

Síntesis de composites quitosano- hidrolato de romero (*Rosmarinus officinalis*)-Ag / Cu y su posible actividad antimicrobiana

Sarwing Salazar Santos



**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PAMPLONA, COLOMBIA**

2024

Síntesis de composites quitosano- hidrolato de romero (*Rosmarinus officinalis*)-Ag / Cu y su posible actividad antimicrobiana

SARWING SALAZAR SANTOS

**Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de
Químico**

Tutores

Dra. DIANA ALEXANDRA TORRES SÁNCHEZ

Mag. JOSÉ HERNANDO QUINTANA MENDOZA



**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PAMPLONA, COLOMBIA
2024**

DEDICATORIA

Dedicado a mis seres queridos, principalmente a mi madre Ana y mi padre Fernando.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por todo el teatro.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTOS	4
TABLA DE CONTENIDO	5
LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
INTRODUCCIÓN.....	14
1 MARCO REFERENCIAL	16
1.1 YUCA (<i>MANIHOT ESCULENTA</i>).....	16
1.2 ALMIDÓN	18
1.3 BIOPELÍCULAS DE ALMIDÓN	19
1.3.1 <i>Propiedades antibacterianas de la plata</i>	21
1.3.2 <i>Propiedades antibacterianas del cobre</i>	23
1.3.3 <i>Fuente de quitosano y sus propiedades antibacterianas</i>	24
1.3.4 <i>Síntesis de complejos de quitosano-nanopartícula en el almidón</i>	31
2 OBJETIVOS	34
3 METODOLOGÍA.....	35
3.1 REACTIVOS.....	35
3.2 MATERIALES Y EQUIPOS	35
3.3 PROCEDIMIENTO.....	37
3.4 MUESTREO	38
3.4.1 <i>Recolección y tratamiento de la biomasa de abejas</i>	38

3.4.2	<i>Recolección de romero</i>	38
3.4.3	<i>Recolección de la yuca</i>	39
3.5	EXTRACCIONES	39
3.5.1	<i>Extracción de quitosano</i>	39
3.5.2	<i>Extracción del hidrolato y preparación de agregados de plata y cobre</i>	40
3.5.3	<i>Análisis de la yuca y extracción del almidón</i>	41
3.6	SÍNTESIS DE BIOPELÍCULAS	42
3.6.1	<i>Análisis antimicrobiano de las biopelículas</i>	43
4	RESULTADOS Y ANÁLISIS	44
4.1	MUESTREO	44
4.1.1	<i>Biomasa de Apis mellifera</i>	44
4.2	EXTRACCIONES	47
4.2.1	<i>Extracción de quitosano</i>	47
4.2.2	<i>Biomasa de yuca y extracción del almidón</i>	53
4.2.3	<i>Extracción del hidrolato de romero</i>	59
4.3	MEZCLAS REALIZADAS	65
4.3.1	<i>Agregados de plata y de cobre</i>	65
4.3.2	<i>Biopelículas</i>	67
5	CONCLUSIONES.....	80
6	RECOMENDACIONES.....	81
7	BIBLIOGRAFÍA	82
8	ANEXOS	101
8.1	TABLAS.....	101

LISTA DE TABLAS

<i>Tabla 1. Compuestos separados por cromatografía de gases, utilizando una columna apolar y etanol como solvente.</i>	<i>62</i>
<i>Tabla 2. Resultados obtenidos del diámetro de la prueba de pozos de cada duplicado frente a E. coli, Salmonella, S. aureus y B. cereus, respectivamente.....</i>	<i>79</i>
<i>Tabla 3. Diámetros calculados por UV-Vis de nanopartículas de plata (Ag) y nanopartículas de cobre (Cu).....</i>	<i>101</i>

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Representación gráfica de una planta típica de yuca, género Manihot, de la especie esculenta (imagen modificada de pixbay.com).....</i>	<i>17</i>
<i>Figura 2. Representación gráfica de la ramificación de los polisacáridos, basada en la de David Seung(Seung, 2020). A) La amilosa no tiene ramificaciones, o distancias más largas entre enlaces α-D-1,6. B) La Amilopectina tiene muchas ramificaciones con enlaces α-D-1,6 que le permiten formar doble hélices entre sí. C) Representación de los gránulos de almidón, donde se entrelazan la amilosa y amilopectina.</i>	<i>19</i>
<i>Figura 3. Representación gráfica del mecanismo de acción de la plata dentro de las células bacterianas, basada en la representación realizada por Lokina(Lokina et al., 2014). A) las nanopartículas de plata se adhieren a la membrana plasmática mediante interacciones electrostáticas, B) ahora, las nanopartículas se adhieren a los diferentes organelos presentes en las células, C) finalmente, la célula colapsa por el daño causado con las nanopartículas.</i>	<i>22</i>
<i>Figura 4. Estructura de la quitina, B) estructura del quitosano comercial y, C) estructura del quitosano ideal (imagen modificada de Wang & Zhuang)(J. Wang & Zhuang, 2022).</i>	<i>26</i>
<i>Figura 5. Imagen modificada del exoesqueleto de las abejas propuesto por Llorente (Anatomía externa de la abeja, s. f.).</i>	<i>27</i>
<i>Figura 6. Estructuras de α, β, γ y δ de la quitina (Wang & Zhuang, 2022).</i>	<i>28</i>
<i>Figura 7. Esquema general de la extracción del quitosano.</i>	<i>30</i>
<i>Figura 8. Algunos agentes reductores utilizados en la síntesis de agregados metálicos.</i>	<i>32</i>
<i>Figura 9. Reacción general de oxidación de un aldehído en presencia de iones de plata.</i>	<i>33</i>
<i>Figura 10. Esquema general de todas las etapas del proceso. Tanto las frases como las siglas en el lado derecho del diagrama, IR (infrarrojo), UV-Vis, SEM (microscopía electrónica de barrido), TGA (análisis termogravimétrico), RX (rayos x), corresponden a las técnicas aplicadas en cada etapa del proceso.</i>	<i>37</i>

Figura 11. Imágenes estereoscópicas de <i>Apis mellifera</i> . A) abeja a temperatura ambiente, B) abeja a temperatura ambiente después de secar durante 15 días a 70 °C.....	44
Figura 12. ANOVA en forma de caja y bigotes del peso individual de las abejas <i>Apis mellifera</i> con la que se realizó la extracción de quitosano. A) Variación de la biomasa de 5 abejas elegidas aleatoriamente, B) biomasa individual promedio calculada de 3 grupos de 30 abejas cada uno.	45
Figura 13. PCA comparativo entre partes de <i>Apis mellifera</i>	46
Figura 14. PCA comparativo de exoesqueletos entre <i>Apis mellifera</i> y <i>Lestrimelitta</i> sp.	47
Figura 15. A) imagen estereoscópica de los cristales de NaCl utilizados para la molienda de las abejas. B) imagen estereoscópica de la biomasa de las abejas macerada con la sal. C) fotografía de tamaño original de la biomasa de <i>Apis mellifera</i> macerada, después de haber sido lavada y secada. D) imagen estereoscópica de la biomasa macerada después del lavado y secado.....	48
Figura 16. Fotografía tamaño real del momento en que se filtró la biomasa macerada con NaCl, en el matraz Kitasato se observa el filtrado con la coloración ámbar.....	49
Figura 17. Análisis de varianza del porcentaje de quitosano obtenido a partir de: A) extracción con NaOH 1 M, B) extracción con NaOH 3 M.....	49
Figura 18. Espectro infrarrojo de los quitosanos obtenidos.	50
Figura 19. % de desacetilación de las muestras de quitosano obtenidas. A) muestras obtenidas a partir de una extracción con NaOH 1M, B) muestras obtenidas con NaOH 3M.	51
Figura 20. Porcentaje de proteína de la biomasa de <i>Apis mellifera</i> . A) . B) grupo de extracción con NaOH 1 M. B) Extracción con NaOH 3M.	52
Figura 21. Gráfico del análisis de varianza del procesamiento de la yuca con la que se trabajó. A) Análisis de varianza de 30 trozos de yuca elegidos al azar para determinar el porcentaje de pulpa que se puede recuperar, B) dispersión el porcentaje de pulpa de los datos del diagrama A.....	54
Figura 22. A) Dispersión de datos del porcentaje de almidón obtenido. B) dispersión del porcentaje de amilosa determinado por UV-Vis.	55
Figura 23. IR de 5 muestras de pulpa de yuca seleccionadas al azar.....	56
Figura 24. PCA de grupos funcionales entre el peridermo (p) y pulpa de yuca (y).	57

<i>Figura 25. Termograma del almidón.....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 26. Imagen microscópica gránulos de almidón observados bajo diferentes aumentos. A) acercamiento de 10, B) acercamiento de 25, C) acercamiento de 65.</i>	<i>59</i>
<i>Figura 27. Espectro IR aplicado a las muestras de romero antes y después de extraer el hidrolato.</i>	<i>60</i>
<i>Figura 28. Cromatograma del hidrolato de romero extraído, se determinaron 19 compuestos por comparación con la base de datos, resumidos en la Tabla 1</i>	<i>61</i>
<i>Figura 29. Espectros UV-Vis de A) Hidrolato de romero, B) nanopartículas de plata sintetizadas con hidrolato de romero, C) nanopartículas de cobre sintetizadas con hidrolato de romero.</i>	<i>66</i>
<i>Figura 30. ANOVA del diámetro promedio determinado por UV-Vis de nanopartículas de plata y de cobre, A y B, respectivamente.</i>	<i>67</i>
<i>Figura 31. ANOVA de A) masa promedio de las biopelículas obtenidas (g), B) grosor promedio de las biopelículas (mm).</i>	<i>68</i>
<i>Figura 32. Espectro IR de las biopelículas sintetizadas, cargadas con: B) es el blanco, HR) hidrolato de romero, Ag) nanopartículas de plata, Qs) quitosano, Qs-Ag) quitosano-nanopartículas de plata, Qs-Cu) quitosano-nanopartículas de cobre.</i>	<i>69</i>
<i>Figura 33. PCA de tres componentes, los cuales relacionan las vibraciones de los tres grupos funcionales principales de los espectros IR.....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 34. TGA biopelículas.</i>	<i>72</i>
<i>Figura 35. SEM- EDS QsAg y QsCu.</i>	<i>73</i>
<i>Figura 36. Tiempo vs masa ganada.</i>	<i>75</i>
<i>Figura 37. ANOVA del índice de permeabilidad promedio de cada biopelícula sintetizada. El subíndice P se utiliza para referirse a las “películas”, B, son biopelículas blanco, HR, son biopelículas de hidrolato de romero, Np Ag, biopelículas con nanopartículas de plata, Np Cu, biopelículas con nanopartículas de cobre, Qs, biopelículas con quitosano, Np Qs-Ag, biopelículas con quitosano y nanopartículas de plata, Np Qs-Cu, biopelículas con quitosano y nanopartículas de cobre.</i>	<i>76</i>

<i>Figura 38. E. coli</i>	77
<i>Figura 39. Salmonella</i>	77
<i>Figura 40. Staphylococcus aureus</i>	78
<i>Figura 41. Bacillus cereus</i>	78

RESUMEN

En el presente trabajo se establecieron los parámetros para la extracción y desproteinización del quitosano teniendo como materia prima abejas de la especie *Apis mellifera*. Adicionalmente, se realizó la extracción de almidón de yuca y se preparó un hidrolato de romero que permitió realizar la síntesis de nanopartículas de plata y cobre.

Con los anteriores precursores se realizó la síntesis de biopelículas a base de almidón para dispersar quitosano extraído de *Apis mellifera*, hidrolato de romero, nanopartículas de cobre y nanopartículas de plata, estableciendo los parámetros más adecuados para su síntesis.

Se encontró que la presencia de nanopartículas metálicas aumenta la estabilidad en la descomposición del material. Las biopelículas tuvieron un comportamiento bacteriostático con cada uno de los componentes mencionados, y aumentaron su rango de efectividad a medida que se mezclaron los 3 componentes (quitosano, hidrolato de romero y nanopartículas metálicas); la presencia de nanopartículas de cobre presentó mayor estabilidad en la descomposición y mayor efecto antimicrobiano que las de plata.

ABSTRACT

In the present work, the parameters for the extraction and deproteinization of chitosan were established using bees of the species *Apis mellifera* as raw material. Additionally, cassava starch was extracted and a rosemary hydrolate was prepared that allowed the synthesis of silver and copper nanoparticles.

With the previous precursors, the synthesis of starch-based biofilms was carried out, complexed with chitosan extracted from *Apis mellifera*, rosemary hydrolate, copper nanoparticles, and silver nanoparticles, establishing the most appropriate parameters for their synthesis.

It was found that the presence of metallic nanoparticles increases the stability in the decomposition of the material. The biofilms had bacteriostatic behaviour with each of the mentioned components, and their range of effectiveness increased as the 3 components (chitosan, rosemary hydrolate and metal nanoparticles) were mixed; The presence of copper nanoparticles presented greater stability in decomposition and greater antimicrobial effect than silver nanoparticles.

INTRODUCCIÓN

En respuesta a la creciente preocupación por la contaminación ambiental y acumulación de desechos plásticos, se ha intensificado la investigación en el desarrollo de materiales biodegradables y renovables. Entre estos materiales, las biopelículas elaboradas a partir de almidón han surgido como una prometedora alternativa a los plásticos convencionales, debido a su renovabilidad, biodegradabilidad y bajo costo. El almidón, como uno de los polímeros naturales más abundantes, proviene de diversas fuentes vegetales como verduras, cereales, legumbres, tubérculos y raíces, entre otras fuentes y ofrece una excelente base para la fabricación de biopelículas. Su estructura polimérica proporciona propiedades mecánicas adecuadas y una buena barrera contra los gases y humedad, lo que lo hace adecuado para una variedad de aplicaciones de envasado y recubrimiento.

Usualmente, la fabricación de las biopelículas conlleva otros componentes necesarios que le otorgan diferentes características, dependiendo del enfoque que se tenga con ellas. Entre algunas de las modificaciones que se aplican en la síntesis de biopelículas, como la elasticidad, permeabilidad de gases y agua, también se obtienen propiedades antimicrobianas añadiendo componentes con estas capacidades. Actualmente, ya se han aplicado diferentes matrices compuestas a base de almidón para lograr estas cualidades, además, se espera que, para ofrecer este tipo de características, también sean empleados materiales renovables y biodegradables.

El quitosano y las nanopartículas han sido utilizados como agentes antimicrobianos en la síntesis de biopelículas. El quitosano es un biopolímero que se puede obtener de diversas fuentes, la mayor fuente industrial actual de quitosano proviene de crustáceos. La quitina

forma parte de la estructura de muchos insectos como las abejas, por lo que, en búsqueda de otras fuentes de este biopolímero las investigaciones realizadas han ido en aumento, específicamente en la comprobación de sus efectos antimicrobianos, antifúngicos, antiinflamatorios, entre otros. Las investigaciones en el uso de nanopartículas como agentes antimicrobianos se han incrementado debido a su fácil síntesis y alta efectividad, de igual manera, en literatura se encuentran diferentes rutas de formación de nanopartículas en las cuales se requiere de un agente reductor que por lo general es una sal de un metal noble.

Con la finalidad de hacer un aporte en este campo, en este trabajo se realizó la síntesis de biopelículas a base de almidón, hidrolato de romero, quitosano y nanopartículas de plata y cobre, para comprobar su capacidad antimicrobiana.

1 MARCO REFERENCIAL

Para llevar a cabo esta investigación, se siguieron distintos pasos para diseñar las biopelículas, iniciando con las extracciones del almidón de yuca, hidrolato de romero, quitosano de *Apis mellifera*, la síntesis de nanopartículas de plata y cobre, y, finalmente, la obtención de las biopelículas mezclando estos componentes.

1.1 Yuca (*Manihot esculenta*)

La yuca (del género *Manihot*) es una planta con una producción mayor a 300 millones de toneladas anuales a nivel mundial, su origen ha resultado difícil de determinar debido a las diferentes especies silvestres que se han identificado. La mayor demanda por sus raíces tuberosas es de la especie *esculenta* (Figura 1), la cual es comestible y aporta una gran cantidad de carbohidratos a la dieta alimentaria, tanto animal, como humana, así como también bajos porcentajes de proteína, minerales y vitaminas C, B1 y B2; también es utilizada en la industria en la producción de bioetanol, entre otros usos(Allem, 1994; Boukhers et al., 2022; Buitrago A., 1990; Fathima et al., 2023; Molina-Botero et al., 2023; Narina et al., 2011; Temesgen et al., s. f.).

En Colombia, la yuca es uno de los principales alimentos de la canasta familiar, donde se producen alrededor de 2,5 millones de toneladas al año, figurando como el quinto bien agrícola más producido en el país después de productos básicos como la caña de azúcar, el plátano, la papa y el arroz, según cifras del ministro de agricultura hasta el año 2019. La producción de yuca aumentó aproximadamente el 11 % desde el 2015 hasta el 2018.

Actualmente, no se conocen datos de la producción de yuca durante los últimos años en Colombia, sin embargo, en agosto del 2023, el gobierno firmó por primera vez el decreto que reglamenta el sistema nacional de reforma agraria, por ende, se espera que haya un aumento en la producción de los alimentos y, por tanto, aumento en la producción de yuca a nivel nacional.

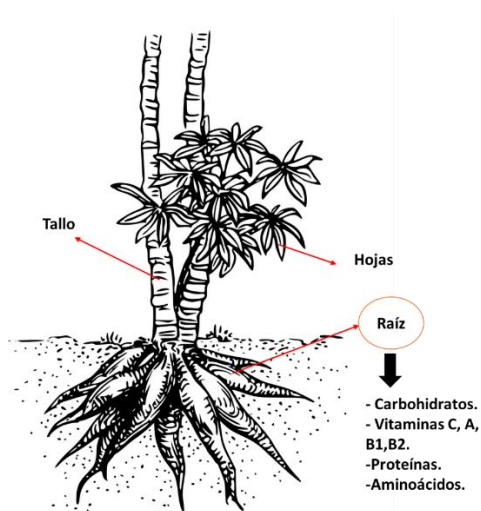


Figura 1. Representación gráfica de una planta típica de yuca, género *Manihot*, de la especie *esculenta* (imagen modificada de pixbay.com).

Uno de los usos industriales más empleados de la raíz de la yuca es en la extracción de almidón a partir de la pulpa, el cuál es un biopolímero ampliamente utilizado tanto a nivel gastronómico, como a nivel industrial, ya que se adapta fácilmente y aporta características importantes a otros componentes en una mezcla (Cruz et al., 2023; Zhu, 2015). Al momento de procesar la raíz de la yuca, comúnmente se aplica el despunte de la misma, el cual consiste en cortar las puntas finas, antes de ser peladas, este proceso se realiza comúnmente por los comerciantes, otorgándole estética, así como la disminución en peso para el proceso de carga y transporte (Sánchez Vásques & Córdoba Artavia, 2007; Torres et al., 2010). De ese porcentaje de despunte de yuca desechado se puede recuperar otro porcentaje de almidón que puede ser aprovechable (Mose & Maranga, 2011).

1.2 Almidón

Es un biopolímero producido por la plantas como una forma de almacenar energía, está compuesto por largas cadenas de glucosa en una mezcla de los polisacáridos amilosa y amilopectina; la amilosa se diferencia de la amilopectina por tener largas cadenas de D-glucosa sin ramificación, unidas por el enlace glucosídico α -D-1,4, en cambio, la amilopectina es un polisacárido con cadenas más cortas, pero con mayores ramificaciones, formando enlaces glucosídicos en la posición α -D-1,6, las cuales les permiten formar doble hélices entre las cadenas más cercanas (Figura 2) mediante múltiples enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de las cadenas polisacáridas, por lo que se presenta una estructura semicristalina (Copeland et al., 2009; Miles et al., 1985; Santelia & Zeeman, 2011; Zhu, 2015). El almidón, tanto a nivel gastronómico, como a nivel industrial, otorga múltiples características en las diferentes mezclas en las que se utiliza, dependientes del porcentaje de amilosa y amilopectina, además, en los últimos años el almidón ha sido utilizado para la fabricación de películas biodegradables (o biopelículas), las cuales, tienen la ventaja de reemplazar polímeros a base de petróleo y degradarse fácilmente por tratarse de un biopolímero natural (Ai & Jane, 2015; Faisal et al., 2022; Lindeboom et al., 2004; P. Liu et al., 2010; Matheus et al., 2023; Whistler & BeMiller, 2009).

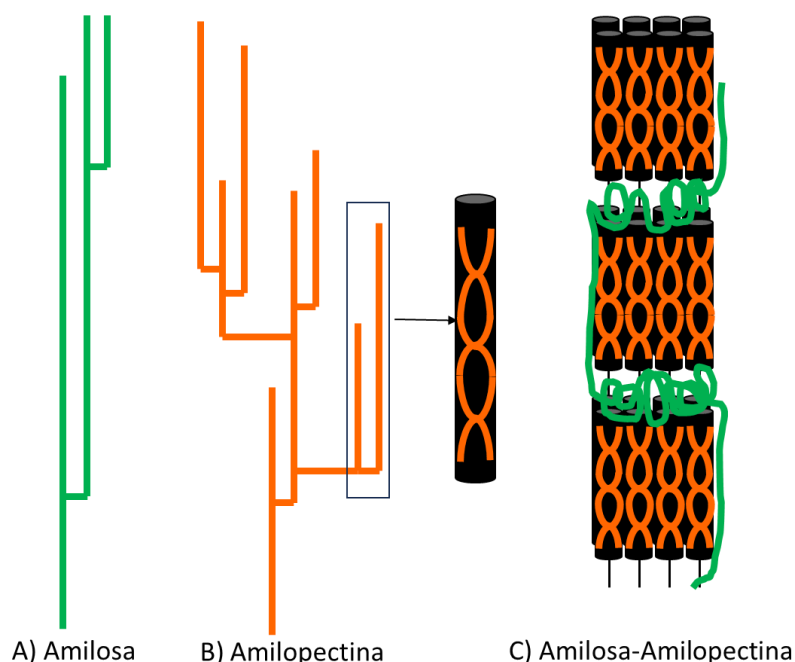


Figura 2. Representación gráfica de la ramificación de los polisacáridos, basada en la de David Seung(Seung, 2020). A) La amilosa no tiene ramificaciones, o distancias más largas entre enlaces α -D-1,6. B) La Amilopectina tiene muchas ramificaciones con enlaces α -D-1,6 que le permiten formar doble hélices entre sí. C) Representación de los gránulos de almidón, donde se entrelazan la amilosa y amilopectina.

1.3 Biopelículas de almidón

Como su nombre lo indica, las biopelículas son laminillas o películas biodegradables que se pueden fabricar a partir de diferentes polímeros naturales que se encuentran en la naturaleza, como puede ser la celulosa, el quitosano y, en este caso, el almidón, entre otros biopolímeros. La aplicación industrial que mayormente se da a las biopelículas en la industria alimentaria, es el envasado de alimentos (Chocano Peralta & Choque Quispe, 2019; De Camargo Andrade-Molina et al., 2013; Guadarrama, 2020; Luchese et al., 2015; M'sakni & Alsufyani, 2023; Riera & Palma, 2018; Saepoo et al., 2023; Salazar Garay & Sobrado Rivera, 2019).

Para la elaboración de las biopelículas es necesario someter los gránulos de almidón, que se encuentran en un estado semicristalino, a un estado homogéneo y amorfo, en el que se requiere de algunas sustancias conocidas como agentes de gelatinización o agentes plastificantes a una temperatura elevada, que, a su vez, le confieren mayor o menor viscosidad dependiendo del tipo de plastificante utilizado; una vez que se haya logrado el cambio de fase del almidón a través del tratamiento térmico con plastificantes, el producto obtenido se llama comúnmente almidón termoplástico. El agente plastificante más utilizado es el agua, sin embargo, se pueden utilizar múltiples compuestos, como la glicerina, ácido cítrico, una combinación de ellos, entre otros, así como también, algunos aditivos que les otorgan propiedades bioactivas a estos biopolímeros (como propiedades antimicrobianas, antioxidantes, entre otras); para crear las películas, usualmente se utiliza una máquina extrusora de un hornillo o de doble hornillo para moldear la mezcla del almidón termoplástico y realizar la producción a gran escala(Cataño et al., 2023; Chen et al., 2021; Makabenta et al., 2023; Mose & Maranga, 2011; Saepoo et al., 2023).

Algunas de las características típicas de las biopelículas, como la flexibilidad, la permeabilidad de vapor de agua, entre otras, se pueden ver afectadas positiva o negativamente dependiendo de las modificaciones que se realicen a una mezcla de almidón para elaborar biopelículas mediante el agregado de agentes plastificantes y aditivos(H. Liu et al., 2009; Olivato et al., 2012; Saepoo et al., 2023).

La información reportada hasta el momento es limitada para establecer qué tipos de aditivos son mejores que otros para la mejora de las propiedades de las biopelículas, sin embargo, varios estudios, con diferentes tipos de aditivos, sugieren que, una mezcla óptima de aditivos mejora considerablemente su flexibilidad y la resistencia al cizallamiento, además de reducir la permeabilidad de vapor de agua, ya que, las unidades de glucosa del almidón tienen dos grupos hidroxilo secundarios y uno primario que reaccionan fácilmente con

varios compuestos orgánicos clorados, anhídridos ácidos, epóxidos y compuestos etílicos, entre otros, reemplazando los enlaces de hidrógeno débiles por enlaces covalentes a través de la reticulación; a medida que aumenta el número de enlaces cruzados a través de la reticulación, el material responde de igual manera en el aumento de la resistencia del material (Cataño et al., 2023; De Freitas et al., 2022; Khan et al., 2017; Mose & Maranga, 2011; M'sakni & Alsufyani, 2023; Saepoo et al., 2023; Savadekar & Mhaske, 2012).

Por otro lado, también se han utilizado nanopartículas de plata como aditivos en biopelículas elaboradas con termoplásticos de almidón, demostrando que también aumenta la resistencia a la elasticidad y al cizallamiento, así como también, biopelículas con nanopartículas de hierro, plata y zinc con actividad antimicrobiana; la adición de las nanopartículas se agrega de manera sencilla durante el mezclado de todos los componentes hasta alcanzar la gelificación, después de haber preparado con anterioridad la reducción de sales (de plata, cobre, zinc, entre otros) para formar las nanopartículas (Ceballos et al., 2021; De Freitas et al., 2022; Muzaffar & Tahir, 2018; Soto-Castro et al., 2023; Yahia et al., 2022). Se han realizado diferentes estudios de biopelículas acopladas con quitosano y se ha observado una mejora en las propiedades biomecánicas, permeabilidad en agua, en la gelificación y un aumento en el tiempo de degradación, acoplado también con otros aditivos, incluidas las nanopartículas (Aguirre-Loredo et al., 2023; Othman et al., 2023; Shapi'i et al., 2022). Según todas estas modificaciones que pueden ser aplicadas al almidón plastificado, se puede utilizar una amplia gama de aditivos, para obtener diferentes propiedades de las biopelículas (H. Liu et al., 2009).

1.3.1 Propiedades antibacterianas de la plata

El uso de la plata en el tratamiento de quemaduras y heridas crónicas se ha utilizado durante siglos; las propiedades antimicrobianas de la plata hicieron que el agua fuera potable aproximadamente desde 1000 a.C, por lo que su utilización como agente

antimicrobiano ha ido en aumento(Rai et al., 2009). La plata, en su estado metálico es inerte, sin embargo, en presencia de humedad, se ioniza fácilmente, por lo que, en su estado iónico, se une activamente en las proteínas de las paredes celulares y, debido a su permeabilidad ha demostrado ser un agente antimicrobiano eficiente ya que también se une fácilmente al ADN y ARN, provocando su desnaturalización, por lo que evita su replicación por la muerte celular(Castellano et al., 2007; Farhangi Ghaleh Joughi et al., 2022; Lansdown, 2002; Lokina et al., 2014). En la Figura 3 se observa un esquema general del mecanismo antimicrobiano de nanopartículas de plata(Lokina et al., 2014).

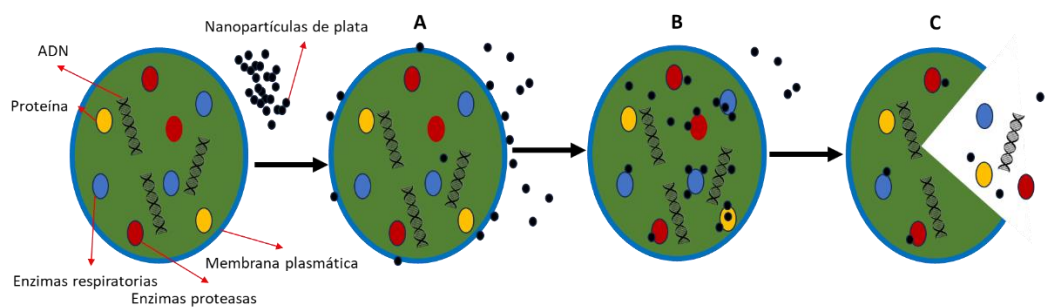


Figura 3. Representación gráfica del mecanismo de acción de la plata dentro de las células bacterianas, basada en la representación realizada por Lokina(Lokina et al., 2014). A) las nanopartículas de plata se adhieren a la membrana plasmática mediante interacciones electrostáticas, B) ahora, las nanopartículas se adhieren a los diferentes organelos presentes en las células, C) finalmente, la célula colapsa por el daño causado con las nanopartículas.

Por tanto, el uso de plata como bactericida ha ido en aumento y sus aplicaciones siguen teniendo impacto en las diferentes industrias que buscan métodos antimicrobianos ya que muchas bacterias muestran poca resistencia a la presencia de plata a diferencia de otros iones metálicos(Baygar et al., 2019; Lansdown, 2002). Por otro lado, se han reportado concentraciones de nanopartículas con inhibición mínima en levaduras de 6,6 nM hasta 13,2 nM y contra *E. coli* un rango de 3.3 nM y 6,6 nM(Kim et al., 2007). Además, esta

propiedad antimicrobiana de la plata también está relacionada con la cantidad de plata liberada en los microorganismos; usualmente se han utilizado soluciones de iones de plata de 0,5 % en heridas externas de la piel para controlar infecciones, por lo que, el uso de nanopartículas a bajas concentraciones no presentan un riesgo significativo al contacto con la piel(Castellano et al., 2007; Dos Santos et al., 2014; Lansdown, 2002; Lokina et al., 2014).

Dentro de los materiales que se usan para aplicar la plata y utilizarla como antimicrobiano, se ha logrado la deposición de nanopartículas, utilizado diferentes matrices como complejos con quitosano, talcos, laterita, entre otros, así como también, en biopelículas, otorgándole mayor alcance a bajas concentraciones de los metales debido a las diferentes superficies que pueden proporcionar las diferentes estructuras(Daghian et al., 2021; Farhangi Ghaleh Joughi et al., 2022; Malik et al., 2022; Tsikourkitoudi et al., 2022).

1.3.2 Propiedades antibacterianas del cobre

Los iones de cobre también han sido estudiados en la preparación de agentes antimicrobianos y el empleo de estos materiales resulta más económico que la preparación de complejos con plata, generalmente se utiliza en forma de nanopartículas siendo estudiado contra una amplia gama de microorganismos como agente antimicrobiano(Chaerun et al., 2022; Tsikourkitoudi et al., 2022). Su mecanismo de acción es poco conocido, sin embargo, también se ha catalogado con propiedades bacteriostáticas y se ha observado que el cobre también puede interactuar con el ADN microbiano, por lo que se esperaría que su efecto inhibitorio sea parecido al de la plata. El cobre se une en primer lugar, con interacciones electrostáticas a la membrana y luego entra a la célula para provocar daños internos y la muerte celular; la efectividad antimicrobiana depende del tamaño y la forma de las partículas que interactúan, así como la concentración liberada y el tiempo de acción(Chaerun et al., 2022; Godoy-Gallardo et al., 2021; Sivaraj et al., 2014).

Se han observado rangos de concentración mínima inhibitoria entre 31,25 µg/mL y 250 µg/mL de nanopartículas de óxido de cobre en la inhibición de microorganismos como *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*(Abboud et al., 2014; Kasana et al., 2017).

1.3.3 Fuente de quitosano y sus propiedades antibacterianas

Los insectos polinizadores son muy importantes tanto para la reproducción vegetal para el sector de la agricultura, así como para muchas especies vegetales silvestres que requieren del trabajo de estos insectos para lograr su reproducción; la disminución de la población de estos insectos también conlleva, por ende, a una disminución de la producción vegetal(Al-Ghamdi et al., 2020; Hung et al., 2018; Klein et al., 2007). La polinización por insectos es un servicio al ecosistema como una práctica de producción utilizada ampliamente por los agricultores de todo el mundo para la producción de cultivos(Brodschneider et al., 2019; Gallai et al., 2009; Klein et al., 2007; Nates-Parra & otros, 2016). Los polinizadores en particular las abejas silvestres, contribuyen significativamente a la polinización de una gran variedad de cultivos(Klein et al., 2007). Es por esto que, los agricultores de muchos países compran o alquilan abejas, abejorros y algunas otras especies de abejas para complementar la fauna polinizadora local, por lo tanto, el beneficio económico de la polinización por estos insectos ha generado un mercado de alquiler de colonias que está muy bien desarrollado y organizado en Estados Unidos y Europa(Gallai et al., 2009).

En Colombia, existe gran variedad de especies de abejas, sin embargo, es poco el conocimiento que se tiene acerca de las especies presentes en el país, por lo que no se aprovecha al máximo los beneficios que ofrecen los insectos polinizadores (González et al., 2005; Nates-Parra & otros, 2016). En el país, también se ha observado una disminución de la población de diversas especies a causa de varios factores directos e indirectos

(deforestación, asentamientos humanos, uso de agroquímicos, derrame de petróleo, entre otros), por lo que es de vital importancia ayudar a sostener el ecosistema(Nates-Parra & otros, 2016). La apicultura es una buena manera de mantener y aumentar la población de polinizadores a través de especies como *Apis mellifera*, además de que esta actividad puede servir para múltiples familias campesinas de bajos recursos al aportar un sustento económico al hogar, sin embargo, el uso de esta especie se limita mayormente a la obtención de miel, sub productos de miel, cera, y la biomasa que aportan los cuerpos de las obreras una vez cumplen su ciclo de vida es usualmente desechada(Barragán Rivera, 2020; Parra Guiomar Nates and Montoya, 2013).

El exoesqueleto de las abejas es una estructura rica en quitina, un polisacárido natural, del cual se obtiene el quitosano a partir de la desacetilación de la quitina y se puede considerar quitosano cuando el biopolímero alcanza más del 40 % de desacetilación, lo que resulta en un biopolímero que contiene un alto porcentaje de grupos amino libres con alto valor en la biotecnología por los múltiples usos que se le pueden dar debido a su estructura que se forma fácilmente en películas y es de baja toxicidad (Figura 4 B y C)(Hazmi et al., 2022; Kaya et al., 2015; Khayrova et al., 2021; Park et al., 2016; J. Wang & Zhuang, 2022). Al realizar la desacetilación de la quitina y formar el quitosano, resulta un biopolímero con múltiples grupos amino libres, que forma puentes de hidrógeno intramoleculares e intermoleculares debido a su alto contenido de OH, N, y O, por lo que, en soluciones de ácidos, orgánicos, se convierte en un biopolímero policationico soluble (Figura 4)(Pillai et al., 2009). Sin embargo, resulta complicado lograr una desacetilación total del quitosano, por lo que, generalmente se presenta como quitosano con un cierto porcentaje de desacetilación (Figura 4C); comercialmente, el porcentaje de desacetilación del quitosano se encuentra por encima del 55%(J. Wang & Zhuang, 2022).

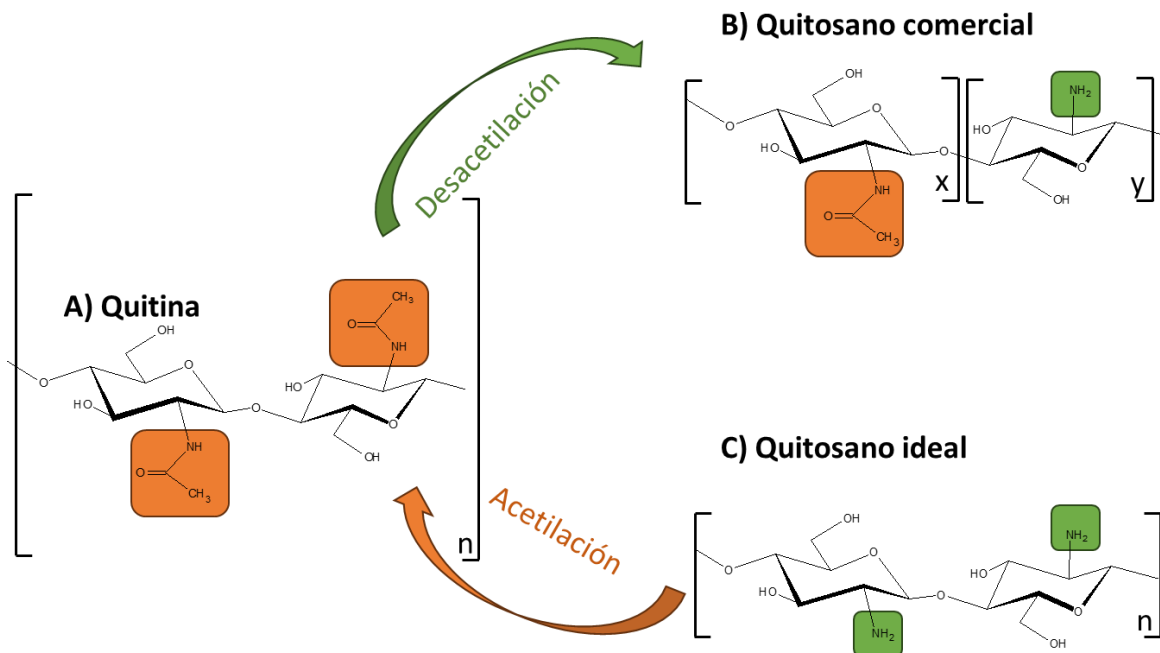


Figura 4. Estructura de la quitina, B) estructura del quitosano comercial y, C) estructura del quitosano ideal (imagen modificada de Wang & Zhuang)(J. Wang & Zhuang, 2022).

Actualmente, la principal fuente de quitina (como se mencionó anteriormente) proviene de los caparazones de crustáceos debido a su alta comercialización mundial(Gortari & Hours, 2013; Hahn et al., 2020; Hisham et al., 2021; Lopes et al., 2018). Sin embargo, los crustáceos al encontrarse en el mar, bioacumulan metales contaminantes, por lo que, la síntesis del biopolímero se puede ver afectada(Bonsignore et al., 2018; Zhang et al., 2022). A diferencia de los crustáceos, las abejas *Apis mellifera*, al igual que el resto de las abejas, tienen un exoesqueleto rico en quitina, además, tienen un tiempo de vida de aproximadamente de 5 meses, por lo que, se esperaría que se convierta en una posible fuente renovable de quitina y, por tanto, de quitosano(Herreo García, 2004; Kaya et al., 2015; Park et al., 2016; Valdez et al., 2022). En la Figura 5 se observa las partes generales del exoesqueleto de las abejas *Apis mellifera*.

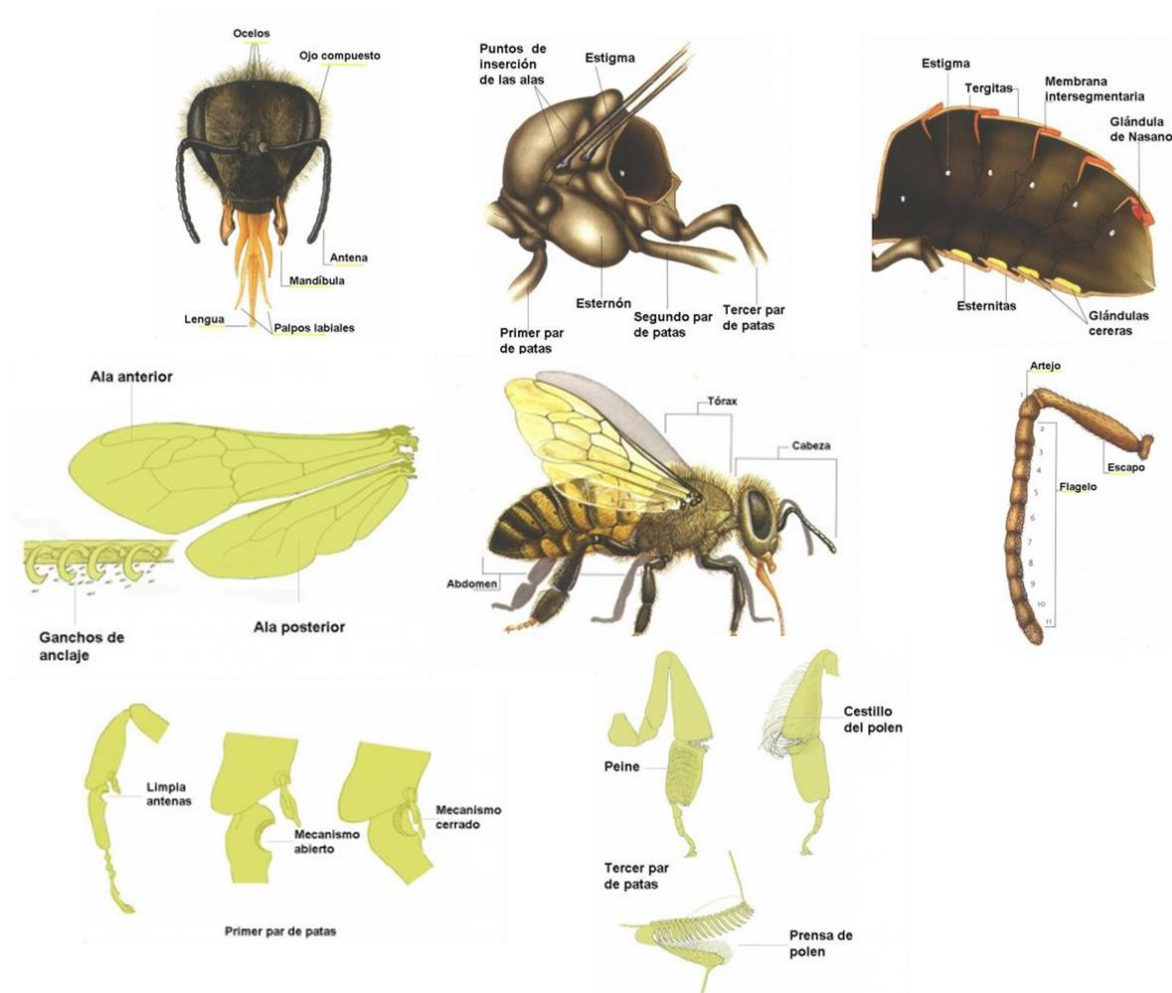


Figura 5. Imagen modificada del exoesqueleto de las abejas propuesto por Llorente
(*Anatomía externa de la abeja*, s. f.).

La quitina usualmente se presenta en las formas alfa, beta y gamma (Figura 6), dependiendo de la fuente de extracción, α -quitina se organiza de forma antiparalela, β -quitina, de forma paralela y, γ -quitina, es una mezcla alfa y beta, de las cuales, la forma alfa es la que usualmente se encuentra presente en las formas comerciales extraídas de crustáceos(El Knidri et al., 2018; Zhang et al., 2022).

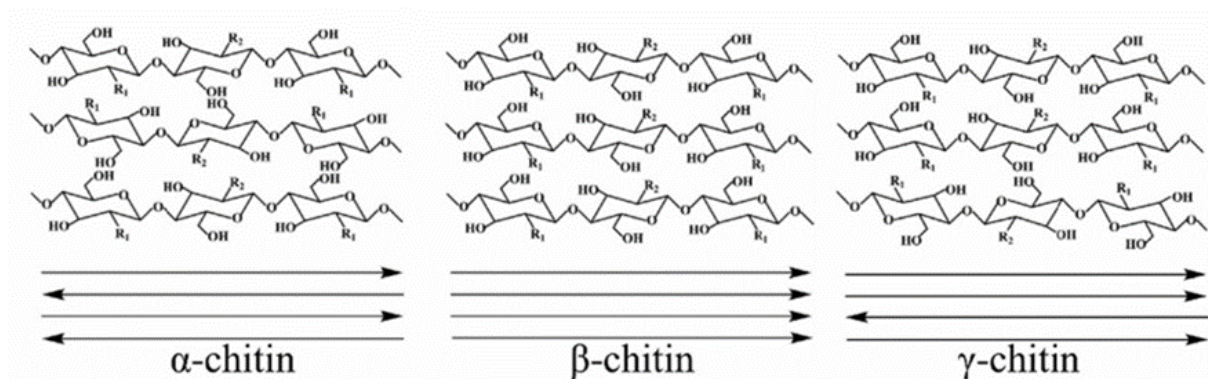


Figura 6. Estructuras de α , β , y γ de la quitina (Wang & Zhuang, 2022).

El tratamiento comúnmente utilizado en la extracción de quitosano, el cual comienza con la desmineralización de la quitina, seguido de la desproteización y luego la desacetilación del biopolímero, se observa en la Figura 7. Las concentraciones de NaOH en la desproteización y la desacetilación varían según el tiempo de reacción utilizado, la temperatura, y la fuente de la biomasa utilizada en el procedimiento, los cuales, para desproteización se encuentran de 0,75 M hasta 19 M, reportados en un rango de temperaturas desde 45 °C hasta 100 °C y, para la desacetilación varían de 1 M hasta 19 M; usualmente, las extracciones de insectos se tratan con soluciones de menor concentración que las extracciones realizadas con crustáceos (Kaya et al., 2015; Khayrova et al., 2021; Pakizeh et al., 2021).

Como se sabe, las abejas cumplen una importante función en la polinización de cultivos agrícolas, por lo que su propagación a través de la apicultura es importante para el equilibrio de los ecosistemas, además de que se podrían usar como fuente activa de quitina y servir como una alternativa de fuente de ingresos económicos para familias de bajos recursos (Barragán Rivera, 2020; Hung et al., 2018; Nates-Parra & otros, 2016).

Dentro de las múltiples aplicaciones que se le otorga al quitosano, su uso como antimicrobiano ha sido evaluado contra una amplia gama de bacterias y, normalmente es

caracterizado como bactericida (elimina las bacterias o una fracción de ella) o bacteriostático (dificulta el crecimiento de las bacterias), sin embargo, no existe un consenso acerca de acción contra las bacterias, ya que, no se conoce exactamente el mecanismo de acción del quitosano frente a ellas(Olivas Flores et al., 2021; Rinaudo, 2006). Esta acción contra las bacterias se le atribuye debido a la capacidad de la molécula de sufrir fácilmente una protonación de los múltiples grupos amino en soluciones ligeramente ácidas e interactuar electrostáticamente con los microorganismos, además, múltiples estudios relacionan la solubilidad del biopolímero a esta capacidad, a menudo, con ácido acético al 1 % o 2 %, lo que permite ampliar el uso del quitosano otorgándole múltiples propiedades adicionales; por lo que es utilizado para la formación de complejos con metales, aumentando su poder antimicrobiano(Olivas Flores et al., 2021; Valdez et al., 2022). Además, también se ha informado que el efecto antimicrobiano depende de las propiedades fisicoquímicas, así como la superficie de contacto y la concentración utilizada, por lo que el peso molecular del quitosano influye en el efecto antimicrobiano, siendo las biomoléculas más pequeñas las que tienen mayor alcance, formando complejos con mejor superficie de contacto ante los microorganismos(Kalaivani et al., 2018; Kou et al., 2022; Valdez et al., 2022).

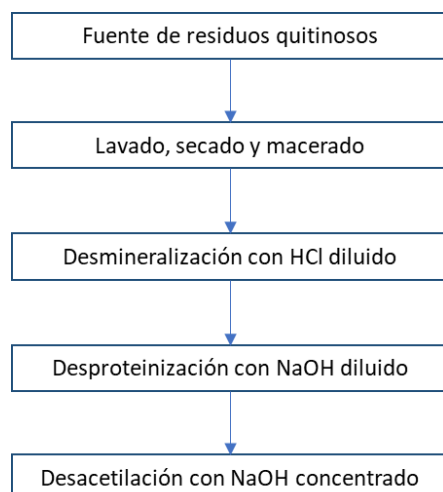


Figura 7. Esquema general de la extracción del quitosano.

Los estudios recientes han caracterizado al quitosano como bacteriostático en lugar de bactericida, debido a las interacciones de la membrana externa de las bacterias con los grupos amino protonados, promoviendo cambios en la permeabilidad, provocando desequilibrios osmóticos internos, lo que dificulta el crecimiento de microorganismos. Otro posible mecanismo tiene que ver con lisis celular provocada por la hidrólisis de los peptidoglicanos en la pared celular de estos microorganismos, provocando la fuga de materia esencial (por ejemplo, proteínas de bajo peso molecular, electrolitos, ácidos nucleicos y glucosa)(Coma et al., 2002; Goy et al., 2009).

Como dicho mecanismo se basa en la interacción electrostática, se espera que, a mayor número de grupos amino presentes, mayor será la actividad antimicrobiana, sin embargo, a altas concentraciones de quitosano, se reduce la capacidad antimicrobiana debido a que aumenta el número de sitios cargados y las cadenas forman grupos de moléculas cuando aún se encuentran en solución(Goy et al., 2009). Se ha observado que, a altas concentraciones, el quitosano tiende a formar un recubrimiento sobre las bacterias, sin adherirse a la superficie, esto es independiente del tipo de bacteria, por ende, es necesario

un ajuste del pH del quitosano para optimizar la solubilidad y mantener las cadenas lo más separadas entre sí(Goy et al., 2009).

Otra de las hipótesis, propone que el quitosano es capaz de permear las células e interactuar con el ADN microbiano, que conduce a la inhibición del ARNm, lo que afecta la síntesis de proteínas en los núcleos de los microorganismos como en *E. coli* en la cual se observaron grupos de cadenas de quitosano dentro(Goy et al., 2009; Raafat et al., 2008). En esto, se supone que las moléculas de quitosano pueden pasar a través de la pared celular bacteriana, compuesta por múltiples capas de mureína reticulada, y llegar a la membrana plasmática. Sin embargo, la probabilidad de que esto ocurra es baja y, el argumento predominante sigue siendo que el quitosano interactúa de manera electrostáticamente con los microorganismos(Raafat et al., 2008).

1.3.4 Síntesis de complejos de quitosano-nanopartícula en el almidón

Lo que se busca al sintetizar complejos con partículas inorgánicas de metales en su estado basal, o iónicos, es aumentar la relación superficie-volumen de estos metales, y así, mejorar la aplicación o dosificación del material activo que se desee emplear(Chaerun et al., 2022). Para ello, primero deben sintetizarse las nanopartículas metálicas, en este caso, de plata y cobre.

1.3.4.1 Síntesis de nanopartículas

Los métodos de reducción química son ampliamente utilizados para la síntesis de nanopartículas, los cuales consisten en agregar el precursor metálico en forma de sal a un agente reductor químico como el NaBH_3 , hidracina, propanol, entre otros, es decir, compuestos químicos poco amigables con el medio ambiente, para formar nanopartículas metálicas, las cuales son estructuras que presentan tamaños entre 1 nm y 100 nm(Chaerun et al., 2022; Nair et al., 2022; Rico-Moctezuma et al., 2010). El uso de agentes reductores biológicos es una excelente alternativa para la síntesis de agregados debido al alto

contenido de grupos funcionales presentes en sistemas biológicos (algas, hongos, bacterias, plantas) capaces de reducir las sales metálicas y formar partículas metálicas estables; un esquema general de la síntesis de nanopartículas metálicas se representa en la Figura 8 (Chaerun et al., 2022; Chan et al., 2022; Nair et al., 2022; Owais Mushtaq et al., 2022).

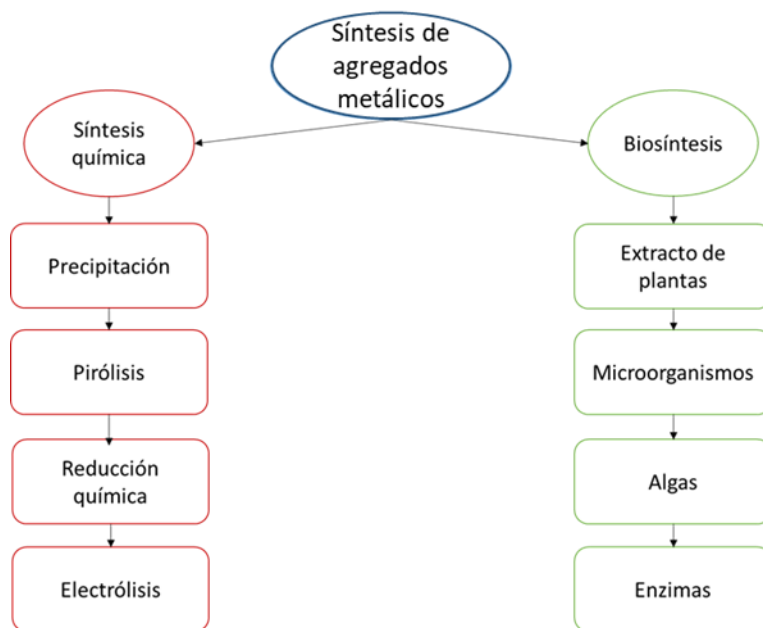


Figura 8. Algunos agentes reductores utilizados en la síntesis de agregados metálicos.

El enfoque reciente y predominante para la preparación de estas nanopartículas requiere del uso de agentes reductores biológicos ya que son más amigables con el medio ambiente. El mecanismo de reducción mediante los metabolitos no se encuentra claramente especificado, sin embargo, en el caso de los metabolitos de las plantas, existen múltiples grupos hidroxilo, aldehídos, cetonas, flavonoides, carotenoides, entre muchos otros, capaces de oxidarse en presencia de iones metálicos y, por ende, la reducción de los metales (Figura 9)(Morrison Thornton & Boyd, 1987; Shah et al., 2015).

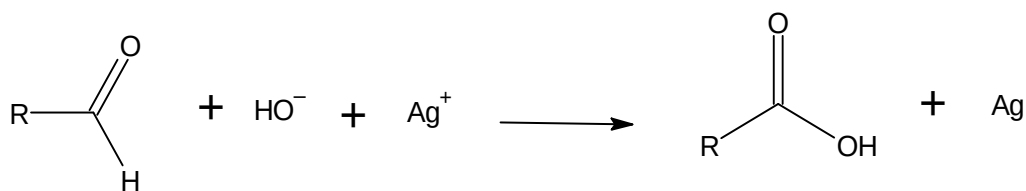


Figura 9. Reacción general de oxidación de un aldehído en presencia de iones de plata.

Las plantas son consideradas fuentes de compuestos fitoquímicos, los cuales son metabolitos secundarios producidos por estas, como carotenoides, glucosinolatos, polifenoles, entre otros, que tienen amplios beneficios para la salud humana, así como también, muchos de ellos tienen la capacidad de donar electrones debido a su alta densidad electrónica (Gasaly et al., 2020; Marcano & Hasegawa, 2018). *Rosmarinus officinalis* es una planta conocida comúnmente como romero, siendo muy apreciada por su capacidad antimicrobiana, debida a los múltiples compuestos fitoquímicos capaces de realizar la reducción de metales como la plata o cobre en sales, convirtiéndose en una buena alternativa para la síntesis de nanopartículas; esta planta se puede encontrar en todo el mundo, incluida la región tropical de Colombia (Pardo et al., 2021; Purca Peña, 2013; Romeu et al., 2007).

1.3.4.2 Determinar el tamaño de nanopartículas metálicas por UV-Vis

El método más común para establecer el tamaño de las nanopartículas es la combinación de microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión (SEM y TEM, por sus siglas en inglés, respectivamente), lo que hace esta determinación muy costosa (Glaubitz et al., 2024). Sin embargo, se puede estimar el diámetro de las nanopartículas metálicas a partir del método validado por Haiss, el cual permite determinar el diámetro aproximado de la región del plasmón formado entre los electrones del material conductor, en este caso, metales, y los fotones del haz de luz. Haiss y colaboradores relacionaron con éxito el diámetro de nanopartículas de oro sintetizadas y la región formada

por el plasmón mediante UV-vis y compararon con microscopía electrónica de transmitancia, encontrando un error absoluto de 3 %. La relación matemática desarrollada por estos autores se resume en la **Ecuación 1**(Haiss et al., 2007).

$$d = \frac{\frac{\ln(\lambda_{spr}-\lambda_0)}{L1}}{L2}$$

Ecuación 1

Donde λ_{spr} representa la longitud de onda en que se presenta la absorbancia máxima donde se genera la región del plasmón y λ_0 representa la longitud de onda en la longitud de onda de menor absorbancia, L1 y L2 son parámetros de ajuste teóricos encontrados por Haiss (L1=6,53; L2=0,0216) para partículas con tamaños entre 25 nm y 110 nm(Haiss et al., 2007).

1.3.4.3 Mezclas

Las nanopartículas metálicas obtenidas por los métodos anteriores, pueden mezclarse con el quitosano y el almidón para formar los complejos que aumentan el área de contacto de los metales a partir de la matriz del almidón; el mecanismo general es mezclar las soluciones de los agregados con el hidrogel formado de quitosano para promover la encapsulación de los agregados(Mose & Maranga, 2011; Shah et al., 2015; J. Wang & Zhuang, 2022).

2 OBJETIVOS

Objetivo general

Sintetizar composites de quitosano - hidrolato de romero (*Rosmarinus officinalis*)-Ag / Cu y su posible actividad antimicrobiana.

Objetivos específicos

- Estudiar los factores que afectan la extracción de la quitina de abejas obreras *Apis mellifera* y su posterior derivatización a quitosano.
- Desarrollar el mecanismo de deposición de los agregados de plata y cobre con hidrolato de romero (*Rosmarinus officinalis*) sobre el quitosano extraído a través de la gelificación.
- Evaluar el efecto de cada uno de los componentes del material compuesto y el composite sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

3 METODOLOGÍA

A continuación, se indican los reactivos, materiales, equipos y el procedimiento usado en esta investigación.

3.1 Reactivos

- Agua destilada (H_2O).
- Hidróxido de sodio ($NaOH$).
- Ácido clorhídrico (HCl) con pureza de 37%.
- Cloruro de sodio ($NaCl$).
- Sulfato de cobre penta hidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$).
- Yoduro de potasio (KI).
- Nitrato de plata ($AgNO_3$)

3.2 Materiales y equipos

- Los espectros de infrarrojo se tomaron en un espectrofotómetro FTIR marca SHIMADZU modelo IR Prestige–21, provisto de un detector DLATGS (Deuterated L-Alanine Doped Triglycene Sulphate) y equipado con un accesorio ATR modelo

MIRacle, marca Pike Technologies, con cristal de diamante, en el rango de 4000 – 500 cm^{-1} con 24 escaneos por muestra.

- Calorímetro de barrido diferencial (TGA), Shimadzu DTG-60, en atmósfera de nitrógeno a 100mL/min y rampa de calentamiento de 10 °C/min.
- Los espectros de ultravioleta visible se realizaron en un espectrofotómetro UV-Vis marca SHIMADZU, modelo UV-2401PC, en un barrido de 900 nm - 190 nm.
- Balanza analítica de precisión 0,0001g, marca aeADAM.
- Horno mufla, marca Ney VULCAN D-550.
- Estereomicroscopio binocular Stemi DV4 marca ZEISS ajustado con un microscope LED light ring MIC-209.
- Licuadora Osterizer.
- Los análisis GC-MS se realizaron con un cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización de llama (FID) y acoplado a un espectrómetro de masas (MS), Perkin Elmer Modelo Clarus 500 (Waltham, MA, EE. UU.). La columna capilar de GC era un factor Varian Cuatro VF-1 y helio sirvieron como gas portador a un caudal de 1 mL/min. el inyector. La temperatura era de 280° C y el programa de temperatura del horno comenzó desde 60 hasta 220 C durante 20 min a razón de 6 °C/min. Para inyecciones líquidas, las soluciones se prepararon diluyendo, se inyectó 1 μL de cada AE con 1 mL de etanol y 1 μL de muestra. Las condiciones fueron: voltaje de ionización de 70 eV y rango de masa de adquisición de 40 DA - 450 DA. Fuente de iones y la temperatura de las piezas de conexión era de 220° C. Se obtuvieron los espectros de masas mediante el software de análisis de datos TurboMass (Perkin Elmer-Vers. 6.1.0). La identificación de los componentes se realizó haciendo coincidir sus espectros de masas con la base de datos del espectrómetro, de las bibliotecas NIST y Wiley y comparación de sus índices de retención lineal (LRI) calculado contra una mezcla de n-alcanos (C8-C30). Los porcentajes medios

relativos de los compuestos se calcularon mediante la normalización del área del pico a partir de cromatogramas GC-FID sin el uso de un estándar interno o factores de corrección

- Para graficar y analizar los diferentes espectros, como también para el análisis estadístico por PCA, se usó la licencia académica de aprendizaje del software OriginPro 2022b.

3.3 Procedimiento

Para el cumplimiento de los objetivos planteados en esta investigación se planteó la siguiente metodología que se ilustra en la figura Figura 10.

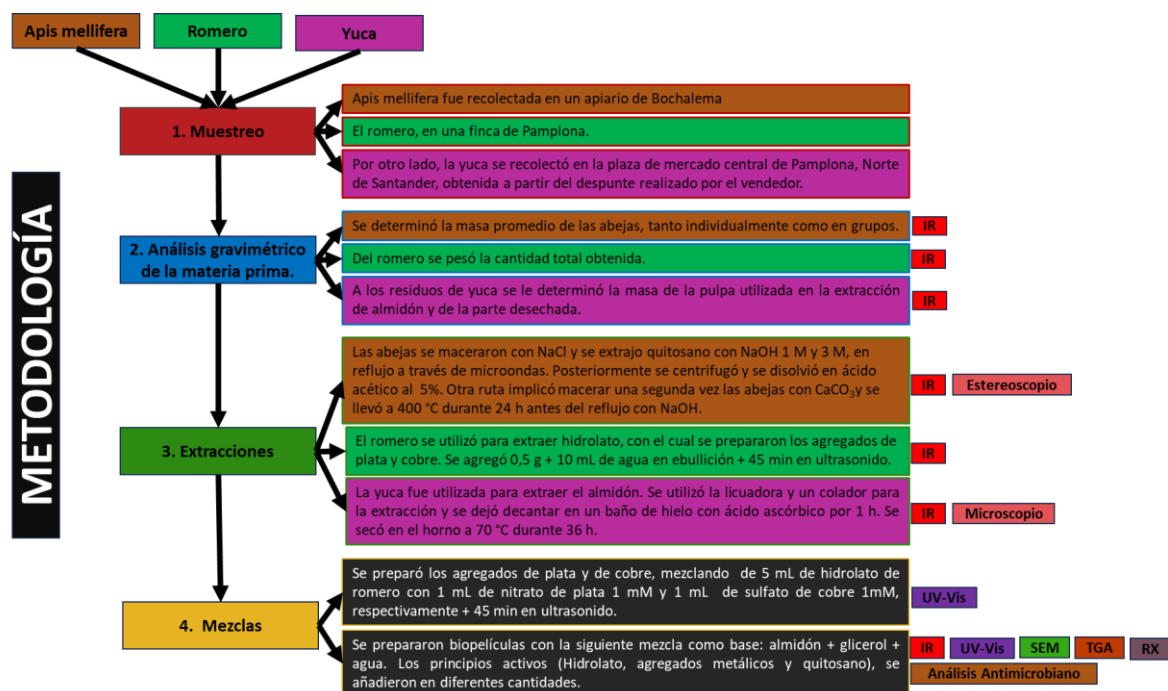


Figura 10. Esquema general de todas las etapas del proceso. Tanto las frases como las siglas en el lado derecho del diagrama, IR (infrarrojo), UV-Vis, SEM (microscopía electrónica de barrido), TGA (análisis termogravimétrico), RX (rayos x), corresponden a las técnicas aplicadas en cada etapa del proceso

3.4 Muestreo

3.4.1 Recolección y tratamiento de la biomasa de abejas

Se recolectaron cientos de exoesqueletos de abejas *Apis mellifera*, con una masa de aproximadamente 450 g en un apiario de la vereda Zarcuta, zona rural de Bochalema. Una vez en el apiario, se fueron recolectando los individuos a medida que se encontraban muertos a la salida de la colmena, luego de eso, se almacenaron a -18 °C hasta su utilización. La especie presente en el apiario, fue identificada por el zootecnista Wolfgang Hoffmann.

Se tomó un grupo de abejas del congelador se envolvieron en toallas absorbentes (Rendy, triple hojas) y se dejaron en el laboratorio de biocalorimetría hasta que alcanzaron la temperatura ambiente aproximadamente 1 h, luego de esto se registró su peso en la balanza analítica, 5 abejas de manera individual, así como también 3 grupos de 30 abejas y 2 grupos de 40 abejas. Posteriormente, se secaron a 50°C por 7 días, luego se registró su peso. Con estos datos se realizó un análisis de varianza.

Se seleccionaron 5 abejas *Apis mellifera* al azar y, sus partes fueron separadas para tomar el espectro infrarrojo. Se realizó el mismo procedimiento seleccionando 5 abejas de la especie *Lestrimelitta* sp.

3.4.2 Recolección de romero

Se recolectaron ramas de romero fresco en la finca los espejos localizada a las afuera de Pamplona, Norte de Santander, que fue trasladado al laboratorio, inmediatamente, se procedió a deshojar las ramas una a una hasta obtener 3 muestras, dos de 150 g y una de 183 g que se almacenaron en bolsas Ziploc y se guardaron en el congelador a -18 °C hasta su uso posterior.

3.4.3 Recolección de la yuca

Se recogió los despuntes de yuca que usualmente son desechados por los diferentes vendedores alrededor de la plaza del mercado central de Pamplona. Se almacenaron al aire libre y se utilizaron al siguiente día.

3.5 Extracciones

3.5.1 Extracción de quitosano

Se tomó biomasa de abejas, previamente molida y se secó para realizar la extracción con NaOH a reflujo en el microondas.

3.5.1.1 Molienda

Para la extracción de quitosano, se inició macerando la biomasa de abejas con NaCl (0,5g NaCl/0,1 g *A. mellifera*), previamente secadas, a 70 °C durante 7 días. La mezcla obtenida, se lavó con agua y se filtró al vacío; el primer volumen del filtrado obtenido se almacenó en recipientes ámbar y se midió el espectro UV-Vis desde 190 nm hasta 900 nm, diluyendo 0,1 mL del filtrado en 10 mL de agua. El sólido obtenido se dejó en el horno a 60 °C durante 15 días, luego se registró su masa y se almacenó hasta su uso en la extracción de quitosano.

3.5.1.2 Desproteínización

En una primera ruta, a la biomasa molida y seca, se le realizó la desproteínización por duplicado con NaOH 1M durante 1 h, con radiación del microondas, con una relación de 1 g de biomasa / 250 mL NaOH. El primer filtrado obtenido al vacío se guardó en recipientes color ámbar y luego se siguió lavando con agua destilada hasta no observar coloración en el filtrado (éste se desechó a partir de la primera lavada con agua). El sólido obtenido se dejó en el horno a 60 °C durante 7 días y se guardó en bolsas Ziploc antes de realizar la desacetilación.

En la segunda ruta de desproteínización se repitió 4 veces el proceso anterior, esta vez, con NaOH 3 M y una relación de 3 g de biomasa / 500 mL NaOH.

3.5.2 Extracción del hidrolato y preparación de agregados de plata y cobre

Se inició el procedimiento realizando la extracción del hidrolato de romero y se mezcló con nitrato de plata para obtener las nanopartículas.

3.5.2.1 Extracción del hidrolato

Se tomó en un tubo de ensayo, aproximadamente 0,5 g de romero previamente descongelado a temperatura ambiente durante 30 minutos sobre papel absorbente y se le agregó 10 mL de agua destilada a temperatura de ebullición (92 °C aproximadamente) y seguido a esto, se sometieron a ultrasonido durante 45 min. Pasado el tiempo en el ultrasonido, se les retiró las hojas de romero con una espátula delgada (procurando no tocar el hidrolato) y se guardó hasta la preparación de los agregados de plata y cobre; se midió el espectro UV-Vis diluyendo 1 mL de hidrolato en 10 mL de solución. A las hojas sólidas se les midió la masa justo después de retirarlas del hidrolato, así como también después de haberlas secado a 60 °C durante 24 h, y se les midió el espectro IR después de secadas. Este procedimiento se realizó 20 veces.

3.5.2.2 Preparación de los agregados de plata y cobre

Para preparar las nanopartículas de plata, se tomó una alícuota de 5 mL de cada una de los primeros 10 hidrolatos preparados, se les añadió 1 mL de AgNO₃ 1 mM y se llevaron al ultrasonido durante 1 h, se le hizo seguimiento fotográfico cada 15 minutos. Una vez pasado este tiempo, se almacenaron en la oscuridad; se midió el espectro UV-Vis diluyendo 0,5 mL de los agregados en 10 mL de solución. Se realizó el mismo procedimiento para los agregados de cobre, esta vez, agregando 1 mL de CuSO₄ 1 mM en 5 mL de cada uno de los 10 hidrolatos restantes.

3.5.3 Análisis de la yuca y extracción del almidón

Al día siguiente de recolectar la yuca, se procedió a crear una matriz de 30 trozos del despunte aleatoriamente, a los cuales se les registró la masa. Luego de eso, a cada despunte seleccionado, se les retiró la corteza y las partes menos favorables (secciones blandas al tacto, o con pudrición), seguidamente, se lavó con agua hasta retirar la suciedad y se secaron con papel absorbente; y nuevamente se registró su masa.

Una vez terminada la matriz, al resto de la yuca se le retiró la corteza, se lavó con abundante agua y se cortó en trozos de aproximadamente 1 cm x 1 cm, los cuales se dejaron sumergidos en una solución de NaClO al 0,5 % durante 30 minutos antes de realizar la extracción del almidón.

Por otra parte, se tomaron aleatoriamente 10 de los trozos pequeños en solución y se les determinó su masa antes y después de 15 días a 30 °C en el horno, así como también se midió el espectro ATR-FTIR aplicando 24 scan por espectro.

3.5.3.1 Extracción del almidón

Se sacaron los trozos de yuca de la solución de NaClO y se secaron con papel absorbente, de los cuales se tomó una porción aproximada de 500 g y se licuó a máxima potencia con 1 L de agua destilada y con 4 g aproximadamente de ácido ascórbico; seguidamente, la mezcla se pasó por un colador de tela y se dejó decantar en un baño de hielo durante 50 min. Pasado el tiempo, se retiró el líquido sobrenadante cuidadosamente y se procedió a secar el almidón a 30 °C durante 8 días. Se registró la masa del almidón obtenido y, se observó en el microscopio, así como también se tomó el espectro ATR-FTIR. Este mismo procedimiento se realizó 6 veces.

3.5.3.2 Determinación del porcentaje de amilosa a través de colorimetría

Se midió el porcentaje de amilosa en un espectrofotómetro UV-Vis siguiendo la metodología establecida por Chrastil. Se realizó una réplica de 5 ensayos, tomando aproximadamente 20 mg del almidón extraído en un tubo de ensayo y se lavó con 5 mL de metanol a 60 °C durante 30 min, seguidamente se centrifugó, este procedimiento se realizó dos veces; el primer lavado con metanol se midió por UV-Vis sin diluir antes de ser desechado y el segundo, fue desechado. Luego de lavar el almidón, se le agregó 2 mL de NaOH 1M, 4 mL de agua y se calentó a temperatura de 85 °C durante 30 min, pasado este tiempo, se centrifugó rápidamente (con la solución en caliente) durante 5 min a 2500 rpm y se almacenó la fase líquida; se midió en el espectrofotómetro UV-Vis diluyendo una alícuota de 0,1 mL de la fase líquida en 5 mL de ácido tricloroacético TCA al 0,5 % y 0,05 mL del complejo I_2 -KI 0,01 N (1,27 g I_2 / L + 3 g KI), después de reposar la mezcla durante 30 min(Chrastil, 1987).

3.6 Síntesis de biopelículas

Se tomó una mezcla total de 150 g con los siguientes porcentajes: 93,33 % agua, 5 % almidón, 1,67 % glicerol para las biopelículas blanco y para las biopelículas mezcladas con el hidrolato, el quitosano, los agregados de plata, los agregados de cobre, la mezcla de agregados de plata con quitosano, así como también la mezcla de quitosano y los agregados de cobre, se utilizó un porcentaje de 1,33 % del material, respectivamente y se redujo ese mismo porcentaje con agua para mantener un total de 150 g de mezcla. Una vez obtenida la mezcla se agregó a un Erlenmeyer de 500 mL con agitador magnético y se colocó en una plancha de calentamiento hasta una temperatura de 76 °C y 40 rpm durante 15 minutos aproximadamente, hasta observar un cambio en la coloración; una vez llegado a este punto, rápidamente se adaptó la entrada del Erlenmeyer a la boquilla de la bomba de vacío y se aplicó vacío hasta observar la detención del burbujeo. Terminado el vacío y,

sin dejar enfriar la mezcla, rápidamente se dividió en dos moldes (cajas Petri de 14,1 mm de alto y 90 mm de diámetro) y se dejó secar en el horno a 70 °C durante 33 h, las biopelículas resultantes se analizaron mediante UV-Vis, ATR-FTIR, TGA, EDX, SEM y se determinó su grosor. Este procedimiento se realizó con 7 mezclas distintas, variando el componente activo.

Además de las técnicas mencionadas anteriormente, a estas biopelículas se les realizó un control de permeabilidad del agua durante 180 h en total: se tomó un vial con un agujero de 5 mm de diámetro que fue llenado con 1 g de CaCl_2 . Al vial que se seleccionó como blanco, se le colocó la tapa y se retiró la banda que protege la entrada, al resto de viales, se les recortó un círculo de cada biopelícula y se reemplazó en la tapa por la banda original, obteniendo una membrana de biopelícula de 5mm de diámetro y se dejó dentro de un desecador con una solución sobresaturada de KBr en el fondo; el vial con el blanco se realizó una vez y las 7 biopelículas se les realizaron por triplicado. El registro de la masa ganada comenzó midiendo la masa pasados una hora, luego cada tres horas hasta completar 180 h de registró.

3.6.1 Análisis antimicrobiano de las biopelículas

Estos análisis fueron realizados por personal experto en el Cepario de la Universidad de la Universidad de Pamplona. Se realizó un antibiograma mediante el método de difusión en agar de acuerdo con los lineamientos del EUCAST, para ello, se preparó un inóculo a partir de las colonias de (los cuatro microorganismos, específico para cada uno) en solución salina hasta lograr una suspensión uniforme, transcurridos 15 minutos se empleó un hisopo de algodón para inocular las placas Mueller Hinton de manera uniforme sobre la superficie en tres direcciones. Por último, se aplicaron los discos de biopolímero y se llevaron a incubación por 24 horas a 37°C y al finalizar este periodo se midió el diámetro de cada halo

con el objeto de discriminar cepas sensibles (S), intermedias (I) y resistentes (R), teniendo en cuenta las indicaciones del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI).

4 RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1 Muestreo

4.1.1 Biomasa de *Apis mellifera*

En la Figura 11 se observan las imágenes estereoscópicas de dos abejas *Apis mellifera*, tomadas de la biomasa total recolectada, en A se observa la abeja antes del secado, en B se muestra un ejemplar después de secar durante 15 días a 70 °C. Después del secado, se observa un cambio de color a tonalidades más oscuras y un menor pelaje.

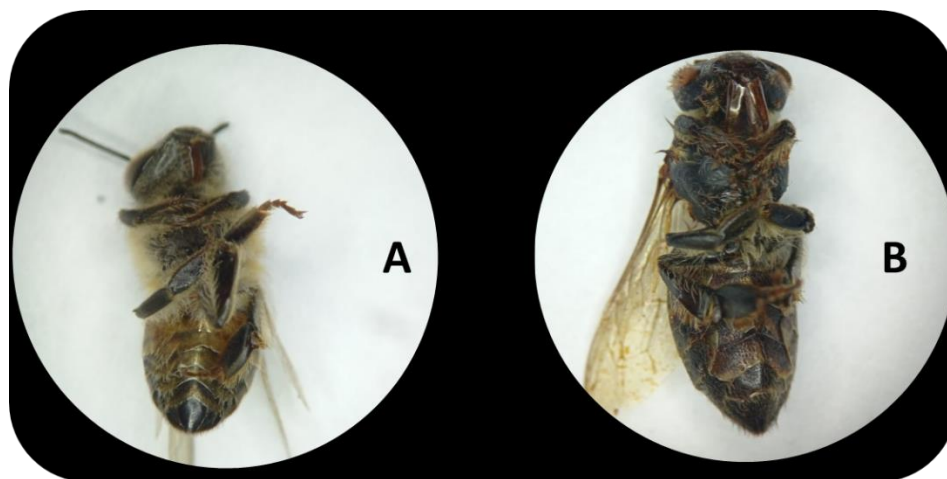


Figura 11. Imágenes estereoscópicas de *Apis mellifera*. A) abeja a temperatura ambiente, B) abeja a temperatura ambiente después de secar durante 15 días a 70 °C.

De los datos obtenidos en el análisis de varianza de la medición de la biomasa de las abejas *Apis mellifera*, se obtuvo una masa promedio individual de alrededor de $0,104 \pm 0,001$ g por individuo a temperatura ambiente, como se observa en la Figura 12, en el grupo de datos A, se presenta la dispersión de la masa promedio individual de 5 abejas obreras elegidas

al azar, mientras que, en B, se observa la dispersión de la masa promedio individual de 3 grupos de 30 abejas, lo anterior denota que es mejor registrar su peso en grupos y dividir en el número de individuos del grupo, ya que aunque el valor P indica que las medias entre ambos grupos no tienen diferencias significativas, en el grupo B se puede apreciar que existe una menor dispersión de los datos. El rango de masa encontrado de las abejas concuerda con los de otros autores que también determinaron que la masa promedio de *Apis mellifera* se encuentra entre 0,06 g y 0,14 g por individuo (Arca et al., 2016).

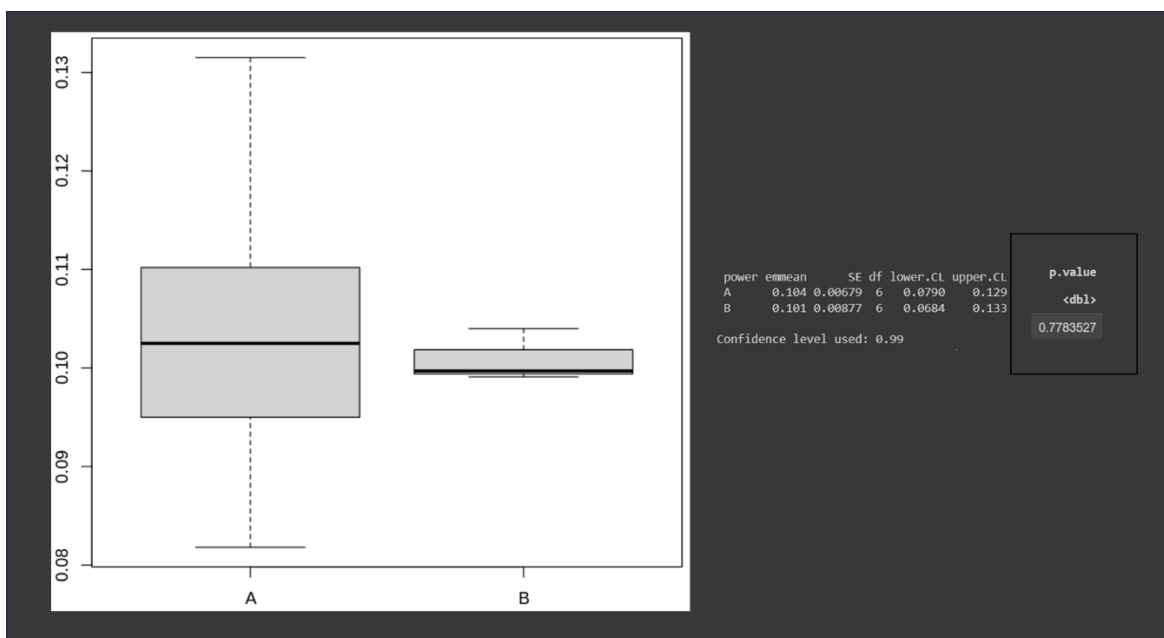


Figura 12. ANOVA en forma de caja y bigotes del peso individual de las abejas *Apis mellifera* con la que se realizó la extracción de quitosano. A) Variación de la biomasa de 5 abejas elegidas aleatoriamente, B) biomasa individual promedio calculada de 3 grupos de 30 abejas cada uno.

En la Figura 13 se observa el PCA de los infrarrojos de algunos reportes preliminares, comparando las diferentes partes de las abejas en el infrarrojo, esta clasificación previa se hace con el objetivo de entender de manera estructural el material de partida, y sus

características químicas, como se evidencia en la figura, el exoesqueleto tiene una composición química diferente para cada una de sus partes, esto es importante, ya que, permite establecer la heterogeneidad de las muestras de quitina.

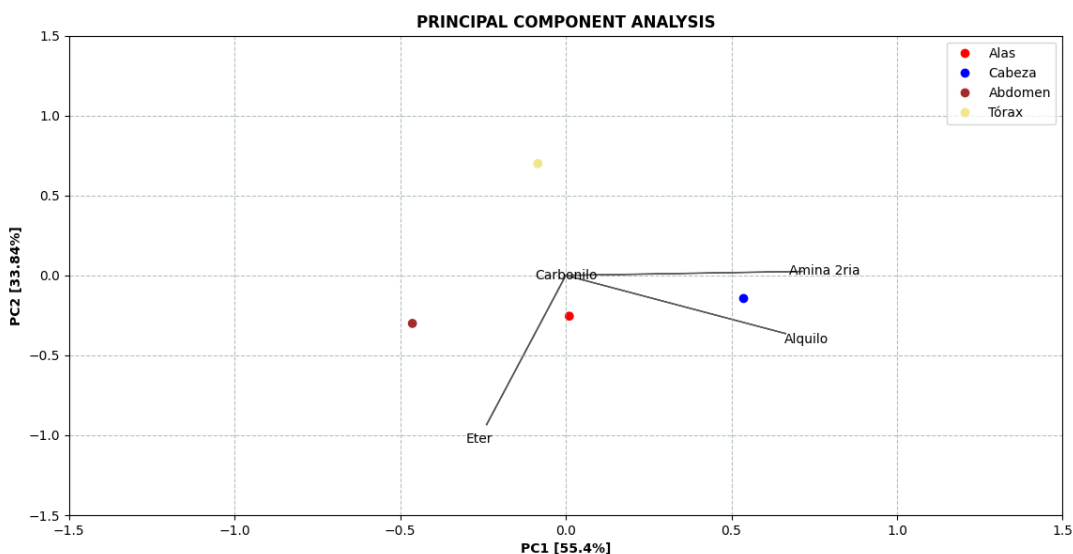


Figura 13. PCA comparativo entre partes de *Apis mellifera*.

Teniendo en cuenta la capacidad que mostró la técnica de ATR-FTIR y la ruta de análisis planteada, se buscó demostrar si es una herramienta útil para discriminar diferentes especies en abejas mediante la toma de espectros de la especie *Lestrimelitta* sp. y su comparación con los de *A. mellifera*. En la Figura 14, se comparan los espectros IR de *Apis mellifera* con *Lestrimelitta* sp. evidenciando que es posible diferenciar estas dos especies, esto es importante ya que con un método de bajo costo y poco tiempo de análisis se puede hacer una clasificación previa de la fuente de quitina que se vaya a utilizar.

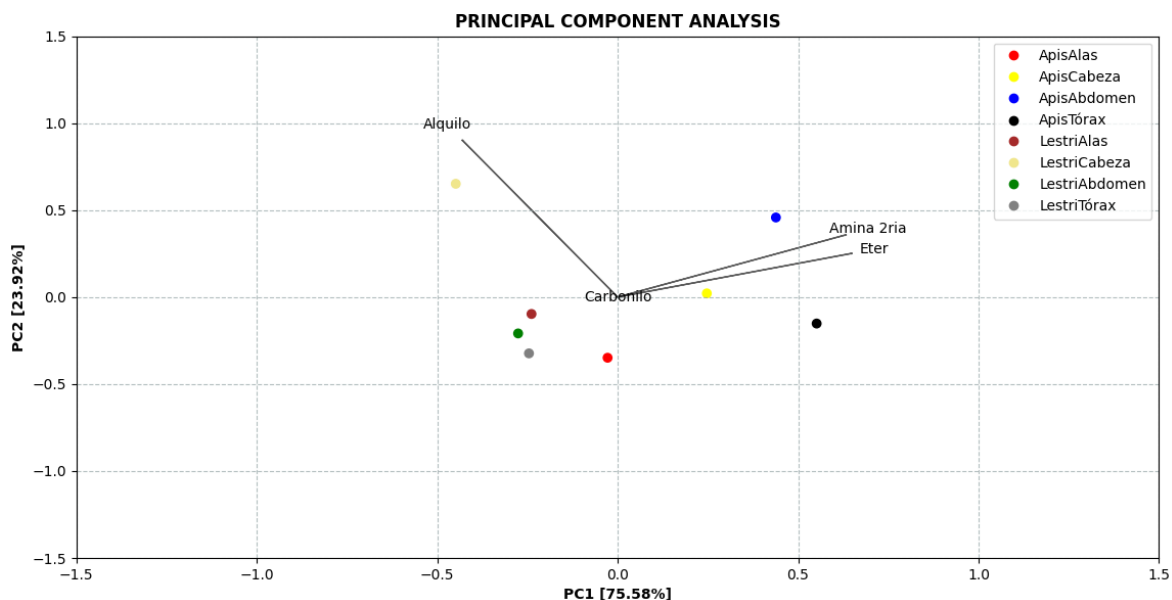


Figura 14. PCA comparativo de exoesqueletos entre *Apis mellifera* y *Lestrimelitta* sp.

Como se observa en ambos PCA, tanto las comparaciones entre partes individuales de las abejas, como entre especies diferentes, las diferentes partes logran agruparse dependiendo de sus principales grupos funcionales, es decir, las alas, el tórax, cabeza y abdomen, se diferencian entre sí por sus componentes principales, sin embargo, entre diferentes especies, también se observa una predominancia por grupos funcionales distintos entre sí. Por lo que se puede concluir, que cada parte de la abeja presenta un perfil espectroscópico diferencial, pero comparable con cada individuo de la misma especie y género.

4.2 Extracciones

4.2.1 Extracción de quitosano

Para esta actividad inicialmente se siguió el procedimiento reportado en literatura, es decir, la molienda de las abejas en un mortero sin ningún aditivo, pero no fue posible pulverizar el material para obtener un tamaño de partícula homogéneo, por lo cual, se realizó una

molienda de las abejas con NaCl (Figura 15D), evitando aglutinamiento debido a las grasas internas y el agua remanente de las abejas (Nowak et al., 2021).

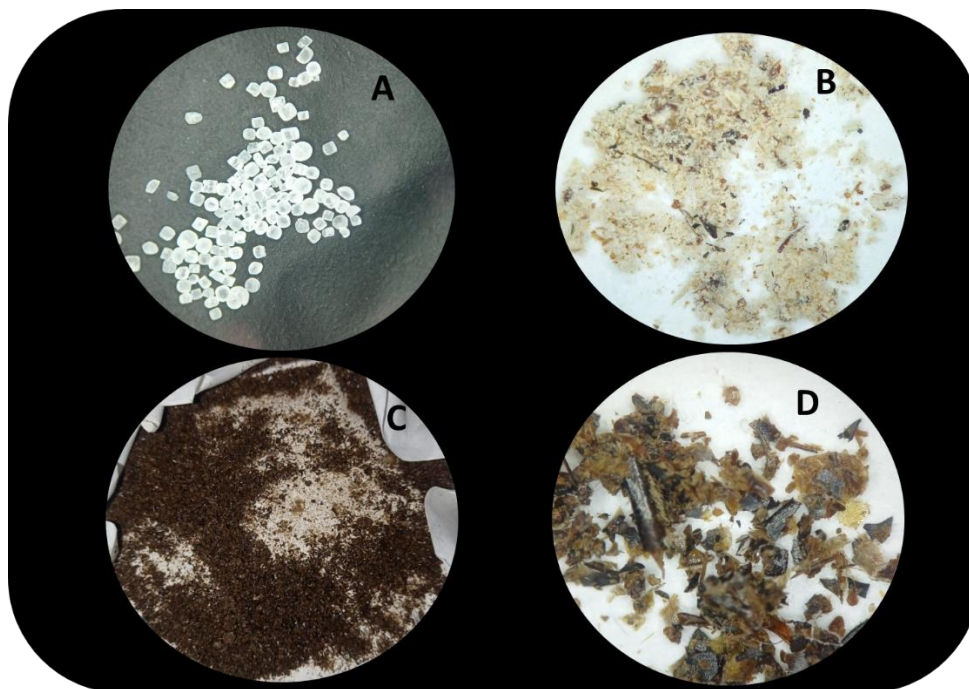


Figura 15. A) imagen estereoscópica de los cristales de NaCl utilizados para la molienda de las abejas. B) imagen estereoscópica de la biomasa de las abejas macerada con la sal. C) fotografía de tamaño original de la biomasa de *Apis mellifera* macerada, después de haber sido lavada y secada. D) imagen estereoscópica de la biomasa macerada después del lavado y secado.

Posteriormente, se realizó un proceso de lavado con agua destilada para retirar el NaCl. Al momento de lavar la biomasa, se observó que, con sólo el proceso de molienda aplicado, hay un aumento en la coloración ámbar presente en el filtrado, como se muestra en la

Figura **16**, la cual demostró contener una parte de proteínas solubles en agua, provenientes de la maceración, que se corroboró mediante la medición en el espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 280 nm. (ver sección **4.2.1.2**).



Figura 16. Fotografía tamaño real del momento en que se filtró la biomasa macerada con NaCl, en el matraz Kitasato se observa el filtrado con la coloración ámbar.

Posteriormente, se efectuó la desacetilación de la quitina realizando extracciones con NaOH 1M y 3M. Para determinar cuál de las dos metodologías presentaba mejores resultados se realizó un análisis de varianza que se muestra en la Figura 17, el cual indica que existen diferencias significativas entre los porcentajes de quitosano obtenidos a concentraciones diferentes de hidróxido de sodio.

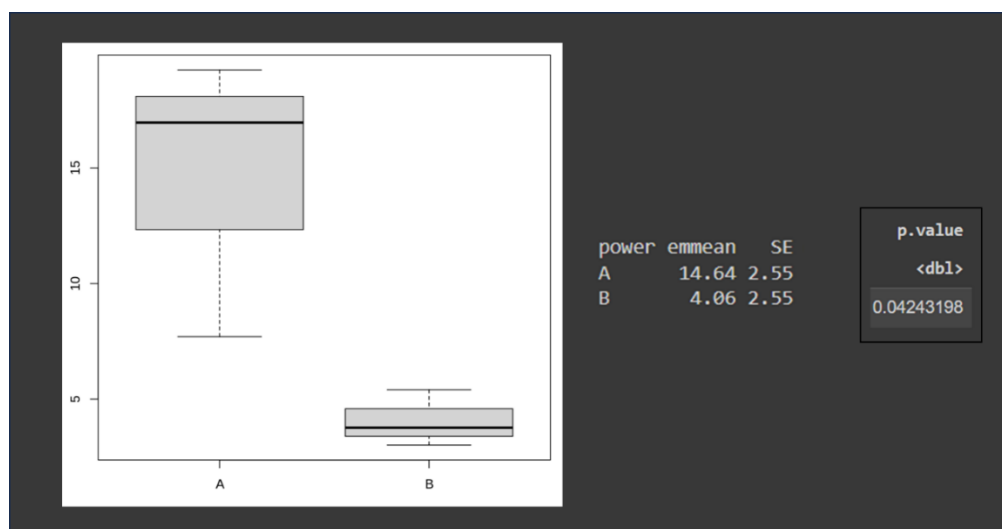


Figura 17. Análisis de varianza del porcentaje de quitosano obtenido a partir de: A) extracción con NaOH 1 M, B) extracción con NaOH 3 M.

La media del grupo de extracciones con NaOH 3M resultó ser menor y obtuvo una menor dispersión, esto puede deberse a que pudo presentarse una mayor desproteinización y desacetilación, ya que, se observó que el extracto obtenido fue más oscuro que con NaOH 1M, además, como se observa en la Figura 18, se evidencia una disminución de la absorbancia en los estiramientos de los enlaces N-H, lo que indica que hubo mayor porcentaje de desproteinización debido a la disminución de grupos amino de las proteínas, así como también se presentó una disminución en la absorbancia del estiramiento del grupo

carbonilo, lo que puede indicar que se obtuvo una mayor desacetilación y mayor pérdida de masa.

4.2.1.1 Análisis infrarrojo IR

Se tomaron espectros IR de los sólidos obtenidos con las diferentes concentraciones de NaOH, esto, se muestra en la Figura 18, donde se logra apreciar un comportamiento similar para todos los espectros.

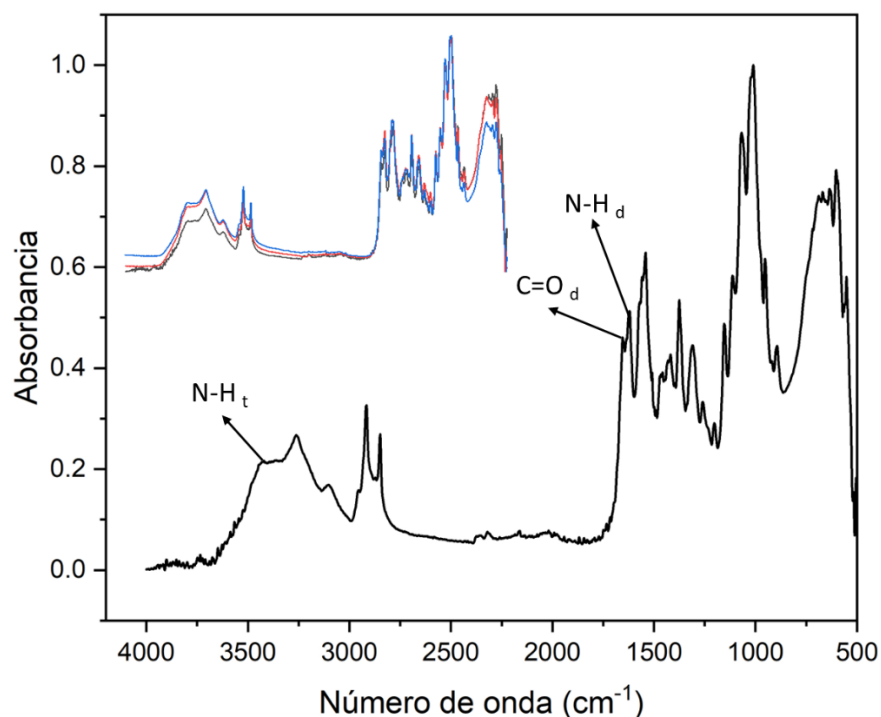


Figura 18. Espectro infrarrojo de los quitosanos obtenidos.

El porcentaje de desacetilación se determinó a partir de la ecuación (ecuación 2) propuesta por *Czechowska-Biskup*, con la cual se encontró la mejor correlación de los espectros de resonancia magnética con los espectros infrarrojos, relacionando los picos de absorción de la vibración N-H, alrededor de 3400 cm⁻¹, y la vibración del grupo carbonilo alrededor de 1658 cm⁻¹ (Czechowska-Biskup et al., 2012).

$$\% DD = 100 \% - \left(\frac{A_{1655}}{A_{3450} * 1,33} * 100 \% \right)$$

Ecuación 2

Donde % DD es el porcentaje de desacetilación, A1655 y A3450 es el área bajo la curva en 1655 y 3450 cm⁻¹, respectivamente.

El porcentaje de desacetilación encontrado para los dos tipos de extracciones se representa en la figura 19.

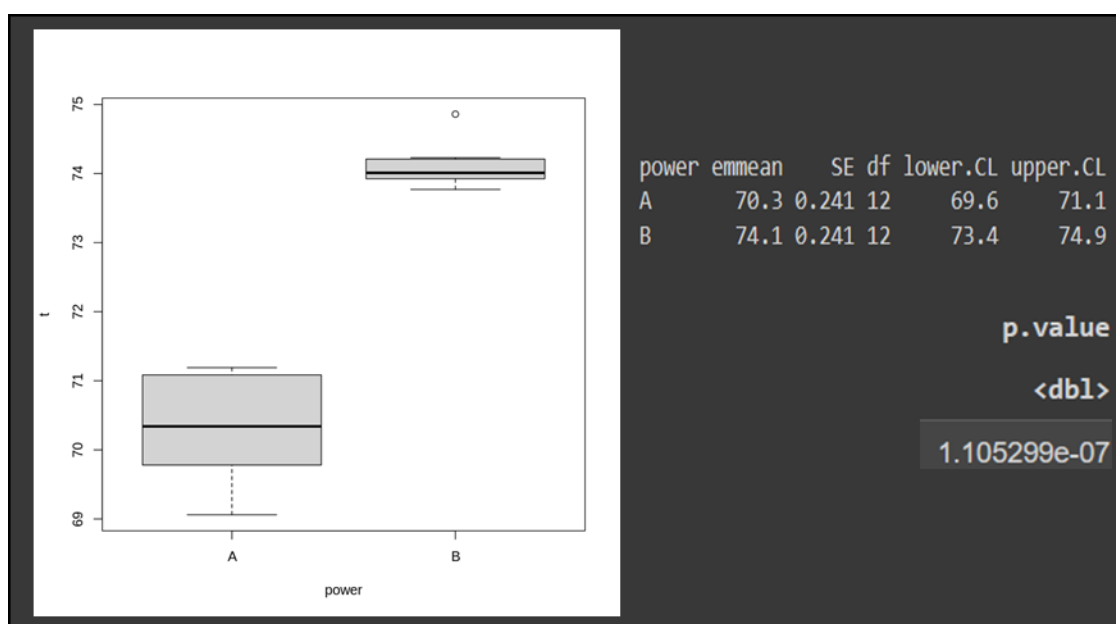


Figura 19. % de desacetilación de las muestras de quitosano obtenidas. A) muestras obtenidas a partir de una extracción con NaOH 1M, B) muestras obtenidas con NaOH 3M.

Se encontró que, existe una diferencia significativa entre los porcentajes de desacetilación obtenidos en ambas extracciones, con una desacetilación de alrededor del 70 %, sin embargo, en el apartado B de la ANOVA, se puede observar que el porcentaje de desacetilación de la extracción con NaOH 3M arrojó un porcentaje ligeramente mayor que el obtenido con NaOH 1M (74,1 %).

4.2.1.2 Espectrofotometría UV-Vis

Al filtrado obtenido después de lavar con 15 mL de agua destilada la biomasa de abejas maceradas, así como también al filtrado obtenido después de la extracción de quitosano con NaOH, se les determinó el porcentaje de proteína mediante UV-Vis, según la metodología propuesta por la empresa peak proteins, para la determinación de proteínas a 280 nm. En la Figura 20 se presenta el ANOVA(*PROTEIN CONCENTRATION BY UV ABSORBANCE AT 280NM*, s. f.).

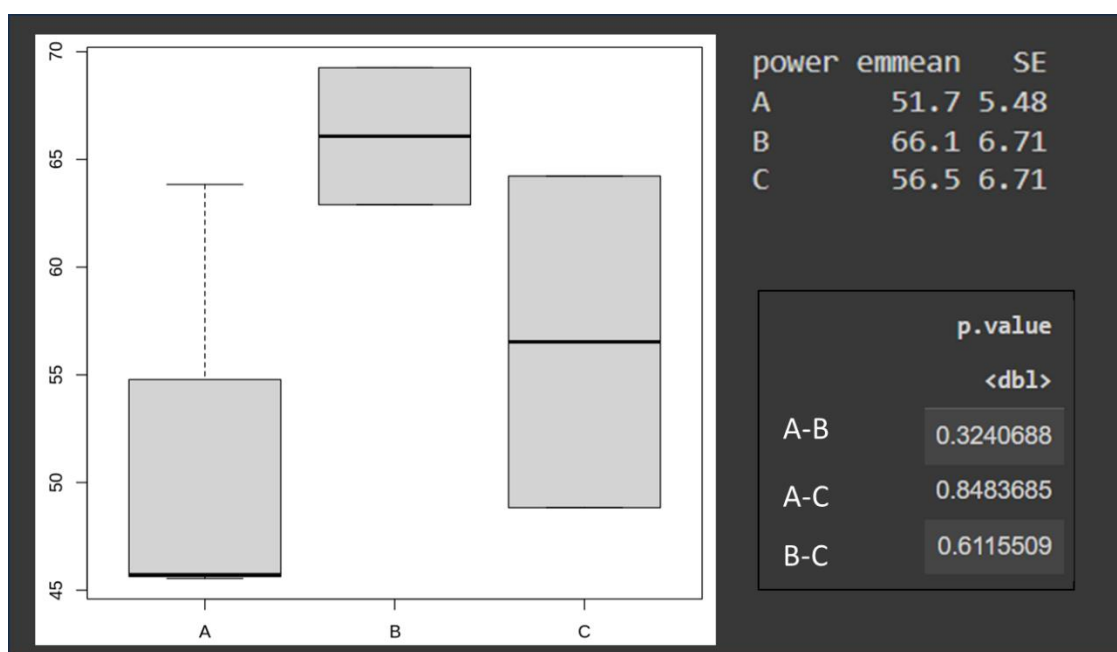


Figura 20. Porcentaje de proteína de la biomasa de *Apis mellifera*. A) . B) grupo de extracción con NaOH 1 M. B) Extracción con NaOH 3M.

Los resultados de las medias mostraron que, tanto la maceración de la biomasa con NaCl, como la extracción de quitosano con NaOH 1M y NaOH 3M, presentaron una media que oscila entre 51% y 66 % de desproteinización y no demuestra una diferencia estadísticamente significativa entre los 3 métodos aplicados, lo anterior es reproducible con los datos reportados en la literatura para el uso de soluciones básicas por tiempos de más

de 60 h, sin el uso del ultrasonido, esto indica que la modificación sintética planteada en el trabajo es positiva, y genera una novedad(Luschnig et al., 2006; Martinou et al., 1995).

4.2.2 Biomasa de yuca y extracción del almidón

En la Figura 21 A, se muestra el ANOVA aplicado a la matriz de los 30 trozos de yuca seleccionados al azar, en el que se observa una alta dispersión en la masa inicial que trae cada pedazo de yuca aleatoriamente, debido a que los comerciantes de este producto no miden específicamente la longitud a cortar al momento de realizar el despunte, así como también se suele cortar las partes defectuosas por las mismas personas que comercian este producto agrícola, por tanto, el porcentaje de desecho es mayor y el tamaño del trozo también; el peso de los trozos de yuca osciló entre 16 g hasta los 220 g, aproximadamente, generando una media de 74,6 g por cada trozo de yuca. Por otra parte, cuando estos pedazos fueron procesadas en el laboratorio, también se seleccionaron las mejores partes de la materia prima, recortando las partes magulladas o podridas después de registrar el peso inicial de los 30 trozos, por lo que, a algunos se les modificó aún más su peso, generando pérdidas en la pulpa obtenida, de la cual se obtuvo una media de alrededor del 51 % (Figura 21 B).

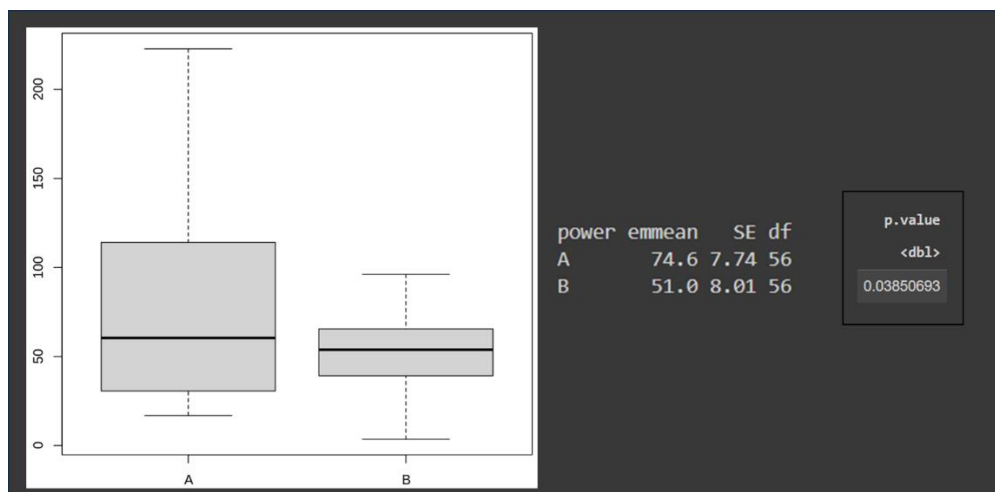


Figura 21. Gráfico del análisis de varianza del procesamiento de la yuca con la que se trabajó. A) Análisis de varianza de 30 trozos de yuca elegidos al azar para determinar el porcentaje de pulpa que se puede recuperar, B) dispersión el porcentaje de pulpa de los datos del diagrama A.

En la Figura 22 se observa el porcentaje de almidón obtenido a partir de la pulpa, el cuál arrojó una media de 9,27 % y el porcentaje de amilosa que contiene la pulpa fue de 16,28 %, valor que se encuentra en el rango del porcentaje de amilosa que contiene la yuca aunque, es menor del reportado para almidones de otras especies que contienen un porcentaje de amilosa por encima del 20 % (Cornejo Zuniga, 2015; Hernández-Medina et al., 2008). Lo anterior, se explica ya que las puntas suelen tener mayor fibra al ser las que están unidas a la parte superior de la planta.

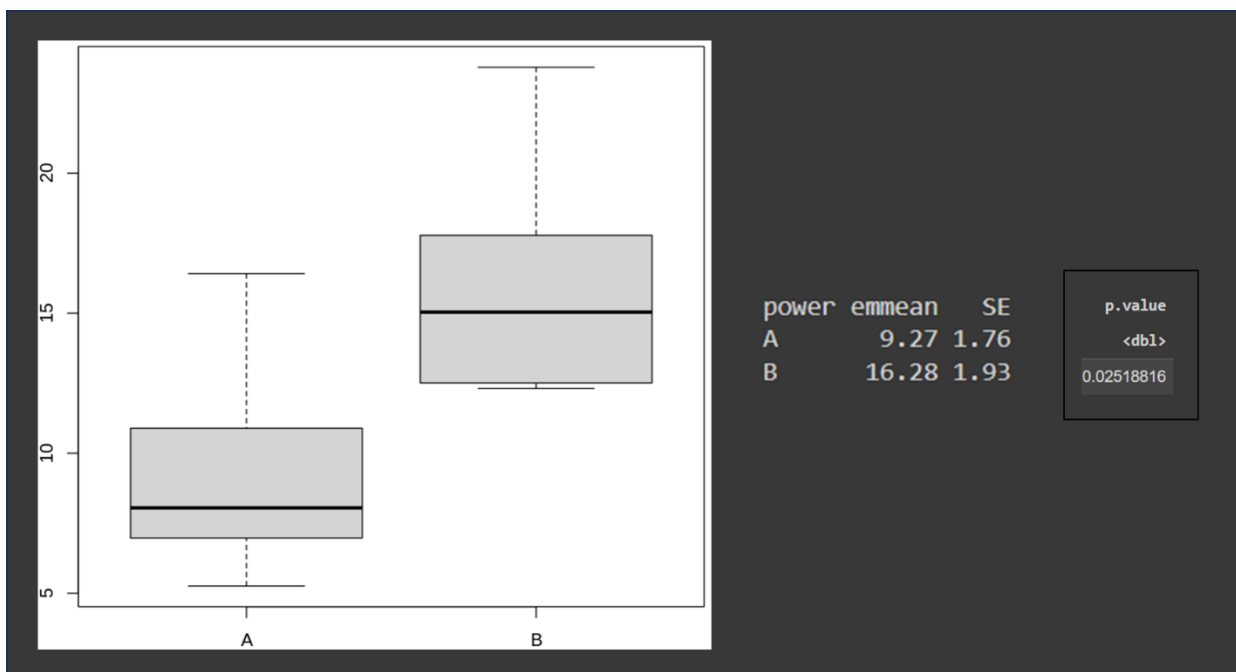


Figura 22. A) Dispersión de datos del porcentaje de almidón obtenido. B) dispersión del porcentaje de amilosa determinado por UV-Vis.

4.2.2.1 Espectroscopía infrarroja IR

Se tomaron espectros infrarrojos de la pulpa de la yuca, de la parte interna de la cáscara (peridermo) y de la fibra obtenida, esto permitió establecer 3 bandas principales de los grupos funcionales en los espectros (OH, CH, y CO) que fueron similares. En la Figura 23 se muestra a modo de ejemplo solo uno de ellos.

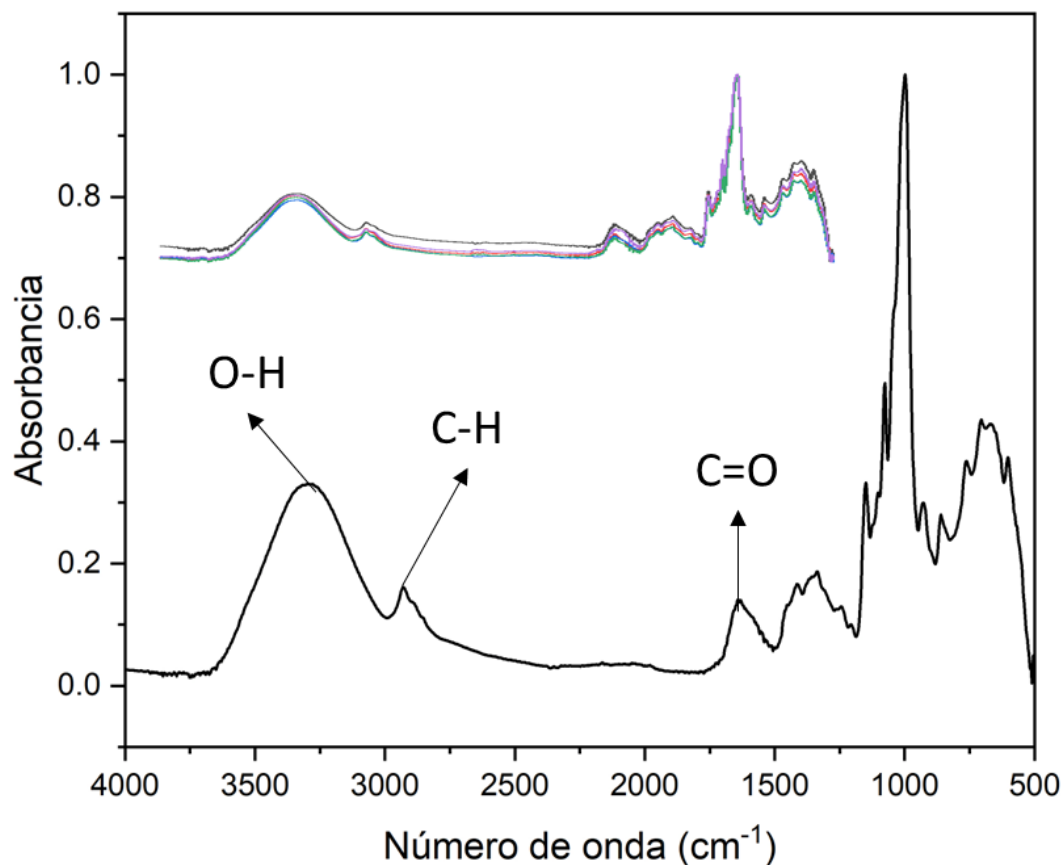


Figura 23. IR de 5 muestras de pulpa de yuca seleccionadas al azar.

Con los valores de la relación de absorbancia de las bandas OH/C-H, OH/C=O, C-H/CO de la pulpa de la yuca, a la cáscara (peridermo) y a la fibra; que corresponden a los tres componentes establecidos, C1, C2, y C3 respectivamente, se realizó un análisis de componentes principales. Los resultados del análisis PCA (Figura 24) indican que el infrarrojo permite diferenciar los 3 tipos de muestras a partir de estos componentes.

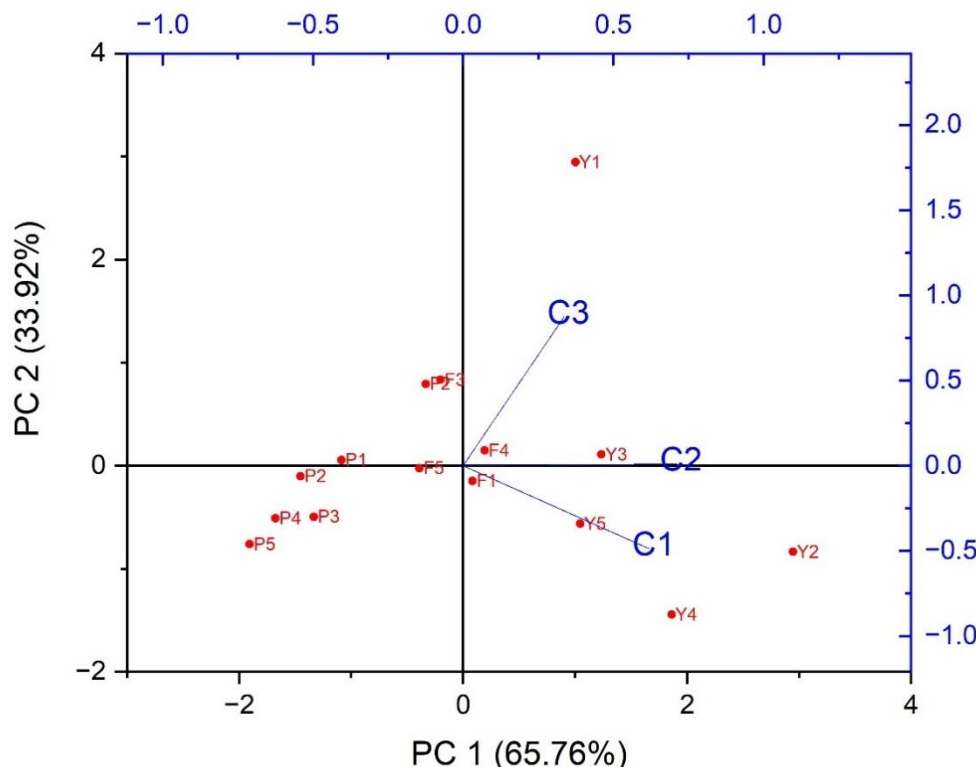


Figura 24. PCA de grupos funcionales entre el peridermo (p) y pulpa de yuca (y).

El componente principal de la yuca indica que existe una fuerte relación entre las bandas de OH y las bandas CH (característica de los lípidos y carbohidratos). Lo que indica que la espectroscopía infrarroja ATR-FTIR permite diferenciar el componente del peridermis y la pulpa, está última con mayor contenido de carbohidratos como el aprovechable en esta investigación.

4.2.2.2 Análisis termogravimétrico TGA

El análisis termogravimétrico del almidón mostró una temperatura máxima de alrededor de 156 °C en la primera etapa de evaporación de los volátiles y agua, y se mantuvo estable hasta 299 °C aproximadamente, con una pérdida del 10 % de masa antes de iniciar la etapa de descomposición del material. La temperatura máxima de descomposición se obtuvo a 322 °C aproximadamente con una pérdida de masa del 45 %; la descomposición del material terminó en 342 °C y una pérdida de masa del material de alrededor del 81 % antes

de llegar a la zona de formación de cenizas. Se obtuvo alrededor de 10,1 % de cenizas (Figura 25). Estos resultados muestran que almidón alberga agua en la estructura debido a sus grupos OH y que su descomposición por la autodegradación que inicia con la formación de esteres y pérdida de agua. En cuanto a la estabilidad del almidón obtenida, los resultados de este trabajo muestran que es ligeramente superior al reportado en la literatura y comparable para almidones modificados donde la estabilidad está de 320 a 350°C (N'zué et al., 2017).

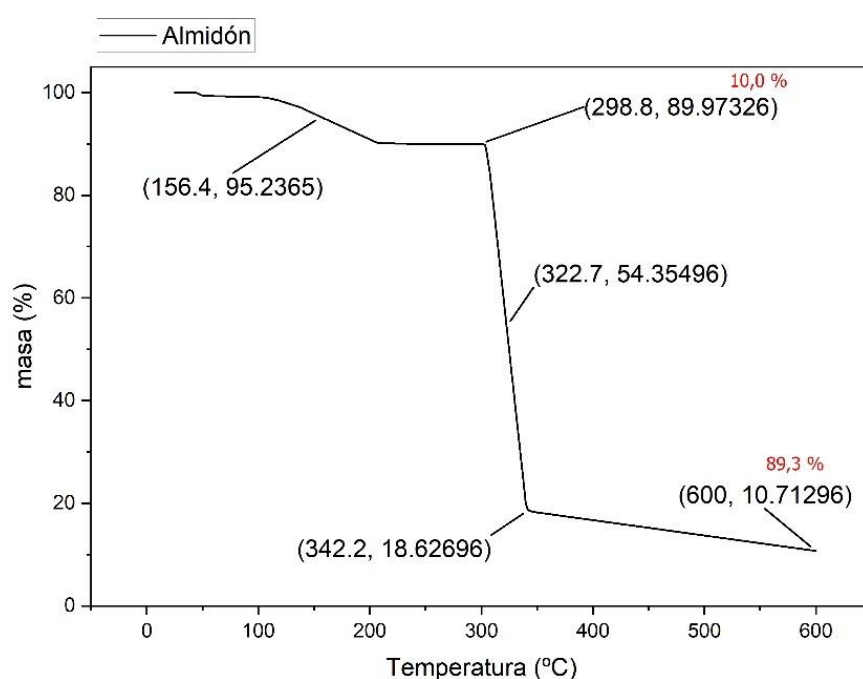


Figura 25. Termograma del almidón.

4.2.2.3 Microscopio

Las imágenes microscópicas del almidón se observan en la Figura 26(A, B y C); se puede apreciar gránulos aparentemente uniformes y semiesféricos, ligeramente alargados, este comportamiento es el esperado para este tipo material, sin la formación de agregados cilíndricos rectangulares o sin forma (Chandanasree et al., 2016).

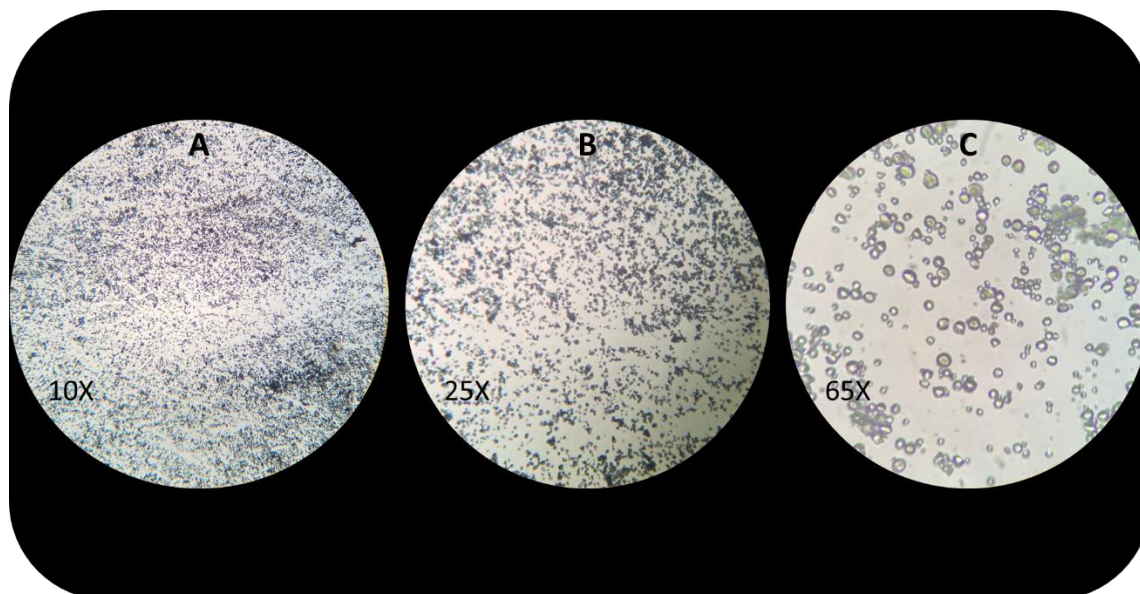


Figura 26. Imagen microscópica gránulos de almidón observados bajo diferentes aumentos. A) acercamiento de 10, B) acercamiento de 25, C) acercamiento de 65.

4.2.3 Extracción del hidrolato de romero

Una vez realizada la extracción del hidrolato de romero, y, después del secado del sólido remanente, el material presenta una pérdida en masa del $52,4 \pm 0,5\%$, la cual se debe a la deshidratación del material y la disolución de los metabolitos que se espera tengan grupos polares, este porcentaje está en concordancia con el reportado en la literatura para la extracción con maceración (Andrade et al., 2018).

4.2.3.1 Espectroscopía de infrarrojo IR

En la Figura 27 se presentan los espectros IR de las muestras de romero utilizadas antes y después de extraer el hidrolato, en ellas se puede observar una similitud en las posiciones de las bandas características.

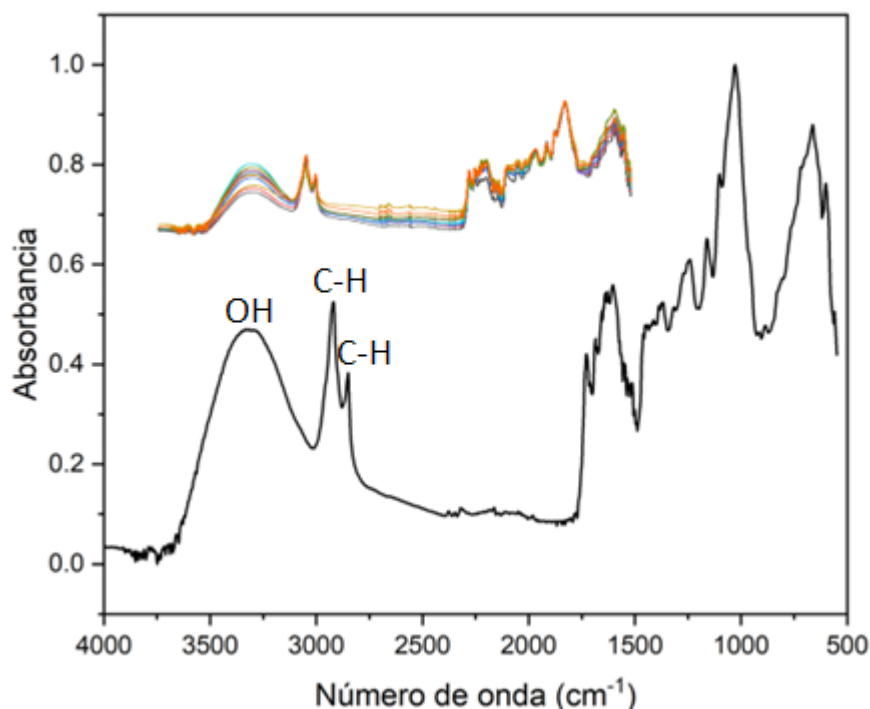


Figura 27. Espectro IR aplicado a las muestras de romero antes y después de extraer el hidrolato.

Las bandas anchas observadas a 3370 cm^{-1} se asignan a vibraciones de estiramiento de OH. La vibración de deformación por flexión en el plano del OH para el fenol está en la región de $1150\text{ a }1250\text{ cm}^{-1}$ (Michalska et al., 1996). Se logra apreciar un pico en el hombro de todo el rango para los ésteres en 1715 cm^{-1} . Se observa un pico en 1689 cm^{-1} correspondiente al grupo C=O (Lin-Vien et al., 1991; Stehfest et al., 2004). El pico de absorción a 1648 cm^{-1} se atribuye a la vibración de estiramiento del C=O en el ácido carboxílico, y 1612 cm^{-1} se atribuye al anillo (C=C aromático). Las vibraciones de estiramiento del anillo C-C ocurren en la región $1625\text{-}1430\text{ cm}^{-1}$ (Agatonovic-Kustrin et al., 2021).

4.2.3.2 Cromatografía de gases CG-MS

En la Figura 28 se presenta el cromatograma realizado al hidrolato de romero, utilizando etanol como solvente, donde se logra identificar 14 compuestos.

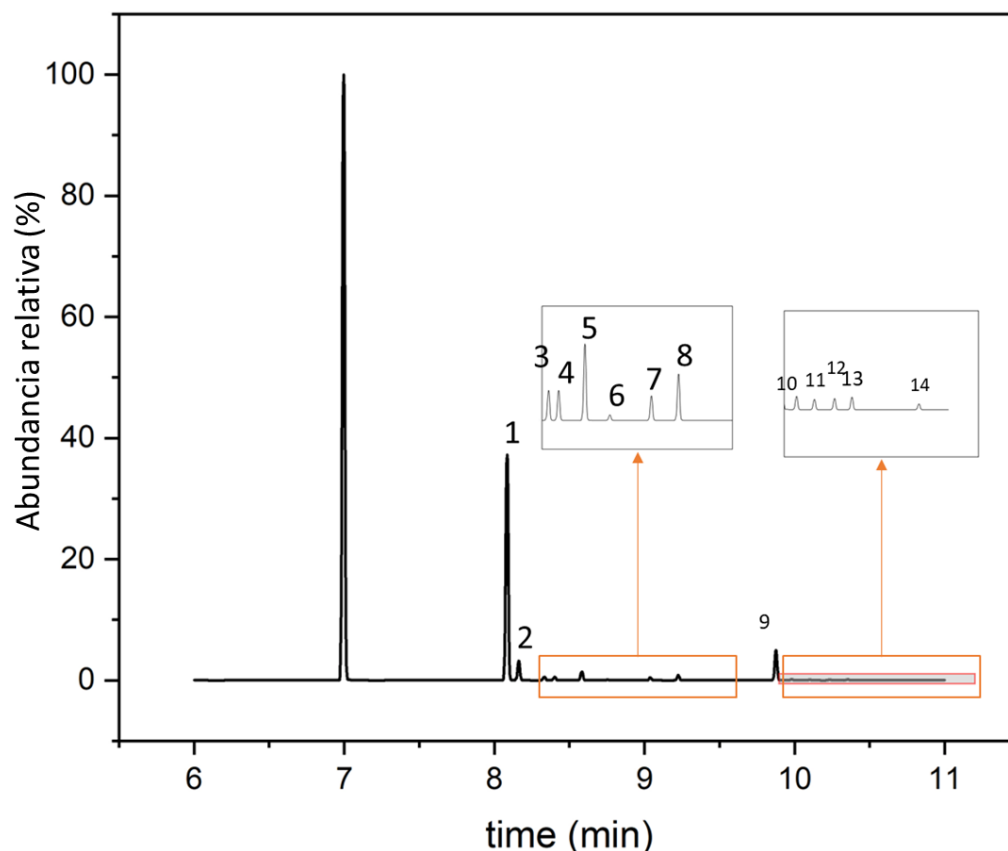


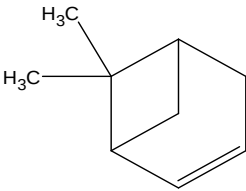
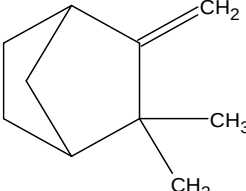
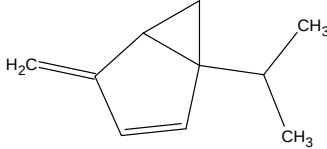
Figura 28. Cromatograma del hidrolato de romero extraído, se determinaron 19 compuestos por comparación con la base de datos, resumidos en la Tabla 1

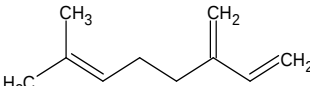
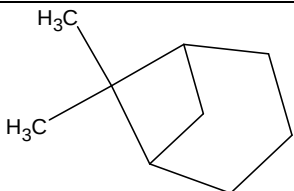
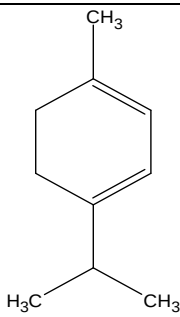
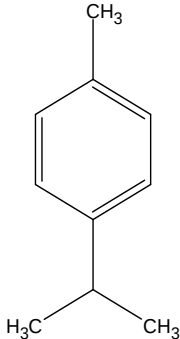
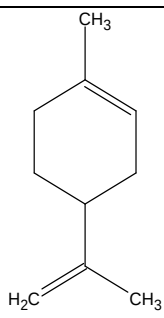
Mediante el análisis cromatográfico se logró determinar la identificación presuntiva del hidrolato, la cual se muestra en la tabla 1. En total se pudieron identificar 14 compuestos que fueron comparados con la base de datos presente en el equipo; el compuesto α -pineno presentó una mayor abundancia relativa con 74,6 %, seguido del canfeno, mientras que, el borneol presentó la menor abundancia relativa.

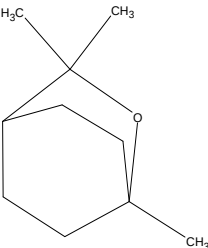
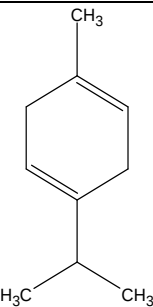
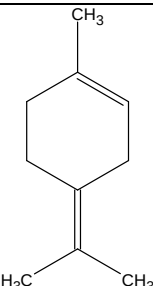
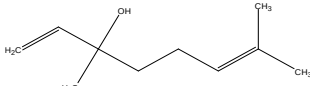
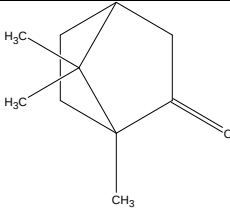
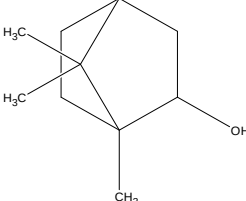
Con la metodología de extracción del hidrolato realizada en este trabajo se obtuvieron varios de los compuestos presentes en extractos de romero que emplean la hoja macerada, siendo el α -pineno uno de los componentes predominantes en abundancia relativa de los compuestos terpénicos, así como el 1,8-cineol (Flórez Chacón & Mojica Flórez, 2019; Jeevalatha et al., 2022; Pardo et al., 2021; W. Wang et al., 2008). En cuanto a las

extracciones etanólicas, se han reportado compuestos adicionales como taninos, flavonoides, alcaloides y polifenoles, sin embargo, en la mayoría de los casos, previamente al análisis cromatográfico, las hojas son sometidas a diferentes métodos para la obtención del hidrolato, como arrastre con vapor, maceración, o microondas. Estos procedimientos previos permiten romper las capas de las células más profundas de las hojas, donde se encuentran mayormente los terpenos, sin embargo, existe poca literatura en la que se determine la composición de las capas más profundas de los tejidos de las hojas de romero (Andrade et al., 2018; Azmir et al., 2013; Bai et al., 2010; Borrás-Linares et al., 2014; Damianova et al., 2010; Lesellier et al., 2021; Mosquero A., 2006; W. Wang et al., 2008).

Tabla 1. Compuestos separados por cromatografía de gases, utilizando una columna apolar y etanol como solvente.

No	Nombre	T de retención (min)	Abundancia relativa (%)	Molécula	Referencia
1	α -Pino	8,085	74,5938		(Jeevalatha et al., 2022; Romeu et al., 2007; W. Wang et al., 2008)
2	Canfeno	8,163	6,394934		(Jeevalatha et al., 2022; Romeu et al., 2007; W. Wang et al., 2008)
3	Dehidrosabineno	8,334	1,101115		

4	β -Mirceno	8,403	1,10318		(Jeevalatha et al., 2022; Romeu et al., 2007; W. Wang et al., 2008)
5	β -Pineno	8,583	2,811664		(W. Wang et al., 2008)
6	α -Terpineno	8,754	0,20039		(Jeevalatha et al., 2022; W. Wang et al., 2008)
7	p-Cimeno	9,039	0,901757		(Jeevalatha et al., 2022; W. Wang et al., 2008)
8	Limoneno	9,225	1,702286		(Romeu et al., 2007; W. Wang et al., 2008)

9	1,8-Cineol	9,876	10,01332		(Jeevalatha et al., 2022; Romeu et al., 2007; W. Wang et al., 2008)
10	γ -Terpineno	9,981	0,286125		(Jeevalatha et al., 2022; W. Wang et al., 2008)
11	α -Terpinoleno	10,101	0.230346		(Jeevalatha et al., 2022; W. Wang et al., 2008)
12	Linalol	10,236	0.249972		(Jeevalatha et al., 2022; W. Wang et al., 2008)
13	Alcanfor	10,353	0.28096		(Romeu et al., 2007; W. Wang et al., 2008)
14	borneol	10,803	0.13015		(Romeu et al., 2007; W. Wang et al., 2008)

4.3 Mezclas realizadas

A continuación, se presentan los resultados obtenidos a partir de las diferentes mezclas realizadas, partiendo de la preparación de los agregados de cobre y plata, y finalizando en la síntesis de las biopelículas obtenidas.

4.3.1 Agregados de plata y de cobre

4.3.1.1 Estimación del diámetro de las nanopartículas a través de UV-Vis

Una vez se mezcló el hidrolato de romero con la solución de AgNO_3 y con la solución de cloruro de cobre, se observó de inmediato una coloración ámbar en la solución, la cual aumentó un poco su intensidad después del proceso de sonicación. En la Figura 29 se observa los espectros de A) el hidrolato, B) nanopartículas de cobre, C) nanopartículas de plata; en ellos se puede apreciar la aparición de una zona de absorción entre 350 nm y 450 nm correspondiente a la zona de aparición del plasmón (gráficas B y C), mientras que esta zona no se observa en el hidrolato (gráfica A).

Para determinar el diámetro de las nanopartículas de cobre y plata se aplicó la ecuación 1 utilizando los parámetros L1 y L2 como las longitudes de onda de absorción inicial y absorción máxima del pico, respectivamente.

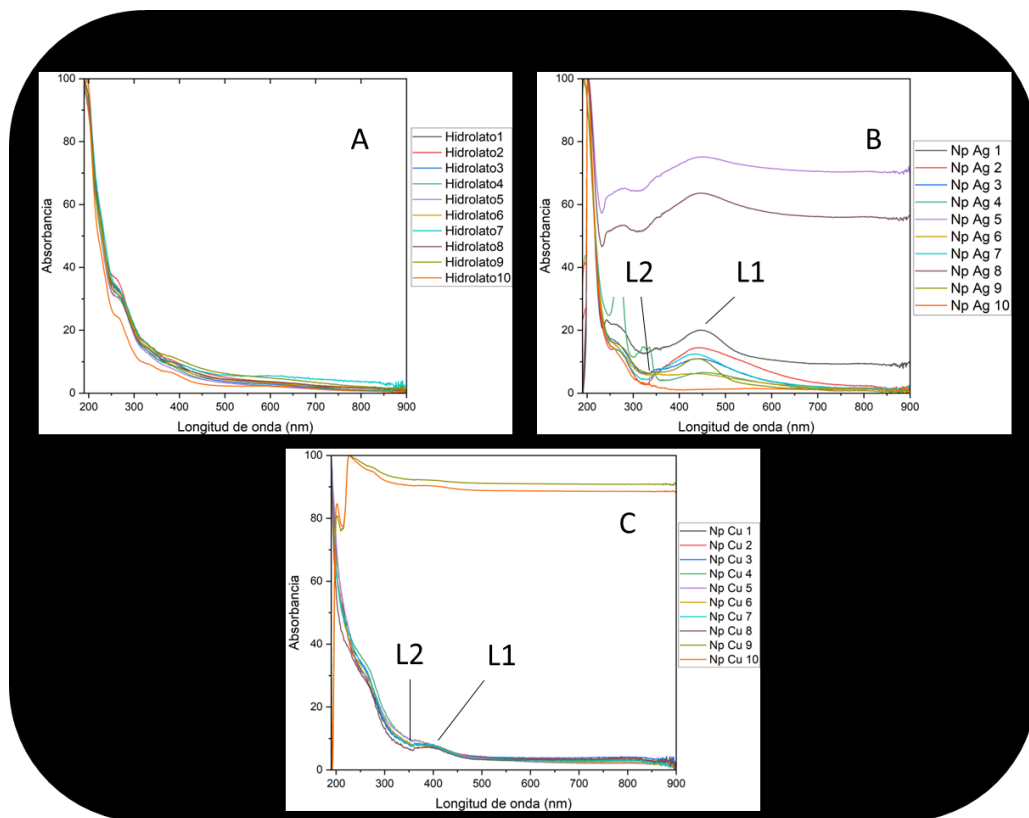


Figura 29. Espectros UV-Vis de A) Hidrolato de romero, B) nanopartículas de plata sintetizadas con hidrolato de romero, C) nanopartículas de cobre sintetizadas con hidrolato de romero.

Las nanopartículas de plata presentaron en promedio un mayor tamaño de 119,0 nm aproximadamente, mientras que, las nanopartículas de cobre presentaron un diámetro promedio de 81,2 nm (Figura 30); esto indica que las nanopartículas de plata crecieron más que las de cobre, lo cual contrasta con las concentraciones de las soluciones utilizadas para su preparación (cobre: 1,7 mM; plata: 1 mM).

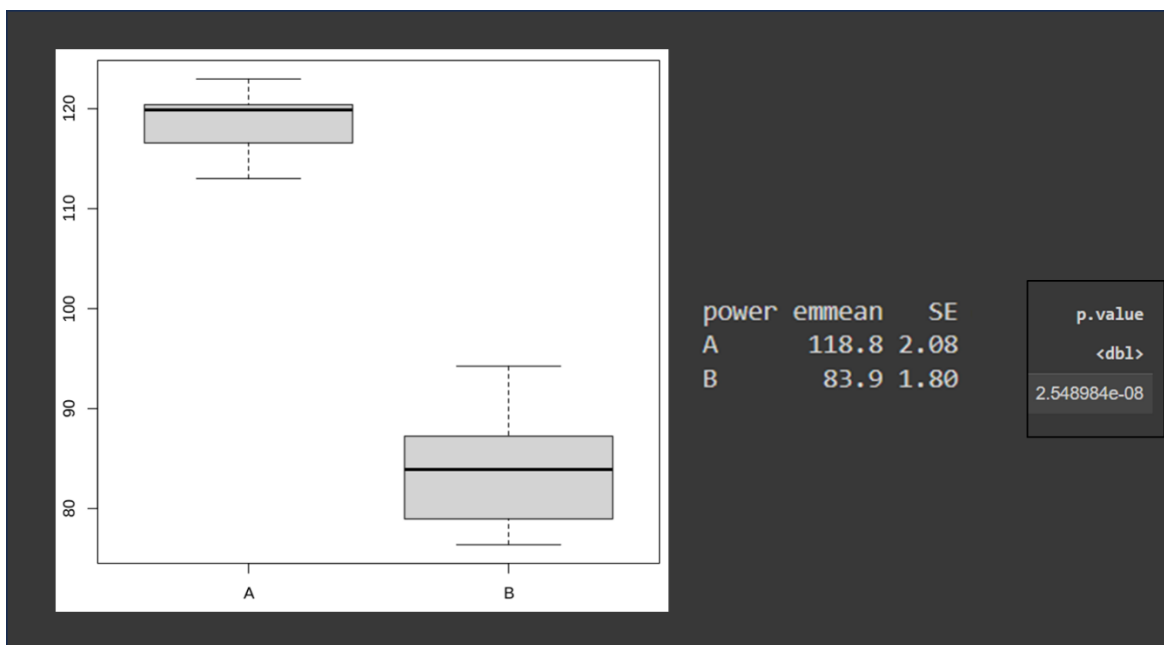


Figura 30. ANOVA del diámetro promedio determinado por UV-Vis de nanopartículas de plata y de cobre, A y B, respectivamente.

Lo anterior es concordante con lo reportado por otros autores, quienes además han encontrado que la combinación de nanopartículas bimetálicas de plata y cobre hace que disminuya su tamaño a medida que se aumenta la concentración de cobre.

Teniendo en cuenta la metodología reportada por Haiss en este trabajo se pudo establecer el tamaño aproximado de los agregados de plata y de cobre obtenidos, por lo que, de acuerdo con estos autores se espera que las nanopartículas sintetizadas con el hidrolato de romero se encuentren en un rango de tamaño aproximado al calculado, si se pudiese realizar un análisis TEM (Haiss et al., 2007; Rico-Moctezuma et al., 2010; Valodkar et al., 2011).

4.3.2 Biopelículas

En la Figura 31 se muestra el análisis de varianza del peso final obtenido y del grosor de las 7 biopelículas sintetizadas (medidas por triplicado. Siendo A) el peso final obtenido de

cada biopelícula, el cual osciló entre 3,5040 g y 10,5789 g, con una media de 5,1070 g; y B) el grosor de las biopelículas medido en milímetros (mm), que se encontraron en un rango de 0,33 mm hasta 0,85 mm, con un promedio de 0,55 mm.

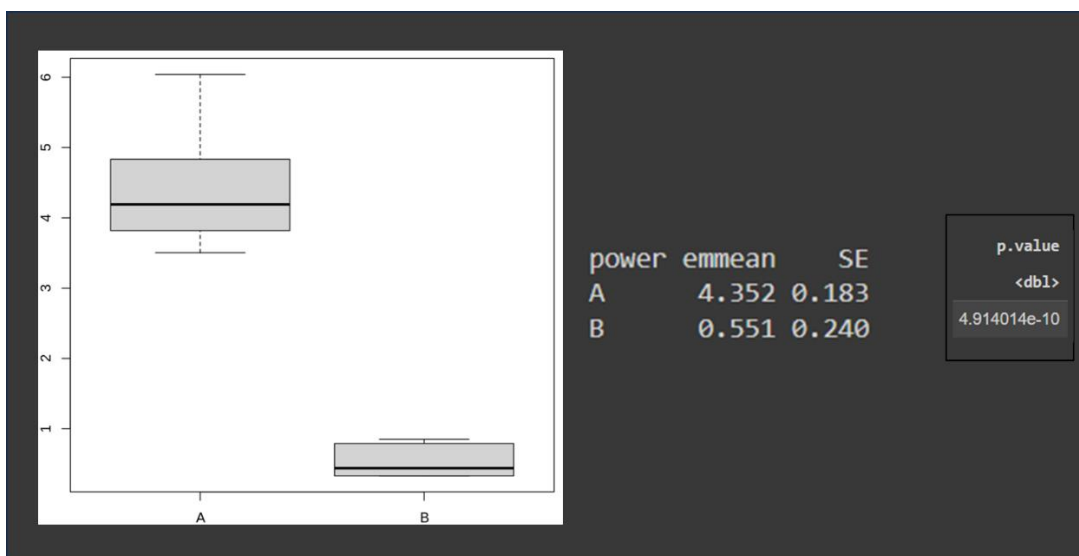


Figura 31. ANOVA de A) masa promedio de las biopelículas obtenidas (g), B) grosor promedio de las biopelículas (mm).

La variación en estas características de las biopelículas puede deberse a la diferencia en la composición del gel, ya que, la incorporación de metabolitos del romero, agregados de plata y cobre, y el quitosano modifican la disponibilidad y distribución de las esferas de coordinación de agua y de hidroxilos en la estructura del composite, esto implica que, en futuras investigaciones es importante evaluar de una manera muy precisa el tiempo de secado(Zapata-Luna et al., 2023).

4.3.2.1 Análisis IR

Los espectros IR tomados a las biopelículas se presentan en la Figura 32.

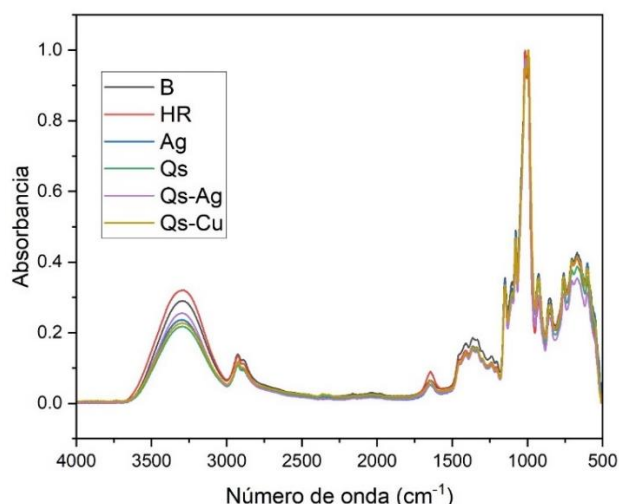


Figura 32. Espectro IR de las biopelículas sintetizadas, cargadas con: B) es el blanco, HR) hidrolato de romero, Ag) nanopartículas de plata, Qs) quitosano, Qs-Ag) quitosano-nanopartículas de plata, Qs-Cu) quitosano-nanopartículas de cobre.

El análisis de los espectros permite apreciar diferencias en las bandas de la región del OH alrededor de 3200 cm^{-1} , las bandas del CH alrededor de 2900 cm^{-1} , y los CO alrededor de 1645 cm^{-1} .

En la Figura 33 se presenta el análisis de PCA de la correspondencia de 3 componentes establecidos como las relaciones entre las áreas de OH/CH, OH/CO, y CH/CO. En el cual se observa que la integración estructural del quitosano y los agregados de plata y cobre son similares espectroscópicamente. Estos resultados son similares a los observados por Nasrollahzadeh, lo cual se explica teniendo en cuenta que la distribución de los agregados de plata y cobre se presenta en la superficie del biopolímero que puede ser la celulosa, pectina o alginato, que suelen estabilizarse por el quitosano sin generar cambios en los grupos funcionales. Este factor se espera que sea diferenciador en el quitosano distribuido en el almidón, ya que, el quitosano se poli condensa generando ésteres que suelen cambiar la relación estructural de los OH versus los C-H de los éter cíclicos(Ji et al., 2017; Nasrollahzadeh et al., 2021).

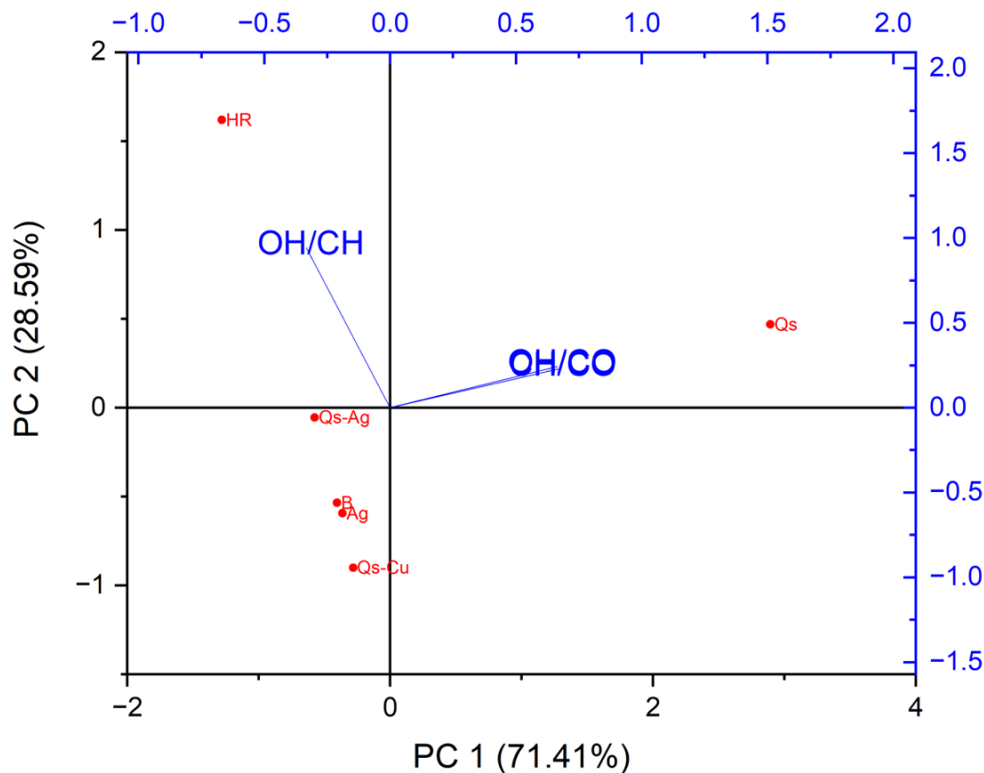


Figura 33. PCA de tres componentes, los cuales relacionan las vibraciones de los tres grupos funcionales principales de los espectros IR.

4.3.2.2 Análisis TGA aplicado a las biopelículas

El análisis termogravimétrico presentado en la Figura 34, de las biopelículas, permite establecer que desde 40 °C hasta 100 °C se inicia la pérdida de agua fisisorbida, agua activa y volátiles, la temperatura máxima en la pérdida de volátiles y agua es de 156 °C. A partir de 200 °C hasta los 302 °C se presentó una reducción del porcentaje de masa desde 95,5 % hasta 90,0 %; después de esta temperatura se inicia la descomposición del material. Al comparar los termogramas de todas las biopelículas no se encuentran diferencias apreciables; sin embargo, se observa un ligero incremento en la temperatura y disminución en la pérdida de porcentaje de masa a medida que aumenta la variedad de elementos activos con las que fueron elaboradas (hidrolato, nanopartículas de plata, nanopartículas de cobre, quitosano, y las mezclas de nanopartículas con quitosano).

Las diferencias notables comienzan a aparecer en las temperaturas máximas de descomposición del material, así como en la temperatura en la que inicia y termina la formación de cenizas. La temperatura máxima de descomposición posiblemente fue afectada por las nanopartículas agregadas a las biopelículas, aumentando ligeramente la temperatura máxima de descomposición y disminuyendo significativamente el porcentaje de masa en la etapa de la formación de cenizas. Las biopelículas que contenían las nanopartículas demostraron ser más estables que las que no tenían, debido a que el porcentaje de cenizas disminuyó de 17 a 20 %. En la formación de cenizas; las biopelículas con hidrolato y con quitosano, aumentaron la estabilidad con respecto al blanco, por tanto, podrían las interacciones provocadas por los metales con los biopolímeros y el hidrolato ser importantes para explicar la estabilidad. Algunos autores han reportado casos similares en los que la adición de nanoarcillas aumenta la estabilidad de las biopelículas en la formación de cenizas, así como la adición de quitosano a las biopelículas de almidón y sales de titanio en películas de quitosano. Teniendo en cuenta que los resultados de este estudio concuerdan con la literatura, es importante que, en futuras investigaciones se profundice en la determinación de la estabilidad de las biopelículas y de esta manera seguir contribuyendo con el estudio de materiales de desarrollo sostenible(Aguirre-Loredo et al., 2023; Cano et al., 2017; Domínguez Razo & Segura Campos, 2022; Hasan et al., 2020; Ji et al., 2016; Kanmani & Rhim, 2014).

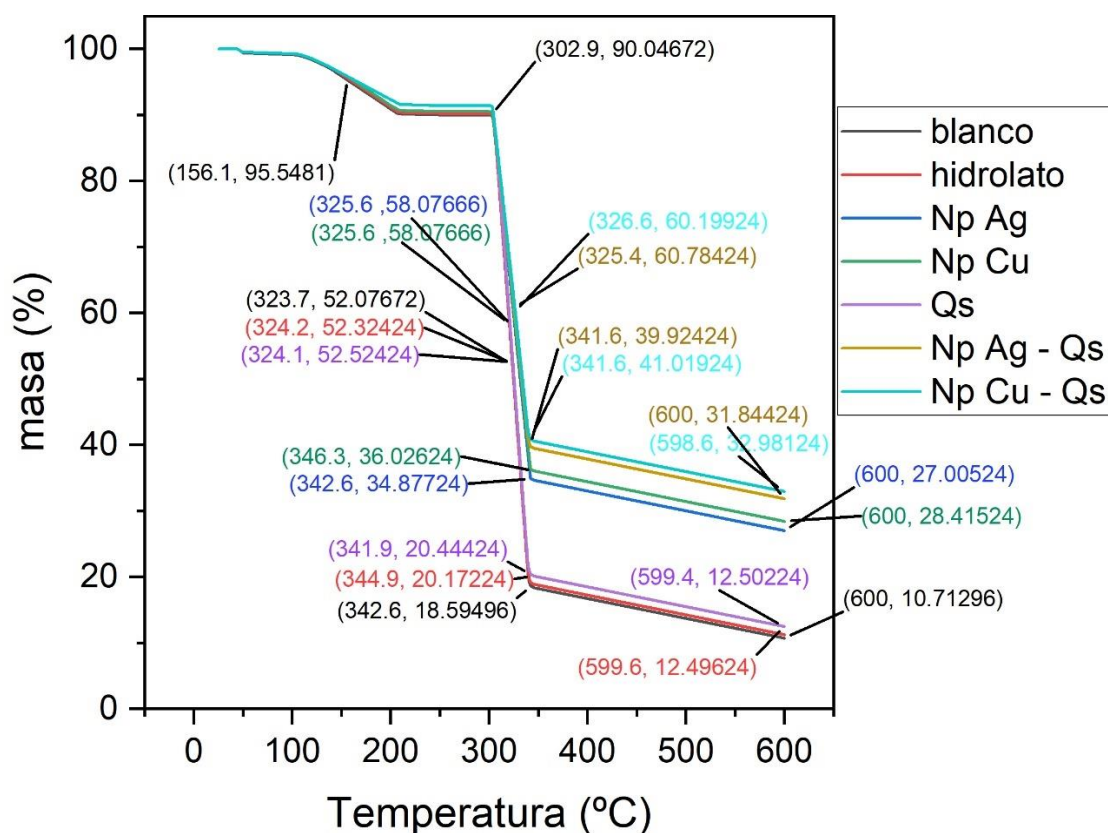


Figura 34. TGA biopelículas.

4.3.2.3 Resultados del SEM y EDS aplicados a las biopelículas

En la Figura 35 se presenta la micrografía de las biopelículas cargadas con Qs-Ag, y, en la Figura 35, la de las biopelículas cargadas con Qs-Cu. En ellas, se evidencia una morfología esférica ligeramente distorsionada, con una composición confirmada para cada agregado, los agregados son de 2 a 4 partículas, con una amplia dispersión en la matriz polimérica del almidón, la relación de carbono y oxígeno del EDS indica que el material se encuentra cubierto por capas del biopolímero en la superficie de sus cadenas, tal como lo demostró Nasrollahzadeh(Nasrollahzadeh et al., 2021).

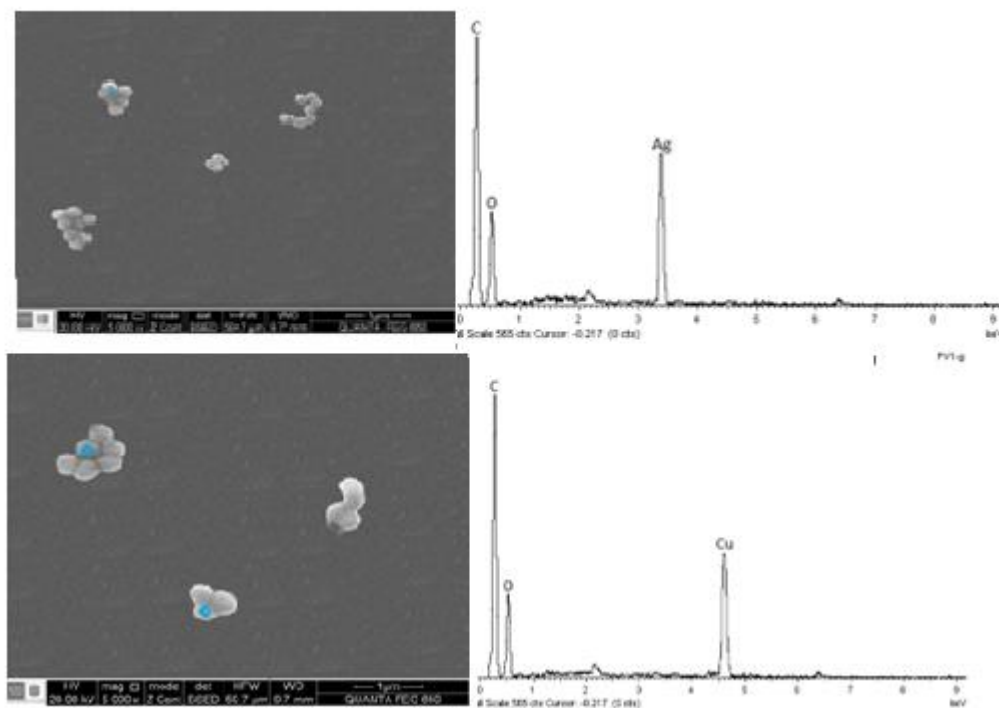


Figura 35. SEM- EDS QsAg y QsCu.

4.3.2.4 Permeabilidad de vapor de agua

La evaluación de la permeabilidad al agua en biopelículas representa un factor esencial que incide directamente en su eficacia en diversas aplicaciones, como la elaboración de envases o películas comestibles (Joaqui & VILLADA, 2013). Esta se define como la capacidad intrínseca de un material para permitir o resistir el flujo de agua a través de su estructura, por tanto, se elaboró una gráfica de la masa vs el tiempo medido en días para medir el índice de transmisión del vapor de agua permitido para las 7 biopelículas sintetizadas, siguiendo los parámetros establecidos en la norma ASTM E96-22 por el método del desecante (a partir de la Figura 36 se determinó los valores R de cada biopelícula;**Error! No se encuentra el origen de la referencia.**); se empleó la **Ecuación 3**, utilizando un delta de presión de vapor a temperatura ambiente de alrededor de 20 °C,

utilizando los valores teóricos determinados por Wexler(Wexler, 1976). Dichas mediciones pueden apreciarse en los diagramas de cajas y bigotes de la figura 37.

$$WVP \left[\frac{g}{s * m * Pa} \right] = \text{permeabilidad} * \text{grosor}.$$

Ecuación 3

Donde,

$$\text{permeabilidad} \left[\frac{g}{s * m^2 * Pa} \right] = \frac{WVTR}{\Delta P}$$

y

$$WVTR \left[\frac{g}{s * m^2} \right] = \frac{\Delta w}{\Delta t * A}$$

Los datos del ANOVA arrojaron que existen diferencias significativas en la media de la permeabilidad del vapor de agua de al menos una biopelícula. La prueba de Tukey entre componentes arrojó diferencias significativas entre las biopelículas A-G, B-G, C-E, C-F, D-E, D-F, E-G, y F-G.

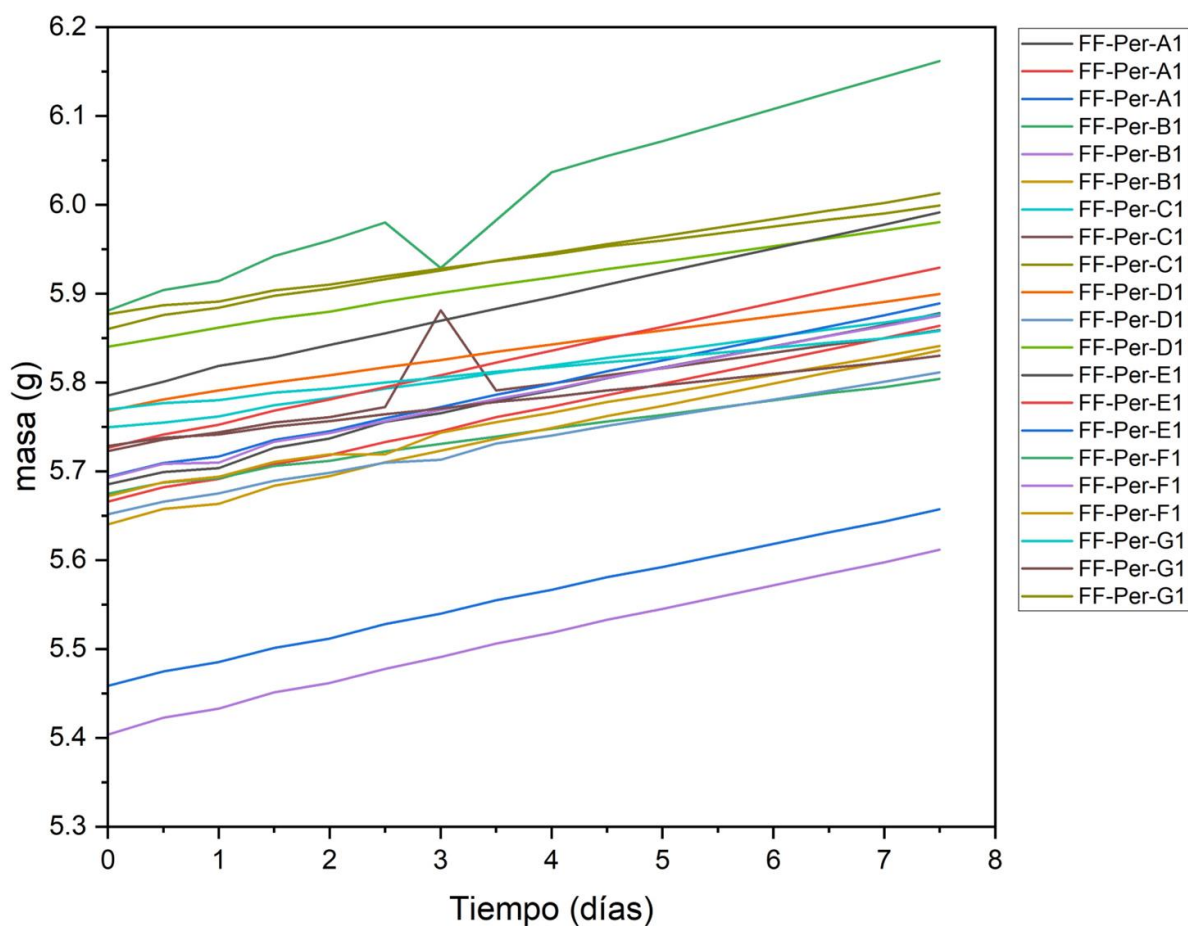


Figura 36. Tiempo vs masa ganada.

La Figura 37 muestra que la deposición de agregados de plata y cobre sobre la matriz de almidón con quitosano disperso presenta una menor permeabilidad para el cobre, lo anterior se debe a que los agregados estructurales de cobre son conocidos por su alta afinidad a los grupos amino y ácido del quitosano, impidiendo la movilidad de agua por puentes de hidrogeno a través de ellos (da Costa et al., 2024).

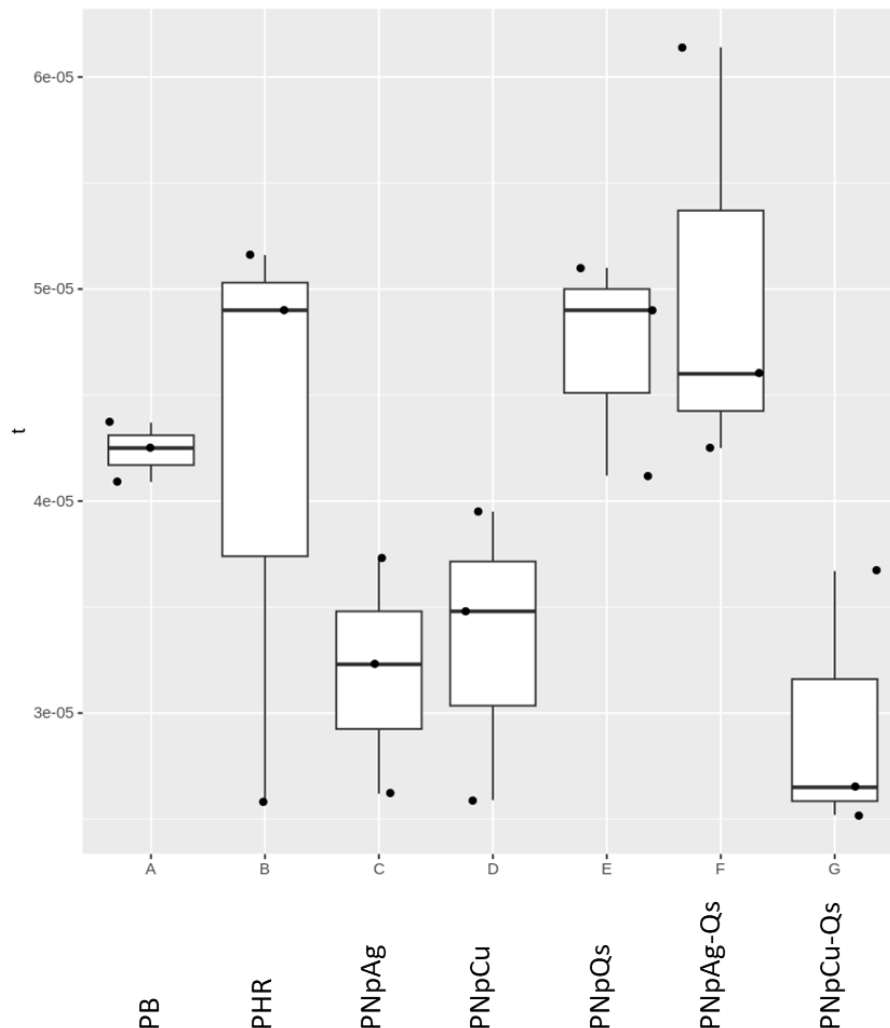


Figura 37. ANOVA del índice de permeabilidad promedio de cada biopelícula sintetizada. El subíndice P se utiliza para referirse a las “películas”, B, son biopelículas blanco, HR, son biopelículas de hidrolato de romero, Np Ag, biopelículas con nanopartículas de plata, Np Cu, biopelículas con nanopartículas de cobre, Qs, biopelículas con quitosano, Np Qs-Ag, biopelículas con quitosano y nanopartículas de plata, Np Qs-Cu, biopelículas con quitosano y nanopartículas de cobre.

4.3.2.5 Efecto antimicrobiano de las biopelículas

En las Figura 38, se presentan las imágenes de los resultados después de realizar las pruebas de pozos de las biopelículas frente a las bacterias gramnegativas *Escherichia coli*

y *Salmonella* sp., respectivamente, y, en la Figura 40; Error! No se encuentra el origen de la referencia., se muestran los resultados obtenidos frente a las bacterias grampositivas *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, respectivamente. Este análisis permitió observar si la siembra de la biopelícula generó la formación del halo alrededor, como se muestra en la figura 14-9, frente a *E. coli*. En las imágenes se logra apreciar como hubo la formación de halo alrededor de algunas biopelículas frente a algunas cepas (como en *E. coli*), mientras que, en otras, se aprecia poca o nula aparición del halo.

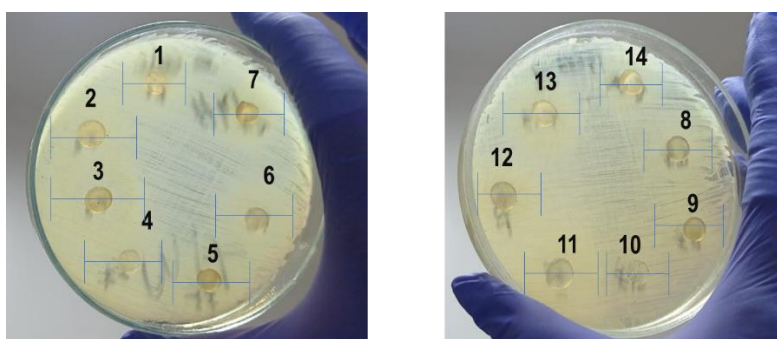


Figura 38. *E. coli*



Figura 39. *Salmonella*

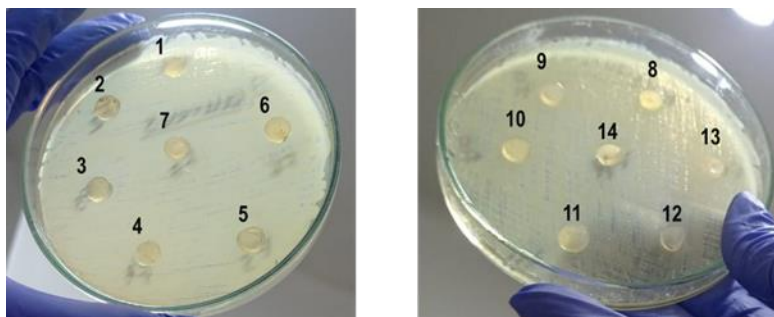


Figura 40. *Staphylococcus aureus*

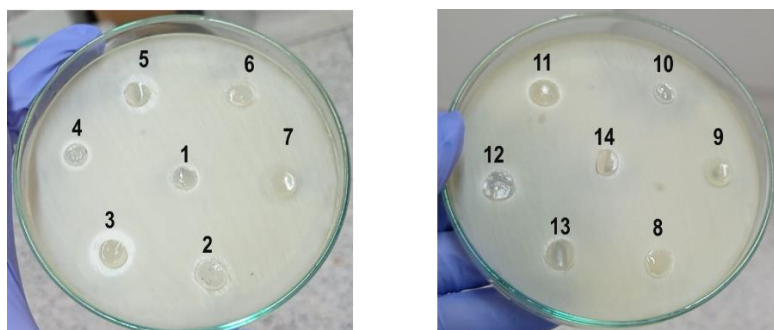


Figura 41. *Bacillus cereus*

Estos resultados se resumen en la Tabla 2. Los resultados permiten establecer que las biopelículas tuvieron un mayor impacto en el crecimiento de las cepas de *E. coli* seguido de la cepa de *Bacillus cereus* y de *Staphylococcus aureus* en tercer lugar, ya que fueron las cepas que mostraron un halo alrededor de la siembra; *Salmonella* sp. no presentó halo y creció sin problemas alrededor de toda la siembra. Los diámetros de estos halos se consignan en la Tabla 2.

Para las bacterias que mostraron un halo alrededor de la siembra se observó un crecimiento de las bacterias encima del mismo, denotado por la coloración amarillenta, esto significa que las biopelículas que formaron halo, actuaron sobre el microorganismo durante algún tiempo, pero después continuaron creciendo, lo cual permite suponer que el efecto podría ser bacteriostático y no bactericida.

Tabla 2. Resultados obtenidos del diámetro de la prueba de pozos de cada duplicado frente a *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus* y *B. cereus*, respectivamente.

Diámetro del halo formado en el medio de cultivo (mm)				
Biopelícula	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> sp.	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>
Blanco	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0
Hidrolato	15	0	15	12
Hidrolato	10	0	0	9
Ag	15	0	0	10
Ag	15	0	0	10
Cu	20	0	0	12
Cu	13	0	0	9
Quitosano	10	0	0	9
Quitosano	8	0	0	2
Ag + Quitosano	10	0	0	8
Ag + Quitosano	10	0	0	8
Cu + Quitosano	25	0	15	11.6
Cu + Quitosano	25	0	15	11.6

5 CONCLUSIONES

A partir de los residuos de yuca se logra extraer almidón con un porcentaje del 18% de amilosa, con una retención de humedad del 10% y una estabilidad térmica a 324°C, lo cual lo hace comparable con los resultados reportados en literatura para la pulpa de yuca comercial.

Se logró establecer que las condiciones favorables para la extracción y desacetilación del quitosano superior al 70% a partir de los exoesqueletos de abejas obreras de *Apis mellifera*, son: molturado con NaCl sólido y aplicación de desproteinización y desacetilación en un solo paso, empleando NaOH a 1M y con solo una hora de exposición en un sistema de reflujo asistido por microondas.

A partir de romero fresco se logró obtener un hidrolato rico en terpenos con grupos hidroxilos de tipo alcohol, lo cuales mostraron capacidad como agentes reductores, permitiendo las transiciones de los cationes de plata y cobre a sus estados elementales, generando partículas de $118,8 \pm 0,2$ nm y $83,9 \pm 0,2$ nm respectivamente.

Para la mezcla del quitosano y los agregados metálicos sintetizados, se logró desarrollar una matriz dispersora de almidón, la cual demostró homogeneidad lo que indica buena capacidad dispersora y la síntesis del composite, el cual al ser observado en SEM mostró evidencia de la presencia de Ag y Cu, con grupos funcionales asociados al quitosano.

Al evaluar los composites con almidón-quitosano y agregados de Ag y Cu, se logró demostrar que presentan actividad bacteriostática sobre *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* sp., y *Bacillus cereus*, en dónde se evidenció mayor efectividad para los agregados metálicos de Cu.

6 RECOMENDACIONES

Estudiar las características estructurales de las biopelículas sintetizadas, para determinar la interacción de los agregados de plata y cobre con los biopolímeros.

Diseñar un modelo de secado específico que permita obtener biopelículas con un grosor fijo ante la modificación en la formulación.

Comprobar si los biopolímeros presentan o no capacidad bactericida sobre las cepas estudiadas.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Abboud, Y., Saffaj, T., Chagraoui, A., El Bouari, A., Brouzi, K., Tanane, O., & Ihssane, B. (2014). Biosynthesis, characterization and antimicrobial activity of copper oxide nanoparticles (CONPs) produced using brown alga extract (*Bifurcaria bifurcata*). *Applied Nanoscience*, 4(5), 571-576. <https://doi.org/10.1007/s13204-013-0233-x>
- Agatonovic-Kustrin, S., Balyklova, K. S., Gegechkori, V., & Morton, D. W. (2021). HPTLC and ATR/FTIR Characterization of Antioxidants in Different Rosemary Extracts. *Molecules*, 26(19), 6064. <https://doi.org/10.3390/molecules26196064>
- Aguirre-Loredo, R. Y., Fonseca-García, A., Calambas, H. L., Salazar-Arango, A., & Caicedo, C. (2023). Improvements of thermal and mechanical properties of achira starch/chitosan/clay nanocomposite films. *Heliyon*, 9(6).
- Ai, Y., & Jane, J. (2015). Gelatinization and rheological properties of starch. *Starch - Stärke*, 67(3-4), 213-224. <https://doi.org/10.1002/star.201400201>
- Al-Ghamdi, A. A., Tadesse, Y., & Adgaba, N. (2020). Evaluation of major Acacia species in the nursery towards apicultural landscape restoration around Southwestern Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(12), 3385-3389. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.002>
- Allem, A. C. (1994). The origin of *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 41(3), 133-150. <https://doi.org/10.1007/BF00051630>
- ANATOMÍA EXTERNA DE LA ABEJA. <https://abejas.org/anatomia-externa-de-las-abejas/>

- Andrade, J. M., Faustino, C., Garcia, C., Ladeiras, D., Reis, C. P., & Rijo, P. (2018). *Rosmarinus officinalis* L.: An update review of its phytochemistry and biological activity. *Future Science OA*, 4(4), FSO283. <https://doi.org/10.4155/fsoa-2017-0124>
- Arca, O. C. R. V., Arca, B. S. M., & Silva, R. E. A. (2016). Características morfológicas, comportamiento higiénico y agresividad de abejas criollas *Apis mellifera* sp. *UCV-HACER. Revista de Investigación y Cultura*, 5(1), 16-23.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Bai, N., He, K., Roller, M., Lai, C.-S., Shao, X., Pan, M.-H., & Ho, C.-T. (2010). Flavonoids and Phenolic Compounds from *Rosmarinus officinalis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(9), 5363-5367. <https://doi.org/10.1021/jf100332w>
- Barragán Rivera, M. Á. (2020). *Apicultura campesina una alternativa para el desarrollo rural en Ocamonte, Santander* [Pontificia Universidad Javeriana]. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.10554.12407>
- Baygar, T., Sarac, N., Ugur, A., & Karaca, I. R. (2019). Antimicrobial characteristics and biocompatibility of the surgical sutures coated with biosynthesized silver nanoparticles. *Bioorganic Chemistry*, 86, 254-258. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.12.034>
- Bonsignore, M., Salvagio Manta, D., Mirto, S., Quinci, E. M., Ape, F., Montalto, V., Gristina, M., Traina, A., & Sprovieri, M. (2018). Bioaccumulation of heavy metals in fish, crustaceans, molluscs and echinoderms from the Tuscany coast. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 162, 554-562. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.044>

- Borrás-Linares, I., Stojanović, Z., Quirantes-Piné, R., Arráez-Román, D., Švarc-Gajić, J., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A. (2014). Rosmarinus Officinalis Leaves as a Natural Source of Bioactive Compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(11), 20585-20606. <https://doi.org/10.3390/ijms151120585>
- Boukhers, I., Boudard, F., Morel, S., Servent, A., Portet, K., Guzman, C., Vitou, M., Kongolo, J., Michel, A., & Poucheret, P. (2022). Nutrition, Healthcare Benefits and Phytochemical Properties of Cassava (*Manihot esculenta*) Leaves Sourced from Three Countries (Reunion, Guinea, and Costa Rica). *Foods*, 11(14), 2027. <https://doi.org/10.3390/foods11142027>
- Brodtschneider, R., Brus, J., & Danihlík, J. (2019). Comparison of apiculture and winter mortality of honey bee colonies (*Apis mellifera*) in Austria and Czechia. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 274, 24-32. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2019.01.002>
- Buitrago A., J. A. (1990). *La yuca en la alimentacion animal*. CIAT.
- Cano, L., Pollet, E., Avérous, L., & Tercjak, A. (2017). Effect of TiO₂ nanoparticles on the properties of thermoplastic chitosan-based nano-biocomposites obtained by mechanical kneading. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 93, 33-40. <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2016.11.012>
- Castellano, J. J., Shafii, S. M., Ko, F., Donate, G., Wright, T. E., Mannari, R. J., Payne, W. G., Smith, D. J., & Robson, M. C. (2007). Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. *International Wound Journal*, 4(2), 114-122. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2007.00316.x>
- Cataño, F. A., Moreno-Serna, V., Cament, A., Loyo, C., Yáñez-S, M., Ortiz, J. A., & Zapata, P. A. (2023). Green composites based on thermoplastic starch reinforced with micro- and nano-cellulose by melt blending—A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 248, 125939. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125939>

- Ceballos, R. L., Von Bilderling, C., Guz, L., Bernal, C., & Famá, L. (2021). Effect of greenly synthesized silver nanoparticles on the properties of active starch films obtained by extrusion and compression molding. *Carbohydrate Polymers*, 261, 117871. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117871>
- Chaerun, S. K., Prabowo, B. A., & Winarko, R. (2022). Bionanotechnology: The formation of copper nanoparticles assisted by biological agents and their applications as antimicrobial and antiviral agents. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 18, 100703. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2022.100703>
- Chan, S. S., Low, S. S., Chew, K. W., Ling, T. C., Rinklebe, J., Juan, J. C., Ng, E. P., & Show, P. L. (2022). Prospects and environmental sustainability of phyconanotechnology: A review on algae-mediated metal nanoparticles synthesis and mechanism. *Environmental Research*, 212, 113140. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113140>
- Chandanasree, D., Gul, K., & Riar, C. (2016). Effect of hydrocolloids and dry heat modification on physicochemical, thermal, pasting and morphological characteristics of cassava (*Manihot esculenta*) starch. *Food Hydrocolloids*, 52, 175-182.
- Chen, J., Long, Z., Dou, C., Wang, X., & Meng, Y. (2021). Processing and characterization of thermoplastic corn starch-based film/paper composites containing microcrystalline cellulose. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(15), 6443-6451. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11315>
- Chocano Peralta, N. del R., & Choque Quispe, D. (2019). PROPIEDADES FÍSICAS Y MECÁNICAS DE UNA BIOPELICULA FORMULADA CON ALMIDÓN DE PAPA (*Solanum tuberosum*) Y MUCILAGO DE NOPAL (*Opuntia ficus*).
- Chrastil, J. (1987). Improved colorimetric determination of amylose in starches or flours. *Carbohydrate Research*, 159(1), 154-158. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)90013-2](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)90013-2)

- Coma, V., Martial-Gros, A., Garreau, S., Copinet, A., Salin, F., & Deschamps, A. (2002). Edible Antimicrobial Films Based on Chitosan Matrix. *Journal of Food Science*, 67(3), 1162-1169. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb09470.x>
- Copeland, L., Blazek, J., Salman, H., & Tang, M. C. (2009). Form and functionality of starch. *Food Hydrocolloids*, 23(6), 1527-1534. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.09.016>
- Cornejo Zuniga, F. M. (2015). *Análisis de contenido amilosa—Amilopectina en seis variedades de arroz ecuatoriano*. [ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL]. <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/handle/123456789/30883>
- Cruz, E. P. D., Pires, J. B., Santos, F. N. D., Fonseca, L. M., Radünz, M., Dal Magro, J., Gandra, E. A., Zavareze, E. D. R., & Dias, A. R. G. (2023). Encapsulation of lemongrass essential oil into cassava starch fibers for application as antifungal agents in bread. *Food Hydrocolloids*, 145, 109105. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109105>
- Czechowska-Biskup, R., Jarosińska, D., Rokita, B., Ulański, P., & Rosiak, J. M. (2012). Determination of degree of deacetylation of chitosan-comparison of methods. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, 17, 5-20.
- da Costa, J. C., Bruni, A. R., Jesus, G. A., Alves, E. S., Oscar de Oliveira, S., Martins, A. F., & Bonafe, E. G. (2024). Enhancing fresh pear preservation with UV-blocking film coatings based on κ-carrageenan, cassava starch, and copper oxide particles. *Journal of Food Engineering*, 368, 111853.
- Daghian, S. G., Farahpour, M. R., & Jafarirad, S. (2021). Biological fabrication and electrostatic attractions of new layered silver/talc nanocomposite using *Lawsonia inermis* L. and its chitosan-capped inorganic/organic hybrid: Investigation on acceleration of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* infected wound healing. *Materials Science and Engineering: C*, 128, 112294. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112294>

- Damianova, S., Tasheva, S., Stoyanova, A., & Damianov, D. (2010). Investigation of Extracts from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) for Application in Cosmetics. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 13(1), 1-11. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2010.10643784>
- De Camargo Andrade-Molina, T. P., Shirai, M. A., Victória Eiras Grossmann, M., & Yamashita, F. (2013). Active biodegradable packaging for fresh pasta. *LWT - Food Science and Technology*, 54(1), 25-29. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.05.011>
- De Freitas, A. D. S. M., Da Silva, A. P. B., Montagna, L. S., Nogueira, I. A., Carvalho, N. K., De Faria, V. S., Dos Santos, N. B., & Lemes, A. P. (2022). Thermoplastic starch nanocomposites: Sources, production and applications – a review. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 33(7), 900-945. <https://doi.org/10.1080/09205063.2021.2021351>
- Domínguez Razo, A. N., & Segura Campos, M. R. (2022). IBERO-AMERICAN grains as a source of biomaterials for the manufacture of films and coatings: Green alternative of the XXI century for sustainable development. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(7). <https://doi.org/10.1111/jfpp.16709>
- Dos Santos, C. A., Seckler, M. M., Ingle, A. P., Gupta, I., Galdiero, S., Galdiero, M., Gade, A., & Rai, M. (2014). Silver Nanoparticles: Therapeutical Uses, Toxicity, and Safety Issues. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(7), 1931-1944. <https://doi.org/10.1002/jps.24001>
- El Knidri, H., Belaabed, R., Addaou, A., Laajeb, A., & Lahsini, A. (2018). Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 1181-1189. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.139>
- Faisal, M., Kou, T., Zhong, Y., & Blennow, A. (2022). High Amylose-Based Bio Composites: Structures, Functions and Applications. *Polymers*, 14(6), 1235. <https://doi.org/10.3390/polym14061235>

- Farhangi Ghaleh Joughi, N., Farahpour, M. R., Mohammadi, M., Jafarirad, S., & Mahmazi, S. (2022). Investigation on the antibacterial properties and rapid infected wound healing activity of silver/laterite/chitosan nanocomposites. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 111, 64-75. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2022.03.034>
- Fathima, A. A., Sanitha, M., Tripathi, L., & Muiruri, S. (2023). Cassava (*Manihot esculenta*) dual use for food and bioenergy: A review. *Food and Energy Security*, 12(1), e380. <https://doi.org/10.1002/fes3.380>
- Flórez Chacón, C. V., & Mojica Flórez, J. S. (2019). Determinación de la composición química de los aceites esenciales de Tomillo (*Thymus vulgaris*) y Romero (*Rosmarinus officinalis*) y su posible uso como antifúngico contra microorganismos fitopatógenos en productos agrícolas. *No objeto asociado*.
- Gallai, N., Salles, J.-M., Settele, J., & Vaissière, B. E. (2009). Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, 68(3), 810-821. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2008.06.014>
- Gasaly, N., Riveros, K., & Gotteland, M. (2020). Fitoquímicos: Una nueva clase de prebióticos. *Revista Chilena de Nutrición*, 47(2), 317-327. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182020000200317>
- Glaubitx, C., Bazzoni, A., Ackermann-Hirschi, L., Baraldi, L., Haeffner, M., Fortunatus, R., Rothen-Rutishauser, B., Balog, S., & Petri-Fink, A. (2024). Leveraging Machine Learning for Size and Shape Analysis of Nanoparticles: A Shortcut to Electron Microscopy. *The Journal of Physical Chemistry C*, 128(1), 421-427. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.3c05938>
- Godoy-Gallardo, M., Eckhard, U., Delgado, L. M., de Roo Puente, Y. J. D., Hoyos-Nogués, M., Gil, F. J., & Perez, R. A. (2021). Antibacterial approaches in tissue engineering using metal ions and nanoparticles: From mechanisms to applications. *Bioactive Materials*, 6(12), 4470-4490. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.04.033>

- González, V. H., Ospina, M., & Bennett, D. J. (2005). *Abejas altoandinas de Colombia: Guía de campo* (IAHV, Ed.).
- Gortari, M. C., & Hours, R. A. (2013). Biotechnological processes for chitin recovery out of crustacean waste: A mini-review. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(3). <https://doi.org/10.2225/vol16-issue3-fulltext-10>
- Goy, R. C., Britto, D. de, & Assis, O. B. G. (2009). A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros*, 19(3), 241-247. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282009000300013>
- Guadarrama, J. A. (2020). *Elaboración y caracterización de biopelículas elaboradas con quitosano y adicionadas con partículas de almidón*. Universidad Autónoma del estado de México.
- Hahn, T., Tafi, E., Paul, A., Salvia, R., Falabella, P., & Zibek, S. (2020). Current state of chitin purification and chitosan production from insects. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 95(11), 2775-2795. <https://doi.org/10.1002/jctb.6533>
- Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J., & Fernig, D. G. (2007). Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra. *Analytical Chemistry*, 79(11), 4215-4221. <https://doi.org/10.1021/ac0702084>
- Hasan, M., Gopakumar, D. A., Olaiya, N. G., Zarlaida, F., Alfian, A., Aprinasari, C., Alfatah, T., Rizal, S., & Khalil, H. P. S. A. (2020). Evaluation of the thermomechanical properties and biodegradation of brown rice starch-based chitosan biodegradable composite films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 156, 896-905. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.039>
- Hazmi, A. T., Ahmad, F. B., Maziati Akmal, M. H., Md Ralib, A. A., & Binti Ali, F. (2022). Fungal chitosan for potential application in piezoelectric energy harvesting: Review on experimental procedure of chitosan extraction. *Alexandria Engineering Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.aej.2022.08.020>

- Hernández-Medina, M., Torruco-Uco, J. G., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2008). Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28(3), 718-726. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000300031>
- Herreo García, F. (2004). *Lo que usted debe saber sobre las abejas y la miel* (CAJA ESPAÑA, Ed.).
- Hisham, F., Maziati Akmal, M. H., Ahmad, F. B., & Ahmad, K. (2021). Facile extraction of chitin and chitosan from shrimp shell. *Materials Today: Proceedings*, 42, 2369-2373. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.12.329>
- Hung, K.-L. J., Kingston, J. M., Albrecht, M., Holway, D. A., & Kohn, J. R. (2018). The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1870), 20172140. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2140>
- Jeevalatha, A., Kalaimathi, R. V., Basha, A. N., Kandeepan, C., Ramya, S., Loganathan, T., & Jayakumararaj, R. (2022). Profile of bioactive compounds in Rosmarinus officinalis. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 12(1), 114-122. <https://doi.org/10.22270/jddt.v12i1.5189>
- Ji, N., Liu, C., Zhang, S., Xiong, L., & Sun, Q. (2016). Elaboration and characterization of corn starch films incorporating silver nanoparticles obtained using short glucan chains. *LWT*, 74, 311-318. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.065>
- Ji, N., Liu, C., Zhang, S., Yu, J., Xiong, L., & Sun, Q. (2017). Effects of chitin nano-whiskers on the gelatinization and retrogradation of maize and potato starches. *Food Chemistry*, 214, 543-549.
- Joaqui, D. F., & VILLADA, H. S. (2013). Propiedades ópticas y permeabilidad de vapor de agua en películas producidas a partir de almidón. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(SPE), 59-68.

- Kalaivani, R., Maruthupandy, M., Muneeswaran, T., Hameedha Beevi, A., Anand, M., Ramakritinan, C. M., & Kumaraguru, A. K. (2018). Synthesis of chitosan mediated silver nanoparticles (Ag NPs) for potential antimicrobial applications. *Frontiers in Laboratory Medicine*, 2(1), 30-35. <https://doi.org/10.1016/j.flm.2018.04.002>
- Kanmani, P., & Rhim, J.-W. (2014). Physicochemical properties of gelatin/silver nanoparticle antimicrobial composite films. *Food Chemistry*, 148, 162-169. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.047>
- Kasana, R. C., Panwar, N. R., Kaul, R. K., & Kumar, P. (2017). Biosynthesis and effects of copper nanoparticles on plants. *Environmental Chemistry Letters*, 15(2), 233-240. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0615-5>
- Kaya, M., Mujtaba, M., Bulut, E., Akyuz, B., Zelencova, L., & Sofi, K. (2015). Fluctuation in physicochemical properties of chitins extracted from different body parts of honeybee. *Carbohydrate Polymers*, 132, 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.008>
- Khan, B., Bilal Khan Niazi, M., Samin, G., & Jahan, Z. (2017). Thermoplastic Starch: A Possible Biodegradable Food Packaging Material—A Review. *Journal of Food Process Engineering*, 40(3), e12447. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12447>
- Khayrova, A., Lopatin, S., & Varlamov, V. (2021). Obtaining chitin, chitosan and their melanin complexes from insects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, 1319-1328. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.086>
- Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J.-H., Park, S. J., Lee, H. J., Kim, S. H., Park, Y. K., Park, Y. H., Hwang, C.-Y., Kim, Y.-K., Lee, Y.-S., Jeong, D. H., & Cho, M.-H. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(1), 95-101. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.001>

- Klein, A.-M., Vaissière, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., & Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1608), 303-313. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>
- Kou, S. (Gabriel), Peters, L., & Mucalo, M. (2022). Chitosan: A review of molecular structure, bioactivities and interactions with the human body and micro-organisms. *Carbohydrate Polymers*, 282, 119132. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119132>
- Lansdown, A. B. G. (2002). Silver I: its antibacterial properties and mechanism of action. *Journal of Wound Care*, 11(4), 125-130. <https://doi.org/10.12968/jowc.2002.11.4.26389>
- Lesellier, E., Lefebvre, T., & Destandau, E. (2021). Recent developments for the analysis and the extraction of bioactive compounds from *Rosmarinus officinalis* and medicinal plants of the Lamiaceae family. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 135, 116158. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116158>
- Lindeboom, N., Chang, P. R., & Tyler, R. T. (2004). Analytical, Biochemical and Physicochemical Aspects of Starch Granule Size, with Emphasis on Small Granule Starches: A Review. *Starch - Stärke*, 56(3-4), 89-99. <https://doi.org/10.1002/star.200300218>
- Lin-Vien, D., Colthup, N. B., Fateley, W. G., & Grasselli, J. G. (1991). *The handbook of infrared and Raman characteristic frequencies of organic molecules*. Elsevier.
- Liu, H., Xie, F., Yu, L., Chen, L., & Li, L. (2009). Thermal processing of starch-based polymers. *Progress in Polymer Science*, 34(12), 1348-1368. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.07.001>
- Liu, P., Yu, L., Wang, X., Li, D., Chen, L., & Li, X. (2010). Glass transition temperature of starches with different amylose/amylopectin ratios. *Journal of Cereal Science*, 51(3), 388-391. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2010.02.007>

- Lokina, S., Stephen, A., Kaviyarasan, V., Arulvasu, C., & Narayanan, V. (2014). Cytotoxicity and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 76, 256-263. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.02.010>
- Lopes, C., Antelo, L. T., Franco-Uría, A., Alonso, A. A., & Pérez-Martín, R. (2018). Chitin production from crustacean biomass: Sustainability assessment of chemical and enzymatic processes. *Journal of Cleaner Production*, 172, 4140-4151. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.01.082>
- Luchese, C. L., Frick, J. M., Patzer, V. L., Spada, J. C., & Tessaro, I. C. (2015). Synthesis and characterization of biofilms using native and modified pinhão starch. *Food Hydrocolloids*, 45, 203-210. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.11.015>
- Luschnig, S., Bätz, T., Armbruster, K., & Krasnow, M. A. (2006). Serpentine and vermiform encode matrix proteins with chitin binding and deacetylation domains that limit tracheal tube length in *Drosophila*. *Current Biology*, 16(2), 186-194.
- Makabenta, J. M. V., Nabawy, A., Chattopadhyay, A. N., Jeon, T., Park, J., Lo, P. C., Nosovitski, S., Huang, R., Li, C.-H., Jiang, M., & Rotello, V. M. (2023). Antimicrobial polymer-loaded hydrogels for the topical treatment of multidrug-resistant wound biofilm infections. *Journal of Controlled Release*, 362, 513-523. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.09.002>
- Malik, M., Aamir Iqbal, M., Iqbal, Y., Malik, M., Bakhsh, S., Irfan, S., Ahmad, R., & Pham, P. V. (2022). Biosynthesis of silver nanoparticles for biomedical applications: A mini review. *Inorganic Chemistry Communications*, 145, 109980. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2022.109980>
- Marcano, D., & Hasegawa, M. (2018). *Fitoquímica orgánica*.
- Martinou, A., Kafetzopoulos, D., & Bouriotis, V. (1995). Chitin deacetylation by enzymatic means: Monitoring of deacetylation processes. *Carbohydrate Research*, 273(2), 235-242.

- Matheus, J. R. V., De Farias, P. M., Satoriva, J. M., De Andrade, C. J., & Fai, A. E. C. (2023). Cassava starch films for food packaging: Trends over the last decade and future research. *International Journal of Biological Macromolecules*, 225, 658-672. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.11.129>
- Michalska, D., Bieńko, D., Abkowicz-Bieńko, A., & Latajka, Z. (1996). Density functional, Hartree–Fock, and MP2 studies on the vibrational spectrum of phenol. *The Journal of Physical Chemistry*, 100(45), 17786-17790.
- Miles, M. J., Morris, V. J., Orford, P. D., & Ring, S. G. (1985). The roles of amylose and amylopectin in the gelation and retrogradation of starch. *Carbohydrate Research*, 135(2), 271-281. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)90778-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)90778-X)
- Molina-Botero, I. C., Gaviria-Urbe, X., Rios-Betancur, J. P., Medina-Campuzano, M., Toro-Trujillo, M., González-Quintero, R., Ospina, B., & Arango, J. (2023). Methane Emission, Carbon Footprint and Productivity of Specialized Dairy Cows Supplemented with Bitter Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Animals*, 14(1), 19. <https://doi.org/10.3390/ani14010019>
- Morrison Thornton, R., & Boyd, R. N. (1987). *Organic Chemistry*.
- Mose, B. R., & Maranga, S. M. (2011). A review on starch based nanocomposites for bioplastic materials. *Journal of Materials Science and Engineering. B*, 1(2B), 239.
- Mosquero A., M. (2006). *OBSERVACIONES MORFOLÓGICAS Y ANATÓMICAS EN NÚCULAS DE ROSMARINUS L. (LAMIACEAE) EN EL SUROESTE DE ESPAÑA*. 7.
- M'sakni, N. H., & Alsufyani, T. (2023). Part B: Improvement of the Optical Properties of Cellulose Nanocrystals Reinforced Thermoplastic Starch Bio-Composite Films by Ex Situ Incorporation of Green Silver Nanoparticles from *Chaetomorpha linum*. *Polymers*, 15(9), 2148. <https://doi.org/10.3390/polym15092148>

- Muzaffar, S., & Tahir, H. (2018). Enhanced synthesis of silver nanoparticles by combination of plants extract and starch for the removal of cationic dye from simulated waste water using response surface methodology. *Journal of Molecular Liquids*, 252, 368-382. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.01.007>
- Nair, G. M., Sajini, T., & Mathew, B. (2022). Advanced green approaches for metal and metal oxide nanoparticles synthesis and their environmental applications. *Talanta Open*, 5, 100080. <https://doi.org/10.1016/j.talo.2021.100080>
- Narina, S. S., Jasti, M., Buyyarapu, R., & Bhattacharjee, R. (2011). Manihot. En C. Kole (Ed.), *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources* (pp. 133-155). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-21102-7_8
- Nasrollahzadeh, M., Sajjadi, M., Iravani, S., & Varma, R. S. (2021). Starch, cellulose, pectin, gum, alginate, chitin and chitosan derived (nano) materials for sustainable water treatment: A review. *Carbohydrate polymers*, 251, 116986.
- Nates-Parra, G. & otros. (2016). *Iniciativa Colombiana de Polinizadores Capítulo Abejas -ICPA*.
- Nowak, A., Szczuka, D., Górczyńska, A., Motyl, I., & Kręgiel, D. (2021). Characterization of Apis mellifera Gastrointestinal Microbiota and Lactic Acid Bacteria for Honeybee Protection—A Review. *Cells*, 10(3), 701. <https://doi.org/10.3390/cells10030701>
- N'zué, B., Cissé, B., Djédji, B., Kouakou, A., Dibi, K., N'guettag, A., & Zohouri, P. (2017). Stability study of some cassava (*Manihot esculenta*. Crantz) varieties relative to the harvest period in Côte D'Ivoire. *J Glob Agric Ecol*, 7(1), 16-24.
- Olivas Flores, J., Cornejo Bravo, J. M., & Chávez Méndez, J. R. (2021). *Efecto antimicrobiano de nanopartículas de quitosano y extractos naturales acuosos en Mycobacterium tuberculosis*.
- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA.

- Olivato, J. B., Grossmann, M. V. E., Bilck, A. P., & Yamashita, F. (2012). Effect of organic acids as additives on the performance of thermoplastic starch/polyester blown films. *Carbohydrate Polymers*, 90(1), 159-164. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.009>
- Othman, S. H., Ronzi, N. D. A., Shapi'i, R. A., Dun, M., Ariffin, S. H., & Mohammed, M. A. P. (2023). Biodegradability of Starch Nanocomposite Films Containing Different Concentrations of Chitosan Nanoparticles in Compost and Planting Soils. *Coatings*, 13(4), 777. <https://doi.org/10.3390/coatings13040777>
- Owais Mushtaq, S., Sharma, R., Agrawal, A., Sharma, A., Kumar, S., Awasthi, K., Yadav, C. S., & Awasthi, A. (2022). Green synthesis of ZnO nanoparticles from saffron corm extract and their bactericidal activity. *Materials Today: Proceedings*. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.09.613>
- Pakizeh, M., Moradi, A., & Ghassemi, T. (2021). Chemical extraction and modification of chitin and chitosan from shrimp shells. *European Polymer Journal*, 159, 110709. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110709>
- Pardo, L., Arias, J., & Molleda, P. (2021). Elaboración de nanopartículas de plata sintetizadas a partir de extracto de hojas de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y su uso como conservante. *La Granja*, 35(1). <https://doi.org/10.17163/lgr.n35.2022.04>
- Park, M. J., Kim, B. Y., & Jin, B. R. (2016). Molecular characterization of a chitin-binding protein with the peritrophin-A domain from the Asiatic honeybee *Apis cerana*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 19(4), 963-968. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2016.08.011>
- PARRA GUIOMAR NATES AND MONTOYA, P. M. A. N. D. C. F. J. A. N. D. R. N. A. N. D. G. C. A. N. D. O. D. (2013). ORIGEN GEOGRÁFICO Y BOTÁNICO DE MIELES DE *Apis mellifera* (APIDAE) EN CUATRO DEPARTAMENTOS DE COLOMBIA. 18, 427-438.

- Pillai, C. K. S., Paul, W., & Sharma, C. P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34(7), 641-678.
<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.04.001>
- PROTEIN CONCENTRATION BY UV ABSORBANCE AT 280NM. https://peakproteins.com/wp-content/uploads/2022/06/PPP_Protein-Conc-by-UV.pdf#new_tab
- Purca Peña, T. P. (2013). *Efectividad antibacteriana «in vitro» del extracto etanólico de Rosmarinus officinalis (romero) sobre flora salival* [Thesis, Universidad Nacional Mayor de San Marcos].
<https://bit.ly/3vfogRY>
- Raafat, D., von Bargen, K., Haas, A., & Sahl, H.-G. (2008). Insights into the Mode of Action of Chitosan as an Antibacterial Compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3764-3773. <https://doi.org/10.1128/AEM.00453-08>
- Rai, M., Yadav, A., & Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27(1), 76-83. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.09.002>
- Rico-Moctezuma, A., Vilchis-Nestor, A. R., Sánchez-Mendieta, V., Avalos-Borja, M., & Camacho-López, M. A. (2010). Biosíntesis de nanopartículas de oro mediante el extracto de *Opuntia ficus-indica*. *Superficies y vacío*, 23, 94-97.
- Riera, M. A., & Palma, R. R. (2018). Obtención de bioplásticos a partir de desechos agrícolas. Una revisión de las potencialidades en Ecuador. *Avances en Química*, 13(3), 69-78. Redalyc.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603-632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
- Romeu, C. R., Botta Ferret, E., & Díaz Finalé, Y. (2007). CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE ROMERO (*ROSMARINUS OFFICINALIS* L.) Y EVALUACIÓN IN VITRO DE SU ACTIVIDAD ACARICIDA. *Fitosanidad*, 11(2), 75-78. Redalyc.

- Saepoo, T., Sarak, S., Mayakun, J., Eksomtramage, T., & Kaewtatip, K. (2023). Thermoplastic starch composite with oil palm mesocarp fiber waste and its application as biodegradable seeding pot. *Carbohydrate Polymers*, 299, 120221. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120221>
- Salazar Garay, D. C., & Sobrado Rivera, D. J. (2019). *OBTENCIÓN DE BIOPELÍCULAS DE ALMIDÓN A PARTIR DE DOS VARIEDADES DE MAÍZ AMILÁCEO Y AMARILLO DURO (Zea mays. L.)*. Universidad Nacional Hermillo Valdizán.
- Sánchez Vásques, C. G., & Córdoba Artavia, O. (2007). *Sistema de Control de Producción y calidad de la yuca y estudio y análisis de costos de producción y pérdidas de materia prima para Empacadora La Perla CR. S.A., en la Fortuna de San Carlos*. Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Santelia, D., & Zeeman, S. C. (2011). Progress in Arabidopsis starch research and potential biotechnological applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 271-280. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.11.014>
- Savadekar, N. R., & Mhaske, S. T. (2012). Synthesis of nano cellulose fibers and effect on thermoplastics starch based films. *Carbohydrate Polymers*, 89(1), 146-151. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.02.063>
- Seung, D. (2020). Amylose in starch: Towards an understanding of biosynthesis, structure and function. *New Phytologist*, 228(5), 1490-1504. <https://doi.org/10.1111/nph.16858>
- Shah, M., Fawcett, D., Sharma, S., Tripathy, S., & Poinern, G. (2015). Green Synthesis of Metallic Nanoparticles via Biological Entities. *Materials*, 8(11), 7278-7308. <https://doi.org/10.3390/ma8115377>
- Shapi'i, R. A., Othman, S. H., Basha, R. K., & Naim, M. N. (2022). Mechanical, thermal, and barrier properties of starch films incorporated with chitosan nanoparticles. *Nanotechnology Reviews*, 11(1), 1464-1477. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2022-0094>

- Sivaraj, R., Rahman, P. K. S. M., Rajiv, P., Narendhran, S., & Venckatesh, R. (2014). Biosynthesis and characterization of *Acalypha indica* mediated copper oxide nanoparticles and evaluation of its antimicrobial and anticancer activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 129, 255-258. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.03.027>
- Soto-Castro, D., Reyes-Torres, U., Santos-López, G., Cano-Barrita, P. F. de J., Karaaslan, M. A., Renneckar, S., Hernández-Martínez, Á. R., & Gutiérrez, M. C. (2023). Improving the thermo-activated shape memory of thermoplastic potato starch by adding silver nanoparticles. *Journal of Materials Science*, 58(38), 15116-15131.
- Stehfest, K., Boese, M., Kerns, G., Piry, A., & Wilhelm, C. (2004). Fourier transform infrared spectroscopy as a new tool to determine rosmarinic acid in situ. *Journal of plant physiology*, 161(2), 151-156.
- Temesgen, Z., Bakalo, basa, & Tamirat, H. (s. f.). Medicinal, Nutritional and Anti- Nutritional Properties of Cassava (*Manihot esculenta*): A Review. *Academic Journal of Nutrition* 8 (3): 34-46, 2019. <https://doi.org/10.5829/idosi.ajn.2019.34.46>
- Torres, P., Pérez, A., Marmolejo, L. F., Ordóñez, J. A., & García, R. E. (2010). UNA MIRADA A LA AGROINDUSTRIA DE EXTRACCIÓN DE ALMIDÓN DE YUCA, DESDE LA ESTANDARIZACIÓN DE PROCESOS. *Revista EIA*, 23-38.
- Tsikourkitoudi, V., Henriques-Normark, B., & Sotiriou, G. A. (2022). Inorganic nanoparticle engineering against bacterial infections. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 38, 100872. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2022.100872>
- Valdez, M. I., Garcia, J., Ubeda-Manzanaro, M., Martinez, A., & Rodrigo, D. (2022). Insect chitosan as a natural antimicrobial against vegetative cells of *Bacillus cereus* in a cooked rice matrix. *Food Microbiology*, 107, 104077. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104077>

- Valodkar, M., Modi, S., Pal, A., & Thakore, S. (2011). Synthesis and anti-bacterial activity of Cu, Ag and Cu–Ag alloy nanoparticles: A green approach. *Materials Research Bulletin*, 46(3), 384-389. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2010.12.001>
- Wang, J., & Zhuang, S. (2022). Chitosan-based materials: Preparation, modification and application. *Journal of Cleaner Production*, 355, 131825. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131825>
- Wang, W., Wu, N., Zu, Y. G., & Fu, Y. J. (2008). Antioxidative activity of Rosmarinus officinalis L. essential oil compared to its main components. *Food Chemistry*, 108(3), 1019-1022. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.046>
- Wexler, A. (1976). Vapor pressure formulation for water in range 0 to 100 C. A revision. *Journal of Research of the National Bureau of Standards Section A: Physics and Chemistry*, 80A(5 and 6), 775. <https://doi.org/10.6028/jres.080A.071>
- Whistler, R. L., & BeMiller, J. N. (2009). *Starch: Chemistry and technology* (3rd ed). Academic Press.
- Yahia, R., Owda, M. E., Abou-Zeid, R. E., Abdelhai, F., Gad, E. S., Saleh, A. K., & El-Gamil, H. Y. (2022). Synthesis and characterization of thermoplastic starch/ PVA /cardanol oil composites loaded with in-situ silver nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science*, 139(3), 51511. <https://doi.org/10.1002/app.51511>
- Zapata-Luna, R., Davidov-Pardo, G., Pacheco, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., García-Márquez, E., & Cuevas-Bernardino, J. (2023). Structural and physicochemical properties of bio-chemical chitosan and its performing in an active film with quercetin and Phaseolus polyanthus starch. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 22(2).
- Zhang, W., Miao, A.-J., Wang, N.-X., Li, C., Sha, J., Jia, J., Alessi, D. S., Yan, B., & Ok, Y. S. (2022). Arsenic bioaccumulation and biotransformation in aquatic organisms. *Environment International*, 163, 107221. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107221>

Zhu, F. (2015). Composition, structure, physicochemical properties, and modifications of cassava starch. *Carbohydrate Polymers*, 122, 456-480.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.063>

8 ANEXOS

8.1 Tablas

Tabla 3. Diámetros calculados por UV-Vis de nanopartículas de plata (Ag) y nanopartículas de cobre (Cu).

dm Ag	dm Cu
119.8843	88.3232727
132.8021	86.1695683
119.8843	60.26143
113.013	76.3867399
120.4134	83.9107644
98.65399	81.5360748
127.2484	76.3867399
122.9719	83.9107644
116.576	94.2414844