Applications of Electrospun Nanofibers*, 89–109. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813914-1.00005-5>
- Baldeón, S., & Hernández, W. (2017). Identificación de la capsaicina y la deshidrocapsaicina en el extracto de oleoresina obtenido a partir del ají panca (*Capsicum chinense*). *Ingeniería Industrial*, 35, 223–237.
- Barbero, G. F. (2007). Extracción, análisis, estabilidad y síntesis de capsaicinoides, 49,82.
- Betancourt-Galindo, R., Reyes-Rodríguez, P. Y., Puente-Urbina, B. A., Avila-Orta, C. A., Rodríguez-Fernández, O. S., Cadenas-Pliego, G., ... García-Cerda, L. A. (2014). Synthesis of copper nanoparticles by thermal decomposition and their antimicrobial properties. *Journal of Nanomaterials*, 2014, 7–11.



<https://doi.org/10.1155/2014/980545>

- Brunel, F., El Gueddari, N. E., & Moerschbacher, B. M. (2013). Complexation of copper(II) with chitosan nanogels: Toward control of microbial growth. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1348–1356. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.025>
- Cárdenas, G., Díaz V., J., Meléndrez, M. F., Cruzat C., C., & García Cancino, A. (2009). Colloidal Cu nanoparticles/chitosan composite film obtained by microwave heating for food package applications. *Polymer Bulletin*, 62(4), 511–524. <https://doi.org/10.1007/s00289-008-0031-x>
- Cedrón, J. C. (2013). Capsaicina: LA MOLÉCULA DESTACADA. *Revista de Química PUCP*, 27, 816–824. Retrieved from <http://revistas.pucp.edu.pe/quimica>
- Certuche, B. (2017). Estudio del modelo cinético de liberación de piriproxifen a partir de hidrogeles de quitosano y las propiedades mecánicas de la matriz, (6), 67–72. Retrieved from http://repository.icesi.edu.co/biblioteca_digital/bitstream/10906/83031/1/certuche_modelo_cinetico_2017.pdf
- Chhipa, H. (2017). Nanofertilizers and nanopesticides for agriculture. *Environmental Chemistry Letters*, 15(1), 15–22. <https://doi.org/10.1007/s10311-016-0600-4>
- Chipantiza Quinatoa, H. P. (2017). Extracción de capsaicina y evaluación de su actividad antimicrobiana frente a: *Aspergillus niger*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*., 25–33. Retrieved from repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/25298
- Choi, A., Kim, C., & Cho, Y. (2011). Characterization of Capsaicin-Loaded Nanoemulsions Stabilized with Alginate and Chitosan by Self-assembly. *Food Bioprocess Technol*, 4, 1119–1126. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0568-9>
- Choudhary, R. C., Kumaraswamy, R. V., Kumari, S., Sharma, S. S., Pal, A., Raliya, R., ... Saharan, V. (2017). Cu-chitosan nanoparticle boost defense responses and plant growth in maize (*Zea mays* L.). *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08571-0>
- Cioffi, N., Torsi, L., Ditaranto, N., Sabbatini, L., Zambonin, P. G., Tantillo, G., ... Traversa, E. (2004). Antifungal activity of polymer-based copper nanocomposite coatings. *Applied Physics Letters*, 85(12), 2417–2419. <https://doi.org/10.1063/1.1794381>
- Cioffi, N., Torsi, L., Ditaranto, N., Tantillo, G., Ghibelli, L., Sabbatini, L., ... Traversa, E.



- (2005). Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties. *Chemistry of Materials*, 17(21), 5255–5262. <https://doi.org/10.1021/cm0505244>
- Cruzat, C. (2010). Síntesis y caracterización de nanopartículas metálicas soportadas en quitosano., 51,54,64.
- Cruzat Contreras, C., Peña, O., Meléndrez, M. F., Díaz-Visurraga, J., & Cárdenas, G. (2011). Synthesis, characterization and properties of magnetic colloids supported on chitosan. *Colloid and Polymer Science*, 289(1), 21–31. <https://doi.org/10.1007/s00396-010-2302-y>
- Damm, C., & Münstedt, H. (2008). Kinetic aspects of the silver ion release from antimicrobial polyamide/silver nanocomposites. *Applied Physics A: Materials Science and Processing*, 91(3), 479–486. <https://doi.org/10.1007/s00339-008-4434-1>
- Dananjaya, S. H. S., Erandani, W. K. C. U., Kim, C. H., Nikapitiya, C., Lee, J., & De Zoysa, M. (2017). Comparative study on antifungal activities of chitosan nanoparticles and chitosan silver nano composites against *Fusarium oxysporum* species complex. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 478–488. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.056>
- Deitzel, J. M., Kleinmeyer, J., Harris, D., & Beck Tan, N. C. (2001). The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer*, 42(1), 261–272. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00250-0](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00250-0)
- Dini, E., Alexandridou, S., & Kiparissides, C. (2003). Synthesis and characterization of cross-linked chitosan microspheres for drug delivery applications. *Journal of Microencapsulation*, 20(3), 375–385. <https://doi.org/10.1080/0265204031000093078>
- Duhan, J. S., Kumar, R., Kumar, N., Kaur, P., Nehra, K., & Duhan, S. (2017). Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture. *Biotechnology Reports*, 15(December 2016), 11–23. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.03.002>
- Elgueta, C., Valenzuela, A., Cárdenas-Triviño, G., Vergara, L., Ojeda, J., & Cruzat, C. (2017). Chitosan doped with nanoparticles of copper, nickel and cobalt. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 498–507. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.040>
- Estrada, B., Bernal, M. A., Díaz, J., Pomar, F., & Merino, F. (2002). Capsaicinoids in



vegetative organs of capsicum annum I. in Relation to fruiting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(5), 1188–1191. <https://doi.org/10.1021/jf011270j>

Fernando, E., López-Hernández, E., Carlos, E., Lobato-García, Q., Abraham Gómez-Rivera, D., Nancy, R.-C. M. C., & Escobar-Ramos, A. (2011). *Extracción y cuantificación espectrofotométrica de capsaicina a partir de chile habanero*.

Giannousi, K., Sarafidis, G., Mourdikoudis, S., Pantazaki, A., & Dendrinou-Samara, C. (2014). Selective synthesis of Cu₂O and Cu/Cu₂O NPs: Antifungal activity to yeast *saccharomyces cerevisiae* and DNA interaction. *Inorganic Chemistry*, 53(18), 9657–9666. <https://doi.org/10.1021/ic501143z>

González, R. E., Tarón, A., & Morón, L. B. (2015). Formación de Microcápsulas de Tamaño Controlado por Gelación Iónica Utilizando Mezclas Biopoliméricas Binarias
Sized-Controlled Microcapsules Formation by Ionic Gelation Using Binary Biopolymer Mixtures, 26(6), 31–38. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642015000600005>

Guadalupe, R. (2007). La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso. *Facultad Latinoamericana de Ciencias Sociales*, 29(1), 161–186.

Hahn, A., Brandes, G., Wagener, P., & Barcikowski, S. (2011). Metal ion release kinetics from nanoparticle silicone composites. *Journal of Controlled Release*, 154(2), 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.05.023>

Haider, A., Kwak, S., Gupta, K. C., & Kang, I.-K. (2015). Antibacterial Activity and Cytocompatibility of PLGA/CuO Hybrid Nanofiber Scaffolds Prepared by Electrospinning. *Journal of Nanomaterials*, 2015, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2015/832762>

Hernandez, A. G. (2010). Síntesis De Nanopartículas De BaTiO₃:Yb₃⁺ por El Método Hidrotermal, 24–28.

Hernandez, K. (2014). Síntesis de mebranas de quitosán compuestos con nanopartículas de magnetita. *Instituto Politecnico Nacional*, 52–53.

Jafari, S. M., Katouzian, I., Rajabi, H., & Ganje, M. (2017). *Bioavailability and release of bioactive components from nanocapsules. Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809436-5.00013-6>

Jampílek, J., & Kráľová, K. (2017). *Nanopesticides: preparation, targeting, and controlled*



release. *New Pesticides and Soil Sensors*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804299-1.00004-7>

- Jumonville, F. M. (2017). GC-MS Profiling of Capsaicinoids Present in *Capsicum chinense* Jacq. cv. (Naga King Chilli) and Evaluation of its Antifungal Activity. *Asian Journal of Chemistry*, 29(12), 2674–2678. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2017.20797>
- Kanhed, P., Birla, S., Gaikwad, S., Gade, A., Seabra, A. B., Rubilar, O., ... Rai, M. (2014). In vitro antifungal efficacy of copper nanoparticles against selected crop pathogenic fungi. *Materials Letters*, 115, 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2013.10.011>
- Khan, M. (2016). Influence of Temperature on the Morphology and Grain Size of Cupric Oxide (CuO) Nanostructures via Solvothermal Method. *Journal of Nano Research*, 40, 1–7. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/JNanoR.40.1>
- Kim, J. C., Kim, Y. H., Tae, G., Hwang, S. W., Sul, D., Kim, S., & Lee, S. H. (2011). Nanoparticle Formulation for Controlled Release of Capsaicin. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 11(5), 4589. <https://doi.org/10.1166/jnn.2011.3636>
- Kohsari, I., Shariatinia, Z., & Pourmortazavi, S. M. (2015). *Antibacterial electrospun chitosan–polyethylene oxide nanocomposite mats containing bioactive silver nanoparticles*. *Carbohydrate Polymers* (Vol. 140). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.12.075>
- Lai, J., Niu, W., Luque, R., & Xu, G. (2015). Solvothermal synthesis of metal nanocrystals and their applications. *Nano Today*, 10(2), 240–267. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2015.03.001>
- López., K., Calero, J., Torrez, R., Hernann, E., & Sánchez, Y. F. (2014). Elaboración y Caracterización de microcápsulas gastrorresistentes de Diclofenac obtenidas por Gelificación Iónica. *Universitas (León): Revista Científica de La UNAN León*, 2(1), 27–30. <https://doi.org/10.5377/universitas.v2i1.1640>
- Lugo, E., García, C., & Ruelas, R. (2010). Nanotecnología Y Nanoencapsulación De Plaguicidas. *Ra Ximhai Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable.*, 6(1), 63–67. Retrieved from [http://www.uaim.edu.mx/webraximhai/Ej-16articulosPDF/09 Nanotecnologia.pdf](http://www.uaim.edu.mx/webraximhai/Ej-16articulosPDF/09%20Nanotecnologia.pdf)
- Mallick, S., Sharma, S., Banerjee, M., Ghosh, S. S., Chattopadhyay, A., & Paul, A. (2012). Iodine-stabilized Cu nanoparticle chitosan composite for antibacterial



applications. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 4(3), 1313–1323.
<https://doi.org/10.1021/am201586w>

Matthew G. McKee, †, Garth L. Wilkes, ‡, Ralph. H. Colby, § and, & Timothy E. Long*, †. (2004). Correlations of Solution Rheology with Electrospun Fiber Formation of Linear and Branched Polyesters. *Macromolecules*, 37, 1760–1767.
<https://doi.org/10.1021/MA035689H>

Megelski, S., Stephens, J. S., Bruce Chase, D., & Rabolt, J. F. (2002). Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers. *Macromolecules*, 35(22), 8456–8466. <https://doi.org/10.1021/ma020444a>

Mejía Yanez, F. M. (2013). Aislamiento y Caracterización Fisicoquímica de la Capsaicina de Tres Variedades de Ají, 46.

Menin, A., Zanoni, F., Vakarelova, M., Chignola, R., Donà, G., Rizzi, C., ... Zoccatelli, G. (2018). Effects of microencapsulation by ionic gelation on the oxidative stability of flaxseed oil. *Food Chemistry*, 269(December 2017), 293–299.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.144>

Mi, F. L., Kuan, C. Y., Shyu, S. S., Lee, S. T., & Chang, S. F. (2000). Study of gelation kinetics and chain-relaxation properties of glutaraldehyde-cross-linked chitosan gel and their effects on microspheres preparation and drug release. *Carbohydrate Polymers*, 41(4), 389–396. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(99\)00104-6](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00104-6)

Michael Rajamathi, & Seshadri, R. (2002). Oxide and chalcogenide nanoparticles from hydrothermal/ solvothermal reactions. *Solid State & Materials Science*, 6, 337–345.
<https://doi.org/10.1186/s40623-016-0575-1>

Molina Sepúlveda, R. C. (2006). Preparación de nanocompuestos basados en copolímeros de etileno-1-octeno (engage)-arcillas y mezclas de polipropileno-engage-arcillas y estudio de sus propiedades. *Tesis de Maestría Universidad de Chile*, 82.

Moreno-Limón, S., Salcedo-Martínez, S. M., Cárdenas-Ávila, M. L., Hernández-Piñero, J. L., & Núñez-González, M. a. (2012). Efecto Antifúngico De Capsaicina Y Extractos De Chile Piquín (*Capsicum Annum* L. Var. *Aviculare*) Sobre El Crecimiento in Vitro De *Aspergillus Flavus*. *Polibotánica*, 34, 171–184.

Mourdikoudis, S., & Liz-Marzán, L. M. (2013). Oleylamine in nanoparticle synthesis. *Chemistry of Materials*, 25(9), 1465–1476. <https://doi.org/10.1021/cm4000476>

Nogueira, A. E., Giroto, A. S., Neto, A. B. S., & Ribeiro, C. (2016). CuO synthesized by



- solvothermal method as a high capacity adsorbent for hexavalent chromium. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 498, 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.03.022>
- Okutan, N., Terzi, P., & Altay, F. (2014). Affecting parameters on electrospinning process and characterization of electrospun gelatin nanofibers. *Food Hydrocolloids*, 39, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.12.022>
- Ouda, S. M. (2014). Antifungal Activity of Silver and Copper Nanoparticles on Two Plant Pathogens, *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea*. *Research Journal of Microbiology*, 9(1), 34–42.
- Parveen, F., Sannakki, B., Mandke, M. V., & Pathan, H. M. (2016). Copper nanoparticles: Synthesis methods and its light harvesting performance. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 144, 371–382. <https://doi.org/10.1016/j.solmat.2015.08.033>
- Perez, J. J., & Francois, N. J. (2016). Chitosan-starch beads prepared by ionotropic gelation as potential matrices for controlled release of fertilizers. *Carbohydrate Polymers*, 148, 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.054>
- Piras, A. M., Maisetta, G., Sandreschi, S., Esin, S., Gazzarri, M., Batoni, G., & Chiellini, F. (2014). Preparation, physical-chemical and biological characterization of chitosan nanoparticles loaded with lysozyme. *International Journal of Biological Macromolecules*, 67, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.03.016>
- Pohl, L., Ketelhut, S., Goycoolea, F. M., Galla, H.-J., Moerschbacher, B. M., Kemper, B., ... Pereira, S. (2015). Chitosan encapsulation modulates the effect of capsaicin on the tight junctions of MDCK cells. *Scientific Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep10048>
- Pozo, P., & Mejía, F. (2014). Aislamiento y caracterización fisicoquímica de la capsaicina de tres variedades de ají. *InfoAnalítica*, 2(1), 9–20.
- Prasad, R., Kumar, M., & Kumar, V. (2017). Synthesis, Characterization, and Application of Chitosan Nanomaterials Loaded with Zinc and Copper for Plant Growth and Protection. *Nanotechnology: An Agricultural Paradigm*, 1–372. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-4573-8>
- Quintero Cerón, J. P., Falguera Pascual, V., & Muñoz Hernández, J. A. (2010). Películas y recubrimientos comestibles: importancia y tendencias recientes en la cadena hortofrutícola. *Tumbaga*, 5, 97,101. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3628239>



- Rao, C. N. R., Kulkarni, G. U., Thomas, P. J., & Edwards, P. P. (2000). Metal nanoparticles and their assemblies. *Chemical Society Reviews*, 29(1), 27–35. <https://doi.org/10.1039/a904518j>
- Redel', L. V., Gafner, Y. Y., & Gafner, S. L. (2015). Role of “magic” numbers in structure formation in small silver nanoclusters. *Physics of the Solid State*, 57(10), 2117–2125. <https://doi.org/10.1134/s106378341510025x>
- Roy, A., Singh, S. K., Bajpai, J., & Bajpai, A. K. (2014). Controlled pesticide release from biodegradable polymers. *Central European Journal of Chemistry*, 12(4), 454. <https://doi.org/10.2478/s11532-013-0405-2>
- Rubina, M. S., Vasil'kov, A. Y., Naumkin, A. V., Shtykova, E. V., Abramchuk, S. S., Alghuthaymi, M. A., & Abd-Elsalam, K. A. (2017). Synthesis and characterization of chitosan–copper nanocomposites and their fungicidal activity against two sclerotia-forming plant pathogenic fungi. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 7(3), 249–258. <https://doi.org/10.1007/s40097-017-0235-4>
- Sáez, V., Hernáez, E., & Sanz, L. (2004). Mecanismos de liberación desde materiales poliméricos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 5(1), 61.
- Saharan, V., Mehrotra, A., Khatik, R., Rawal, P., Sharma, S. S., & Pal, A. (2013). Synthesis of chitosan based nanoparticles and their in vitro evaluation against phytopathogenic fungi. *International Journal of Biological Macromolecules*, 62, 677–683. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.10.012>
- Saharan, V., Sharma, G., Yadav, M., Choudhary, M. K., Sharma, S. S., Pal, A., ... Biswas, P. (2015). Synthesis and in vitro antifungal efficacy of Cu-chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato. *International Journal of Biological Macromolecules*, 75, 346–353. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.027>
- Salas, C. (2016). Solution electrospinning of nanofibers. In *Electrospun Nanofibers* (p. 75,85,102). Raleigh- North Carolina: Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100907-9.00004-0>
- Sill, T. J., & von Recum, H. A. (2008). Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 29(13), 1989–2006. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.01.011>
- Solis Elizalde, O. (2008). Solubilidades de la capsaicina y pigmentos liposolubles (carotenoides) del chile poblano en CO₂ supercrítico, 21–37.
- Song, K., Wu, Q., Qi, Y., & Kärki, T. (2016). Electrospun nanofibers with antimicrobial



properties. *Electrospun Nanofibers*, (1), 551–569. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100907-9.00020-9>

- Suganya, V., & Anuradha, V. (2017). Microencapsulation and Nanoencapsulation: A Review. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(3), 233–239. <https://doi.org/10.25258/ijpcr.v9i3.8324>
- Supalkova, V., Stavelikova, H., Krizkova, S., Adam, V., Horna, A., Havel, L., ... Kizek, R. (2007). Study of capsaicin content in various parts of pepper fruit by liquid chromatography with electrochemical detection. *Acta Chimica Slovenica*, 54(1), 55–59.
- Tamayo, L., Azócar, M., Kogan, M., Riveros, A., & Páez, M. (2016). Copper-polymer nanocomposites: An excellent and cost-effective biocide for use on antibacterial surfaces. *Materials Science and Engineering C*, 69, 1391–1409. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.08.041>
- Tamilvanan, A., Balamurugan, K., Ponappa, K., & Kumar, B. M. (2014). Copper Nanoparticles: Synthetic Strategies, Properties and Multifunctional Application. *International Journal of Nanoscience*, 13(02), 1430001. <https://doi.org/10.1142/S0219581X14300016>
- Tang, Z. X., Qian, J. Q., & Shi, L. E. (2007). Preparation of chitosan nanoparticles as carrier for immobilized enzyme. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 136(1), 77–96. <https://doi.org/10.1007/BF02685940>
- Tiju, J., & Morrison, M. (2006). Nanotechnology in Agriculture and Food. *Nanotechnology in Agriculture and Food Science*, (May), 2–5. <https://doi.org/10.1002/9783527697724>
- Usman, M. S., Ibrahim, N. A., Shameli, K., Zainuddin, N., & Yunus, W. M. Z. W. (2012). Copper nanoparticles mediated by chitosan: Synthesis and characterization via chemical methods. *Molecules*, 17(12), 14928–14936. <https://doi.org/10.3390/molecules171214928>
- Viet, P. Van, Nguyen, H. T., Cao, T. M., & Hieu, L. Van. (2016). Fusarium Antifungal Activities of Copper Nanoparticles Synthesized by a Chemical Reduction Method. *Journal of Nanomaterials*, 2016, 4. Research article. <https://doi.org/10.1155/2016/1957612>
- Willerth, S. M. (2018). Electrospun Nanofibers for Diverse Applications. *Comprehensive Nanoscience and Nanotechnology*, (February), 275–286.



<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803581-8.10417-5>

- Xia, Y., Xiong, Y., Lim, B., & Skrabalak, S. E. (2009). Shape-controlled synthesis of metal nanocrystals: Simple chemistry meets complex physics? *Angewandte Chemie - International Edition*, *48*(1), 60–103. <https://doi.org/10.1002/anie.200802248>
- Xing, F., Cheng, G., & Yi, K. (2006). Study on the antimicrobial activities of the capsaicin microcapsules. *Journal of Applied Polymer Science*, *102*(2), 1318–1321. <https://doi.org/10.1002/app.23766>
- Yañez, J., Salazar Montoya, J. A., Chaires Martinez, L., Jiménez-Hernández, J., & Ramos-Ramírez, E. (2005). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance y Perspectiva*, *21*, 24–29. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/271836989_Aplicaciones_biotecnologicas_de_la_microencapsulacion
- Zain, N. M., Stapley, A. G. F., & Shama, G. (2014). Green synthesis of silver and copper nanoparticles using ascorbic acid and chitosan for antimicrobial applications. *Carbohydrate Polymers*, *112*, 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.081>
- Zanella, R. (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. *Mundo Nano*, *5*(1), 69. https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2005.00323_1.x